T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KOLHİSİN UYGULAMALARININ 'TRAKYA İLKEREN', 'EKŞİ KARA' ve 'GÖK ÜZÜM' (*Vitis vinifera* L.) ÇEŞİTLERİNDE MORFOLOJİK VE SİTOLOJİK ETKİLERİ

Kevser YAZAR

DOKTORA TEZİ

Bahçe Bitkileri Anabilim Dalını

Ekim-2018

KONYA

Her Hakkı Saklıdır

ÖZET

DOKTORA TEZİ

KOLHİSİN UYGULAMALARININ 'TRAKYA İLKEREN', 'EKŞİ KARA' ve 'GÖK ÜZÜM' (*Vitis vinifera* L.) ÇEŞİTLERİNDE MORFOLOJİK VE SİTOLOJİK ETKİLERİ

Kevser YAZAR

Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Zeki KARA

2018, 80 Sayfa

Jüri
Prof. Dr. Zeki KARA
Prof. Dr. Cihat TÜRKBEN
Prof. Dr. Birhan MARASALI KUNTER
Prof. Dr. Tuna UYSAL
Prof. Dr. Ali SABIR

Sofralık üzüm (*Vitis vinifera* L.) dünya toplam üzüm üretiminin yaklaşık olarak %36'sını oluşturmaktadır. Ülkemizin mevcut pazarda yerinin tüketici, pazar talepleri doğrultusunda korunması ve geliştirilmesinde otokton üzüm çeşitlerimizin özelliklerinde iyileştirme yapılması, bulundukları ekolojilere iyi adapte olmuş yeni çeşitlerin ıslahı ve muhafazası önem taşımaktadır. Poliploidizasyon, bitki ıslahında yeni gen kaynaklarının oluşturulması için önemli bir araçtır. Ploidi seviyesi artırılan bitkiler tane iriliği, yaprak büyüklüğü, filokseraya dayanım gibi bazı özelliklerinde orijinal diploidlerine oranla daha iyi nitelik kazanabilmektedir. Ploidi, kolhisin de dahil olmak üzere birçok antimitotik ajan kullanılarak uyarılabilmektedir. Bu çalışmada geleneksel, antik dönemden gelen, İç Anadolu Bölgesinin karasal iklimi ve denizden yüksekliği 1000 metrenin üzerinde, iklim ekstremlerinin sıklıkla yaşandığı ekolojiye adaptasyonu mükemmel 'Ekşi Kara' ve 'Gök üzüm' çeşitleri ve Türkiye'de son yıllarda melezleme ile ıslah edilmiş 'Trakya İlkeren' çeşidinde kolhisin uygulamalarıyla poliploid genotiplerin elde edilmesi *in vivo ve in vitro* koşullarda incelenmiştir. Kolhisin uygulamalarının etkileri, uygulama yapılan genotiplerdeki morfolojik ve sitolojik değişikliklerin takibi ve tetraploid 'Kyoho' üzüm çeşidi ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

In vivo birinci yıl uygulamalarında düşük konsantrasyonda kolhisin uygulamalarında, sürgün büyümesinin çeşitli oranlarda devam ettiği ve 10 g L^{-1} kolhisin uygulamalarında kotiledon döneminde toksik etki sonucu kör fide oluştuğu belirlenmiştir. Bitkilerde poliploid genotiplerin oluşmasıyla stoma boyutunun artması, stoma yoğunluğunun azalması bu çalışmada, *in vivo* ve *in vitro* kolhisin uygulamaları sonucu yapılan stoma özellik incelemeleriyle desteklenmiştir. *In vivo* kotiledon uygulamalarının birinci yılında, bitkilerin flow sitometri (FC) analizi sonucunda ploidi seviyelerinin orijinal diploidlerden farklı olmadığı anlaşılmıştır. *In vivo* çalışmalarının ikinci yılında 5 g L^{-1} kolhisin uygulanan 'Ekşi Kara' ve 2 g L^{-1} ve 6 g L^{-1} kolhisin uygulanan 'Trakya İlkeren' fidelerinde kloroplast sayımları ve FC analizi sonucunda ploidi seviyesinin değiştiği, tetraploid ve miksoploid genotipler oluştuğu tespit edilmiştir. *In vitro* kolhisin uygulamalarında 'Ekşi Kara' ve 'Gök üzüm' çeşitlerinde 10 mg L^{-1} ve 20 mg L^{-1} konsantrasyonlarının kloroplast sayılarını değiştirdiği tespit edilmiştir. Kloroplast sayısındaki önemli artışlar, üzerinde çalışılan genotipler de ploidi düzeyinin etkilediğini göstermiştir.

Bu çalışmada, kolhisin uygulamalarının stoma özelliklerinde önemli değişikliklere neden oldukları belirlenmiştir Kolhisin uygulamaları sonucunda, stoma özellikleri orijinal diploidlerinden önemli farklılıklar gösteren asma genotiplerinde, poliploid ve miksoploid genotiplerin oluştuğu kloroplast sayımı, FC analizleri ve kromozom sayımları ile tespit edilmiştir. Poliploidi çalışmalarında, stoma gözlemlerinin

yanısıra kloroplast sayımı, FC analizi ve kromozom sayımlarının doğrulanmış sonuçlara ulaşmada önemli araçlar olduğu düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Vitis vinifera* L., mutasyon, poliploidi, Flow sitometri, iyileştirme

ABSTRACT

Ph.D THESIS

MORPHOLOGICAL AND CYTOLOGICAL EFFECTS OF COLCHICINE APPLICATION ON 'TRAKYA İLKEREN', 'EKŞİ KARA' AND 'GÖK ÜZÜM' (*Vitis vinifera* L.) CULTIVARS

Kevser YAZAR

THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF SELÇUK UNIVERSITY
DOCTOR OF PHILOSOPHY
Horticulture

Advisor: Prof. Dr. Zeki KARA

2018, 80 Pages

Jury
Prof. Dr. Zeki KARA
Prof. Dr. Cihat TÜRKBEN
Prof. Dr. Birhan MARASALI KUNTER
Prof. Dr. Tuna UYSAL
Prof. Dr. Ali SABIR

Table grape (*Vitis vinifera* L.) production is approximately 36% of world production. Development and improvement of the characteristics of our autochthon grape varieties are important for the improvement and preservation of new varieties that are well adapted to their ecology in the preservation and development of our country's current market place in line with consumer and market demands. Polyploidization is significant tool for the generation of new germplasm resources in plant breeding. Plants with increased ploidy level may have better quality than some of the original diploids in terms of berry size, leaf size and phylloxera resistance. Ploidy can be induced using a variety of antimitotic agents, including colchicine.

In this study, polyploidy induction has been studied in *in vivo* and *in vitro* conditions with colchicine applications in the grape varieties that traditional, ancient, autochthonous well adapted to the ecology experiencing frequently climate extremes in the continental climate of Central Anatolia Region 1000 meters above sea level 'Ekşi Kara' and 'Gök Üzüm', and 'Trakya İlkeren' has been improved by crossbreeding in recent years in Turkey. The effects of colchicine applications were evaluated by following morphological and cytological changes in genotypes and comparing them with tetraploid 'Kyoho' grape variety.

In low-dose colchicine applications, shoot growth continued at various rates conditions at *in vivo* first year and 10 g L^{-1} colchicine applications caused blind seedling at the cotyledon stage as a result of toxic effects. As a result of the formation of polyploid genotypes in the plants, the increase in stoma size and the decrease in the stoma density were supported by stoma traits in this study. In the first year of *in vivo* cotyledon applications, flow cytometry (FC) analysis revealed that ploidy levels were not different from the original diploids. In the 2nd year of *in vivo* studies, 5 g L^{-1} colchicine applied 'Ekşi Kara' and 2 g L^{-1} and 6 g L^{-1} colchicine 'Trakya İlkeren' seedlings in chlorophyll counts and FC analysis showed that the applications changed the level of ploidy, tetraploid and mixoploid genotypes were detected. 10 mg L^{-1} and 20 mg L^{-1} colchicine doses in 'Ekşi Kara' and 'Gök Üzüm' varieties have resulted in significant changes in chloroplast counts at *in vitro*. Significant increases in the number of chloroplasts have been shown to influence the level of ploidy in genotypes studied.

In this study, it was determined that colchicine applications caused significant changes in stoma characteristics. As a result of colchicine applications, polyploid and mixoploid genotypes were detected by chloroplast count, FC analyzes, and chromosome counts in vine genotypes showing significant differences

from the original diploids. Polyploidy studies, as well as stoma observations, chloroplast count, FC analysis and chromosome counts are thought to be important tools in reaching validated results.

Keywords: *Vitis vinifera* L., mutation, polyploidy, flow cytometry, improvement

ÖNSÖZ

Asma ıslahı konusunda bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşarak, tez çalışmam ve lisansüstü eğitimim süresince bana destek olan, yol gösteren danışman hocam Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü, Bağ Yetiştirme ve Islahı Ana Bilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Zeki KARA'ya teşekkürlerimi sunarım.

Tez izleme komitesi çalışmaları süreçlerinde sınırsız yardım ve desteklerini hissettiğim değerli hocalarım Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Öğretim Üyesi Prof. Dr. Birhan MARASALI KUNTER'e ve Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Öğretim Üyesi Prof. Dr. Ali SABIR'a,

Kromozom sayımları konusunda hiçbir yardımı esirgemeyen Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Prof. Dr. Tuna UYSAL'a ve Flow sitometri analizleri için yardımlarını gördüğüm Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü Öğretim Üyesi Prof. Dr. Metin TUNA'ya, Flow sitometri analizleri konusunda bilgi ve tecrübelerini paylaşarak kloroplast sayımları sonucunda yapılan analizlerde desteklerini gördüğüm Tarım ve Orman Bakanlığı Alata Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü çalışanı Zir. Yüksek. Müh. Atilla ATA'ya şükranlarımı sunarım.

Özveri gerektiren uzun ve yoğun laboratuvar ve arazi çalışmalarımda yanımda olarak bana destek olan Zir. Müh. Heydem EKİNCİ'ye,

In vitro koşullarda yaptığım analizlerde bilgi ve görüşlerini paylaşarak katkıda bulunan Arş. Gör. Münüre TANUR'a ve tezimin arazi ve laboratuvar aşamalarında destek olan Arş. Gör. Osman DOĞAN'a,

Destekleri ile her zaman yanımda olan Arş. Gör. Dr. Namık Kemal YÜCEL'e, Gülşah YÜCEL'e ve Zir. Müh. Fatma KOÇ'a teşekkür ederim.

Bu günlere ulaşmamda büyük emekleri olan aileme, gösterdikleri ilgi, sevgi anlayışları için şükranlarımı sunmayı bir borç bilirim.

Kevser YAZAR
KONYA-2018

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **iv**

ABSTRACT ..... **vi**

ÖNSÖZ ..... **viii**

İÇİNDEKİLER ..... **ix**

SİMGELER VE KISALTMALAR ..... **xi**

Simgeler xi
Kısaltmalar xi

1. GİRİŞ **1**

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI **4**

2.1. Kuramsal Temeller 4
2.2. Kapalı Tohumlularda Poliploidi 6
2.3. Poliploidi Uygulamaları 7
2.4. Poliploidinin Tespiti 11

3. MATERYAL VE YÖNTEM **15**

3.1. Materyal 15
3.1.1. 'Ekşi Kara' 15
3.1.2. 'Gök Üzüm' 16
3.1.3. 'Trakya İlkeren' 16
3.1.4. 'Kyoho' 16
3.1.5. Kolhisin 17
3.2. Yöntem 17
3.2.1. Kotiledon aşamasında bitkilere birinci yıl kolhisin uygulamaları 17
3.2.2. Kotiledon aşamasında bitkilere ikinci yıl kolhisin uygulamaları 19
3.2.3. Tek göz çeliklerine kolhisin uygulamaları 19
3.2.4. *In vivo* sürgün ucu kolhisin uygulamaları 20
3.2.5. *In vitro* kolhisin uygulamaları 21
3.3. Ploidi Düzeyinin Belirlenmesi 23
3.3.1. Sürgün ucu canlılık oranı (%) 23
3.3.2. Sürgün uzunluğu (cm) 24
3.3.3. Sürgün çapı (mm) 24
3.3.4. Stoma gözlemleri [stoma yoğunluğu (adet mm^{-2}), stoma genişliği (µm), stoma uzunluğu (µm)] 25
3.3.5. Canlılık oranı (%) 26
3.3.6. Gelişme oranı (%) 26
3.3.7. Kloroplast sayımı (adet $stoma^{-1}$) 26
3.3.8. Flow sitometri (FC) analizi 27
3.3.9. Kromozom sayımı 27
3.3.8. İstatistiksel analiz 28

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA 29

4.1. Kotiledon Aşamasında Kolhisin Uygulamalarının Sonuçları 29
4.1.1 Kotiledon aşamasında kolhisin uygulamalarının birinci yıl sonuçları 29
4.1.2 Kotiledon aşamasında kolhisin uygulamalarının ikinci yıl sonuçları 36
4.2. Tek Göz Çeliklerine Kolhisin Uygulamaları 47
4.2.1. Sürgün ucu canlılık oranı (%) 47
4.2.2. Sürgün uzunluğu (cm) 48
4.2.3. Sürgün çapı (mm) 49
4.2.4. Stoma uzunluk (µm), genişlik (µm) ve yoğunluk (adet mm^{-2}) gözlemleri 51
4.2.5. Kloroplast sayımı (adet $stoma^{-1}$) sonuçları 54
4.3. *In vivo* sürgün ucu kolhisin uygulamaları 55
4.3.1. Sürgün ucu canlılık oranı (%) 55
4.3.2. Sürgün uzunluğu (cm) 56
4.3.3. Sürgün çapı (mm) 57
4.3.4. Stoma uzunluk (µm), genişlik (µm) ve yoğunluk (adet mm^{-2}) gözlemleri 58
4.3.5. Kloroplast sayımı (adet $stoma^{-1}$) sonuçları 60
4.4. *In vitro* kolhisin uygulamaları sonuçları 61
4.4.1. Canlılık oranı (%) 61
4.4.2. Gelişme oranı (%) 62
4.4.3. Stoma uzunluk (µm), genişlik (µm) ve yoğunluk (adet mm^{-2}) gözlemleri 63
4.4.4. Bitkiciklerde kloroplast sayımı (adet $stoma^{-1}$) sonuçları 66
4.4.5. Flow sitometri (FC) analizi sonuçları 67
4.5. Kromozom Sayımı 68
4.6. Tartışma 69
4.6.1. Sürgün ucu canlılık oranı (%) 69
4.6.2. Canlılık oranı (%) 71
4.6.3. Sürgün uzunluğu (cm) 72
4.6.4. Sürgün çapı (mm) 73
4.6.5. Gelişme oranı (%) 73
4.6.6. Stoma gözlemleri 74
4.6.6. Kloroplast sayısı (adet $stoma^{-1}$) 75
4.6.7. Flow sitometri analizi 76
4.6.8. Kromozom sayımı 77

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 79

5.1. Sonuçlar 79
5.2. Öneriler 80

KAYNAKLAR 81

ÖZGEÇMİŞ 89

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

% : Yüzde
ºC : Santigrat Derece
cm^2 :Santimetre kare
cm : Santimetre
cm^3 :santimetreküp
g : Gram
$g\ L^{-1}$: Gram $litre^{-1}$
$mg\ L^{-1}$: Miligram $litre^{-1}$
mm : Milimetre
mm^2 : Milimetrekare
µm : Mikrometre
ml : Mililitre
µl : Mikro litre

Kısaltmalar

BAP : Benzil amino pürin
TDZ :Tidiazuron
DMSO: Dimetil sülfoksit
MS : Murashige Skoog
2,4-D :2-4 Diklorofenoksiasetik
°Brix : Suda çözünür kuru madde
pg : Pikogram
FC : Flow sitometri
x : Temel kromozom sayısı
n : Haploid kromozom sayısı
2n : Diploid kromozom sayısı
3x : Triploid kromozom sayısı
4x : Tetraploid kromozom sayısı
s :saat

1. GİRİŞ

Asma (*Vitis vinifera* L.) ekonomik ve kültürel öneme sahip, yerkürenin en eski bitkilerinden birisidir. 2016 yılı verilerine göre dünyada yaklaşık 7096741 ha alanda 77438929 ton üzüm üretimi yapılmıştır. Ülkemiz, 435227 ha alanda 4 milyon ton üzüm üretim miktarı ile dünyada bağcılık yapılan ülkeler içerisinde alan bakımından 5. (%6.6); üretim bakımından ise 6. (%5.6) sırada yer almaktadır (FAO, 2018).

Dünyada üzüm, sofralık, şaraplık-şıralık ve kurutmalık olmak üzere başlıca üç şekilde değerlendirilmektedir. Sofralık üzüm üretimi, dünya üretim oranının yaklaşık olarak %36'sını oluşturmakta (OIV, 2017b) ve dış ticaret pazarında önemli yer tutmaktadır. Üzüm üretimi bakımından önde gelen ülkeler arasında yer alan Türkiye'de toplam üretimin yaklaşık olarak %50'si sofralık olarak değerlendirilmektedir (TÜİK, 2018). Tüketici ve pazar talepleri doğrultusunda ülkemizin mevcut pazarda yerinin korunması ve geliştirilmesinde otokton üzüm çeşitlerimizin özelliklerinde iyileştirme yapılması, bulundukları ekolojilere iyi adapte olmuş yeni çeşitlerin ıslahı ve muhafazası önem taşımaktadır.

Otokton çeşitler, geleneksel olarak yetiştiricilik yapan üreticiler tarafından sosyal, ekonomik, kültürel ve ekolojik ihtiyaçları doğrultusunda seçilerek isimlendirilen ve muhafaza edilen bölgesel koşullara adaptasyon sağlamış bitki popülasyonlarıdır (Teshome ve ark., 1997; Zeven, 1998; Alvarez ve ark., 2010). En gelişmiş Avrupa ülkelerinde bile halen geleneksel tarımda marjinal ekonominin temelini oluşturmaktadırlar (Negri, 2005; Biasi ve Brunori, 2015). Genotip-çevre ilişkilerinin optimum düzeyde olması ve minimum dış girdi gerektirmeleri sayesinde yüksek kaliteli üzüm ve önolojik ürünler üretme potansiyeline sahiptirler ve sürdürülebilir bağcılık için büyük önem taşımaktadırlar (Biasi ve Brunori, 2015).

Bitki ıslahının temel prensipleri arasında genetik çeşitliliğin sağlanması ve bu çeşitlilik içerisinden istenilen özelliklere göre seleksiyon yapılması yer almaktadır. Genetik değişiklikler; melezleme, mutasyon, poliploidi gibi geleneksel ve geleneksel olmayan yöntemlerle oluşturulabilmektedir (Sharma ve ark., 2009). Asmanın (*Vitis vinifera* L.) yüksek oranda heterozigotik bir bitki (Sharma ve ark., 2009; Di Genova ve ark., 2014) olması sebebiyle melezleme ıslahı çalışmalarında geliştirilmek istenilen özellikler dışında başka özelliklerde de değişmeler meydana gelebilmektedir. Bu sebeple adaptasyon yeteneği yüksek yeni çeşitler geliştirmek için geleneksel ıslah çalışmalarında gereken süreyi kısaltmak ve kombinasyon ıslahı ile kazanılamayan agronomik

karakterlerin elde edilmesi amacıyla mutasyon ve poliploidi gibi geleneksel olmayan çalışmalar üzerinde de durulmaktadır.

Poliploidleşme, uzunca bir zamandır çok çeşitli bitki familyalarından gelen bitki türlerine uygulanan bir tekniktir (Soltis ve ark., 2004) ve birçok bitki türünde yeni gen kaynaklarının oluşturulması ve ıslah çalışmaları için önem taşımaktadır (Yue ve ark., 2017). Hücre çekirdeğinde 2 veya daha fazla kromozom takımı bulunan bitkiler poliploid olarak tanımlanmakta (Ramsey ve Schemske, 1998; Comai, 2005) ve bitkilerde morfoloji, fizyoloji, sitoloji ve fitokimyasallar da dahil olmak üzere çeşitli değişiklikler meydana getirerek bitkilerin adaptasyon kabiliyetinde artış sağlanabilmektedir (Notsuka ve ark., 2000; Motosugi ve ark., 2002b; Ramanna ve Jacobsen, 2003; Thao ve ark., 2003; Sattler ve ark., 2016; Chen ve ark., 2017). Bahçe bitkilerinde poliploidinin yaygın kullanımı arasında tetraploid bitkilerin elde edilmesi ve bunların daha sonra diploid bitkilerle melezlenmesi yoluyla, triploid çekirdeksiz genotiplerin elde edilmesi de yer almaktadır. Birçok türde farklı ploidi seviyesindeki çeşitler ticari olarak kullanılmaktadır (Liang ve ark., 2011; Shi ve ark., 2015). Örneğin Japonya'da 'Kyoho', 'Fujiminori', 'Pione' gibi tetraploid üzüm çeşitlerinin ticari olarak yetiştiriciliği yapılmakta ve bu çeşitler alan bakımından toplam çeşitliliğin %48'ini oluşturmaktadır (Yamada ve Sato, 2016). Dünya üzüm üretiminde ilk sırada yer alan Çin'de ise toplam üzüm üretim oranının %44'ünü 'Kyoho' çeşidinin oluşturduğu bildirilmiştir (OIV, 2017a).

Kromozom katlama yani poliploidizasyon çeşitli kimyasallar kullanılarak yapılabilmektedir. Kolhisin, çayır safranı veya güz çiğdemi bitkisinden (*Colchicum autumnale* L.) elde edilen bir alkoloiddir ve poliploidi uyarımı için en yaygın kullanılan antimitotik ajandır. Bu antimitotik ajanın mitozu metafaz evresinde bloke etmesi sayesinde hücrelerde poliploidi oluşmaktadır (Planchais ve ark., 2000). Tetraploid bitkilerin elde edilmesi amacıyla birçok çalışmada kolhisinin etkileri denenmiştir (Kuliev, 2011; Ma ve ark., 2014; Sinski ve ark., 2014; Kara ve ark., 2018a).

'Ekşi Kara' ve 'Gök Üzüm' (*Vitis vinifera* L.), Konya'da ekolojiye iyi uyum sağlamaları nedeniyle yoğun olarak yetişen antik ve otokton üzüm çeşitleridir (Kara ve ark., 2017a). Bu özelliklerinin yanı sıra 'Gök Üzüm', 'Ekşi Kara' çeşidinin tozlanmasında kullanılan en önemli çeşit niteliğindedir (Kara ve ark., 2016b; Kara ve ark., 2017a). 'Ekşi Kara' çeşidinin tozlayıcı ihtiyacının (Kara ve ark., 2017b) ve pazarlama için meyve kalitesinin iyileştirilmesi gerekmektedir.

Geleneksel çeşitlerin yetiştiği alana olan adaptasyonlarının bozulmadan özelliklerinin geliştirilmesi önem taşımaktadır. Daha önce yapılan çalışmalarda da

tetraploid çeşitlerde diploidlere kıyasla olgunluk zamanı, salkım ve tane şekli, tane rengi, tane kalitesi, SÇKM ve asit düzeyinde belirgin bir farklılığın olmadığı belirlenmiştir. Buna karşın, çeşide bağlı olarak tetraploidlerde tane iriliğinde artış görülmektedir (Notsuka ve ark., 2000; Park ve ark., 2004; Yamada ve Sato, 2016). Aynı zamanda tetraploid çeşitlerin şeker içeriğinin diploidlere oranla fazla olduğu da bildirilmiştir (Kuliev, 2011). 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 (Motosugi ve ark., 2002b; Sattler ve ark., 2016).

In vivo koşullarda poliploidinin uyarımı için geleneksel olarak sürgünlere, aktif tomurcuklara, tohum veya fidelere kolhisin uygulamaları yapılmaktadır (Zhang ve ark., 2008). Bu uygulamaların yanı sıra *in vitro* yöntemlerle de kromozom katlanması sağlanmaktadır. *In vitro* koşullar ve yöntemler, kromozom katlama uygulamalarının gerçekleşebileceği kontrollü bir ortam sağlar ve poliploidizasyon oluşum oranını arttırırlar. Ayrıca, *in vitro* sistemlerin doğasına bağlı olarak, saf poliploidler, miksoploidlerden ayrılabilir (De Schepper ve ark., 2004; Chen ve Gao, 2007; Aleza ve ark., 2009). Konuyla ilgili önceki çalışmalar, poliploidi uyarımı için uygulama dozu, süresi, doku tipi ve uygulama yöntemleri bakımından farklılıklar göstermektedir (Dhooghe ve ark., 2011). Farklı asma çeşitleri ile uygun kolhisin uygulama yönteminin ve uygulama dozlarının belirlenmesine yönelik yeni çalışmaların yapılmasına ve ploidi düzeyi artırılmış çeşitlerin elde edilmesine yönelik çalışmalara gerek duyulmaktadır.

Bu çalışmada geleneksel çeşitlerin tane tutumu, tane iriliği, gibi kalite özelliklerinde iyileşme sağlanarak, çeşitlerin ploidi seviyelerinin arttırılması sonucunda iç ve dış piyasada rekabet edebilecek, adaptasyon özelliği arttırılmış yeni genotiplerin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Geleneksel antik dönemden kalma ve yöreye adaptasyonu iyi ‘Ekşi Kara’ ve ‘Gök Üzüm’ çeşitleri ve Türkiye’de ıslah edilmiş ‘Trakya İlkeren’ çeşidinde kolhisin dozlarıyla ploidi düzeylerinin geliştirilmesi *in vivo* ve *in vitro* koşullarda incelenmiştir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Kuramsal Temeller

Uygulanabilir ıslahta başarı oranının genetik varyasyona bağlı olduğu bilinmektedir. Mutasyonlar, genetik materyalde rekombinasyon veya genetik açılma orijinli olmayan kalıtsal değişikliklerdir (Acquaah, 2007). Bitkiler de dahil olmak üzere herhangi bir organizmada mevcut olan genetik varyasyonların birincil kaynağını oluştururlar. Doğada bulunan genetik varyasyonlar, spontan mutasyonların orijinal spektrumlarını temsil etmekten ziyade popülasyonlarda genotip ve çevresel faktörlerin sürekli etkileşiminin sonucu ortaya çıkmaktadırlar. Spontan mutasyonların, çok nadir ve rastlantısal olarak ortaya çıkmaları nedeniyle bitki ıslah programlarında kullanımları sınırlı kalmaktadır. Bu sebeple bitki ıslahçıları yapay olarak mutasyon teşviki üzerine çalışmaktadırlar (Lönnig, 2005; Acquaah, 2007; Oladosu ve ark., 2016). Mutasyonlar geniş olarak gen düzeyinde veya nokta mutasyonlar (DNA dizisinde bir gen içinde meydana gelir) ve kromozom yapısında (ekleme, yer değiştirme, kopya ve silme) ve kromozom sayısında (poliploid, anöploid ve haploid) değişikliklere yol açan genler arası veya yapısal mutasyonlar olarak sınıflandırılabilirler (Oladosu ve ark., 2016).

Mutasyonlar, gametik veya somatik hücre kökenli olabilmektedir. Gametik mutasyonlar bir nesilden diğerine kalıtımla aktarılabilir ve gelecek nesillerde etkisi görülebilir. Bununla birlikte, somatik bir dokudaki mutasyon, bitkide kimerik yapının oluşmasına neden olmaktadır (Acquaah, 2007). Bitki kimeraları, apikal meristemde genetik olarak farklı hücrelerin bulunduğu bir mozaiktir ve periklinal, meriklinal ve sektörel kimeralar olarak sınıflandırılırlar. Çoğu dikotiledon bitki birbirinden bağımsız üst üste bulunan üç farklı apikal hücre katmanına (L_1, L_2, L_3) sahiptir. Mutasyonun yerleşim gösterdiği bölge ve apikal meristemde mutasyon olan hücrenin mutasyona uğramayan hücrelere oranları incelenerek kimera tipi belirlenmektedir (Szymkowiak ve Sussex, 1996; Burge ve ark., 2002). Diğer bitkilere benzer şekilde, asma (Dermen, 1947; Thompson ve Olmo, 1963) bitkinin farklı kısımlarına katkıda bulunan en az iki ayrı hücre katmanına (L_1 ve L_2) sahiptir ve sürgün apikal meristeminde bulunan kimerik yapı sitokimera olarak adlandırılmaktadır. Asmada L_1/L_2 oranına göre genel olarak periklinal kimera görüldüğü daha önceki yapılan çalışmalarda tespit edilmiştir (Walker ve ark., 2006).

Poliploidi, hücre çekirdeğinin ikiden fazla tam kromozom takımına sahip olması olarak tanımlanır, bitkilere büyük bir adaptasyon ve türleşme sağlamaktadır (Ramsey ve Schemske, 1998; Soltis ve ark., 2009; Jiao ve ark., 2011).

Ploidi seviyesi genellikle, nx kodlaması ile temsil edilmektedir. Kromozomların temel tam seti 'x' olarak tanımlanırken somatik hücrelerdeki toplam kromozom sayısı '2n' olarak belirlenmiştir. Bir organizmanın kalıtsal molekülündeki nukleotid dizilerinin tümü 'genom' olarak tanımlanırken (Keller, 2011), ploid organizmaların taşıdıkları genom sayısına göre Latince sayılardan oluşan ön ekler kullanılmaktadır: iki tam kromozom kümesine sahip bir çekirdek diploid (2x), üç tam kromozom seti (3x) triploid, dört tam set tetraploid (4x), 5 tam kromozom set pentaploid (5x) olarak adlandırılmıştır (Otto ve Whitton, 2000; Acquaah, 2007). Kromozom sayısındaki değişim, hücrenin bir veya birkaç kromozomunu da içerebilir; bu durum anöploidi olarak bilinmektedir. Anöploid değişimler, söz konusu türün somatik kromozom sayısı (2n) ile ilişkili olarak belirlenir. Bu nedenle, diploid ve poliploid türlerden oluşan anöploid bireyler için terminoloji aynıdır. Bir veya daha fazla tam genom içeren heteroploidi, öploidi olarak isimlendirilmektedir (Acquaah, 2007; Sattler ve ark., 2016). Anöploid bitkilerin gelişimsel anormallikler, kısırlık gibi nedenlerden dolayı ekonomik yararlılıkları nadiren değerlendirilmektedir (Lee ve ark., 2017).

Poliploidi, somatik doku hücrelerinin iki katına çıkarılmasına dayanan mitotik poliploidizasyon ve 2n gamet üretilmesini sağlayan mayotik poliploidizasyon olmak üzere iki mekanizma ile uyarılabilmektedir (Ramsey ve Schemske, 1998). Mayotik poliploidizasyon ile elde edilen 2n gametler, melezleme çalışmalarında hemen kullanılabilmekte ve ıslah sürecini bir nesil kısaltmaktadırlar. Buna ek olarak elde edilen bireylerde genetik varyasyonun da artmasını sağlamaktadırlar (Dhooghe ve ark., 2011). Soğuk, kuraklık, besin eksikliği veya yaralama gibi stres faktörleri ile indirgenmemiş gametlerin üretim oranı artmaktadır (Parisod ve ark., 2010). Poliploid bitkiler, genomik orijinlerine bağlı olarak, otopoliploidler (bir tek atadan türetilen genomlara sahip türler) ve allopoliploidler (iki farklı genomun hibridizasyonundan türetilen türler, ardından genomik katlama yapılmış türler) olmak üzere ikiye ayrılmaktadır (Adams ve Wendel, 2005; Udall ve Wendel, 2006). Allopoliploidler de genellikle gerçek ve segmental allopoliploidler olmak üzere 2 alt sınıfa ayrılırlar (Sattler ve ark., 2016). Gerçek allopoliploidler, uzak ilişkili türler arasında melezleme çalışmaları sonrasında elde edilir. Mayoz bölünme sırasında bivalent oluştururlar ve alleller diploid genomlardaki gibi ayrışırlar (Ramsey ve Schemske, 2002; Sattler ve ark., 2016). Yapılan çalışmalar,

allopoliploidi ve otopoliploidinin her ikisinin de doğada yaygın olmasına rağmen doğada gözlemlenen çoğu poliploid türün alloploid orijinlere sahip olduğunu göstermiştir (Ramsey ve Schemske, 1998). Son yıllarda yapılan çalışmalar genomik yapısal değişikliklerin allopoliploidler de hızla gerçekleştiğini, oysa otopoliploid genomların daha stabil kalmaya eğilimli olduğunu ortaya koymuştur (Parisod ve ark., 2010). Tek başına ploidinin etkileri kesin olarak yalnızca somatik kromozom katlaması sonucu elde edilen otopoliploidler de belirlenebilmektedir çünkü otopoliploidler, donör bitkilerden genom büyüklüğü bakımından farklılık göstermektedirler (Cohen ve ark., 2013).

Poliploidler ayrıca doğal ve sentetik olarak da sınıflandırılabilmektedir. Doğal ploidi spontan genom katlamasının sonucu ortaya çıkmaktadır. Yapay ploidi ise hibridizasyonla veya uyarılmış sentetik genom katlamasının sonucu ortaya çıkmaktadır (Lloyd ve Bomblies, 2016). Somatik ikiye katlama, endomitoz veya endoreduplikasyon gibi mitotik olaylar ile ilişkilidir, bir zigot hücresinde veya apikal meristematik dokularda meydana gelebilir, bu da miksoploidlerin veya tamamen poliploid organizmaların oluşmasını sağlar (Ramsey ve Schemske, 1998).

2.2. Kapalı Tohumlularda Poliploidi

Poliploidi, bitkiler, hayvanlar, protistler olmak üzere üç ökaryotik alemde sıkça görülür (Storchova ve Pellman, 2004). Bitki aleminde poliploidler, kapalı tohumlular ve eğreltilerde yaygın olmakla birlikte (Schuettpelz ve ark., 2008) açık tohumlularda nadir olarak görülür (Jones ve ark., 2007). Kapalı tohumluların yaklaşık %70'inin poliploid olduğu tahmin edilmekte ve poliploid evrimin devam eden bir süreç olduğu bilinmektedir (Masterson, 1994; Fawcett ve Van de Peer, 2010). Günümüzde kapalı tohumlularda bilinen en yüksek ploidi seviyesi 80-ploidi (80x) Dam koruğu bitkisinde (*Sedum suaveolens* Kimnachii) gözlenmiştir (Otto ve Whitton, 2000).

Poliploidinin nedenleri ve sonuçlarının aydınlatılması son yıllarda birçok çalışmanın ortak noktası olmuştur (Soltis ve Soltis, 1999; Otto ve Whitton, 2000; Wolfe, 2001; Ramsey ve Ramsey, 2014). Bu çalışmalar, ekolojik, genetik ve evrimsel sonuçlarının yanı sıra sınıflandırma, frekans, orijin ve antik poliploid olaylar da dahil olmak üzere poliploidinin farklı yönleri hakkında geniş bir bilgi yelpazesi sunmuştur (Sattler ve ark., 2016).

Vejetatif olarak çoğaltılan süs bitkileri ve meyve türlerinin arasında çok sayıda poliploid bitki vardır. Bununla birlikte, poliploidi, angiospermlerde tüm cinslerde yaygın olarak bulunmaması ve potansiyel olarak oldukça yararlı sonuçları olmasından dolayı

ekonomik açıdan önemi olan bitkilerde son yıllarda yapay olarak uyarılmıştır (Dhooghe ve ark., 2011). Günümüz de asmada ploidi üzerine pek çok çalışma yapılmış olup haploid, diploid, tetraploid ve anöploid gibi farklı ploidi seviyelerine sahip genotipler elde edildiği bildirilmiştir**.**

2.3. Poliploidi Uygulamaları

Dermen (1964) tarafından, *Euvitis* ve *Muscadinia* üzümleri arasında yapılan melezlemelerde iki üzüm cinsinin kromozom sayılarının farklı oluşu nedeniyle ilk dönem ıslahçılarının başarısız oldukları belirtilmiştir. *Euvitis* ve *Muscadinia* üzümleri arasında melezleme sonucunda elde edilen 'N.C. 6-15', ve 'N.C.6-16' bireylerinin kolhisin uygulamaları sonucu elde edildiği ve bu melezlerin tamamen verimli olduğu kaydedilmiştir. Çalışmalar sonucunda geniş bir tetraploid gen havuzu oluşturulduğu ve bu bitkilerin bazılarında tane, salkım özelliklerinin ebeveynleriyle aynı özellikleri gösterdiği tespit edilmiştir. Elde edilen bireyler sayesinde *Euvitis* cinsi önemli üzüm çeşitlerinin hastalık zararlılara dayanımının, sıcak ve nemli bölgelere adaptasyonunun geliştirilebileceği bildirilmiştir.

Das ve Mukherjee (1967) tarafından, farklı kolhisin uygulamalarıyla asmada ploidi seviyesi arttırılmak istenmiş ve çalışma sonunda kullanılan 13 genotipten 11 tanesinde tetraploid bitki elde edilmiştir. Fide ve kışlık göz uygulamalarının pozitif sonuç verdiği, tohum ve kısa süreli kolhisin uygulamalarının ploidi seviyesini değiştirmediği kaydedilmiştir. Kotiledon aşamasındaki fidelere %0.2'lik kolhisin dozunun gün aşırı 3 defa uygulanmasının ploidi başarısını arttırdığı bildirilmiştir. Kışlık gözlere kolhisinin %5'lik gliserin içerisinde %0.25 ve %0.5' dozlarda günaşırı 3 defa uygulanmasının en iyi sonucu verdiği kaydedilmiştir. 'Beauty Seedless' üzüm çeşidinde %5 gliserin + %0.5 kolhisin uygulaması sonucunda %29.1 oranında tetraploid bitki oluştuğu bildirilmiştir. Tetraploid bitkilerin diploidlerine göre kuvvetli geliştiği tespit edilmiştir. Buna ek olarak tetraploid bitkilerin yapraklarında dişlilik miktarında artma olduğu ve yaprak alanıyla birlikte, yapraklarda kalınlaşma ve yaprak renginde koyulaşma, boğum aralarında kısalma ve kalınlaşma görüldüğü kaydedilmiştir.

Rasuli ve Sotudeh (2007) tarafından, 'Bidaneh' üzüm çeşidinde kolhisin uygulamaları ile ploidi uyarımı araştırılmıştır. Sürgünler iki göz üzerinden budandıktan sonra sürgün gelişimi her gün kontrol edilerek gözlerin uyanmaya başladığı dönemde %0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 0.9, 1.1 kolhisin konsantrasyonları 24, 48, 72 ve 96 saat süre ile pamukla emdirilerek gözlere uygulanmıştır. Uygulamadan 60 gün sonra yaprak örnekleri

alınarak stoma gözlemleri yapılmıştır. Verilerin analiz edilmesinden sonra %0.9 ve 1.1 kolhisin dozlarının 96 saat süre ile uygulanmasının 'Bidaneh' çeşidinde ototetraploidinin teşvikinde en iyi sonucu verdiği bildirilmiştir.

Kuksova ve ark. (1997) tarafından, asmada *in vitro* antimitotik uyarım etkinliği çalışılmıştır. *Vitis vinifera* kültür çeşidi 'Podarak Magaracha' yaprak eksplantlarından somatik embriyogenesis ile rejenerasyonun gerçekleştiği bildirilmiştir. Rejenere olan bitkilerin kök ucu hücrelerinde kromozom sayma işlemi gerçekleştirilmiş ve çalışılan 242 bitkiden 6 tanesi (%2.5) tetraploid (2n=4x=76) olarak teşhis edilirken kalan bitkiler diploid (2n=2x=38) olarak tanımlanmıştır. Bunlar arasında kimerik ve anöploid bitkilere rastlanılmadığı kaydedilmiştir. Gama ışını (5-100 Gy) uygulamasının tetraploid bitki oluşum sıklığını başlangıç kültüründe (%7) ve embriyonik kalluslar da (%7.6) arttırdığı ve anöploid bitki oluşumu tespit edilmiştir. Kolhisin uygulamalarının tetraploid bitki elde edilmesinde etkili olmadığı bildirilmiştir.

Karataş ve Kunter (2012) tarafından, 'Sultani Çekirdeksiz' ve 'Kalecik Karası' üzüm çeşitlerinde uyarılmış mutasyonunun etkileri sitolojik olarak belirlenmiştir. Sadece 'Sultani Çekirdeksiz' 30 Gy 34 nolu bireyde, gama radyasyonu uyarımı sonucu 2n'den daha fazla ploidi seviyesine sahip hücre yapısının gözlemlendiği kaydedilmiştir.

Notsuka ve ark. (2000) tarafından, diploid (29 adet), triploid (üç adet) ve tetraploid (bir adet) asma genotiplerinde *in vitro* koşullarda mikro çeliklere kolhisin uygulamaları yapılmıştır. Çalışmada %0.05'lik kolhisin dozunun 1 ya da 2 gün süreyle uygulanmasının tetraploidinin teşviki için uygun olduğu belirlenmiştir. Uygulama yapılan gözlerden süren sürgünlerde anormal yaprak tipi oluştuğu ve bunların bazılarının sitokimera (2x+4x)'lara dönüştüğü saptanmıştır. Diploid çeşitlerin kolhisine olan yanıtının farklı olduğu; tetraploid bitki elde etme bakımından *V. vinifera* genotiplerinin Amerikan hibritlerinden daha olumlu sonuç verdiği belirlenmiştir. Çalışma sonucunda tetraploid bitkilerin diğer formlara göre daha güçlü geliştiği, kolay köklendiği ve uzun yıllar bu yapısının değişmeden kaldığı, 3x+6x ve 4x+8x sitokimeraların dışarı aktarma süresince kaybolduğu ve sırasıyla triploid ve tetraploid kaynağına dönüşüm yaptıkları bildirilmiştir.

Ma ve ark. (2014) tarafından, 'Zaoheibao', 'Jingya', 'Zaomeigui' ve Guibao' poliploid üzüm çeşitlerinde poliploidi özelliklerinin tanımlaması çalışılmıştır. Diploid hibrit üzüm çekirdeklerine çimlenmenin ilk aşamasında gündüz sıcaklığının 25 ˚C ve gece sıcaklığının 20 ˚C olduğu kontrollü şartlarda 48-72 saat süreyle %0.6'lık kolhisin dozu uygulanmıştır. Çimlenme sonucu elde edilen bitkilerde morfolojik gözlemleri takiben L_1 ve L_2 tabakalarındaki meristematik hücrelerde kromozom sayımları

yapılmıştır. Kök ucunda yapılan kromozom sayımının ardından ebeveynleri 2n=2x=38 iken elde edilen bireylerdeki kromozomların 2n=4x=76 yapıda olduğu tespit edilmiştir. Polen ve stoma boyutları ile bekçi hücrelerdeki kloroplast sayısına göre tetraploid olduğu belirlenen üzüm genotiplerinin, çevresel şartlara adaptasyonlarının iyi ve hastalıklara dayanımlarının yüksek olduğu bildirilmiştir.

Chen ve ark. (2014) tarafından, geleneksel melezleme ıslahı ile kimyasalla uyarılmış mutasyon uygulamaları birleştirerek yeni bir ıslah stratejisi olarak çalışılmıştır. 'Guibao', 'Guibao' x 'Zaomeigui', 'Guibao' x 'Fenghuang 51' ve 'Guibao' x 'Jingfeng' melezlerinin diploid yapılı çekirdekleri çimlendirilerek, iki sıcaklık derecesinde (gündüz 25 ^{o}C'de gece ise 20 ^{o}C'de) kolhisinle muamele edilmiştir. Uygulamalardan sonra fideler araziye dikilmiş, morfolojik incelemeleri takiben, meristematik hücrelerden alınan kesitlerde kromozom sayımları yapılarak L_1, L_2 ve L_3 tabakalarının ploidi düzeyleri doğrulanmıştır. Bu yöntemin, melezleme ıslahıyla üretilmiş farklı genotipler de çoklu ıslah gruplarının seçilmesinde ve kimyasal antimitotikle poliploid yeni çeşitlerin geliştirmesinde kullanılabileceği bildirilmiştir. Kullanılan stratejinin, erken olgunlaşan tetraploid 'Zaoheibao' Avrasya çeşidinin (ploidi yapısal tipi 4-4-4) ıslahında başarıyla uygulandığı kaydedilmiştir.

Chang ve ark. (2010) tarafından, 'Victoria' üzüm çeşidinin sürgün eksplantları 24 veya 48 saat süreyle kolhisin çözeltisinde (%0.05 veya %0.1) bekletildikten sonra kültüre alınmıştır. Kromozom katlama için en iyi sonuç sürgün eksplantlarından alınan üçüncü ve dördüncü boğumların 48 saat %0.05'lik veya 24 saat %0.1'lik kolhisin çözeltisinde bekletilmesiyle elde edilmiştir. İlk jenerasyonda hücrelerin katlanma oranlarının sırasıyla %33 ve %31 olduğu ve kimeraların alt kültür yapılmasıyla poliploid hücre oranının yaklaşık %10 arttığı kaydedilmiştir. Kimeraların 4. ve 6. alt kültüründe poliploid hücre oranının %75.8-96.6 düzeyine ulaştığı bildirilmiştir. Kök uçlarında kromozom sayısının belirlenmesi için optimum örnekleme zamanının saat 9:30 olduğu belirtilmiştir.

Acanda ve ark. (2013) tarafından, 'Mencía' üzüm çeşidinde embriyonik süspansiyon kültürü ile somatik embriyogenesis çalışılmıştır. Somatik embriyo teşviki için, IAA, BA, 1 µM 2,4- D ve 4.5 µM TDZ (tidiazuron) büyüme düzenleyicilerinin dört kombinasyonu, Nitsch ve Nitsch makro ve mikro elementleri ve Murashige ve Skoog vitaminleri içeren sıvı besin ortamında embriyonik süspansiyon kültürü yapılmıştır. BA yerine TDZ kullanılmasıyla bu çeşit için önceden bildirilen seviyenin üstünde teşvik oranı sağlandığı ve diğer çeşitler için de önceki sonuçlara nispeten uyarım oranının arttığı bildirilmiştir. Bitkiye dönüşen somatik embriyolarda FC yöntemiyle yapılan analizde

ploidi seviyesi %5.6 oranında tetraploid olarak tespit edilmiştir. Diploid somatik embriyolardan gelişen bitkilerin çekirdek DNA içeriğinin, arazide yetiştirilen diploid bitkilerden daha düşük (%6.7) olduğu ve bu protokolün düşük seviyelerde somaklonal varyasyona neden olduğu bildirilmiştir.

Acanda ve ark. (2015) tarafından, 'Mencía' şaraplık üzüm çeşidinde süspansiyon kültüründe gelişen embriyonik hücre kümelerine kolhisin uygulanması ile tetraploidinin uyarıldığı etkin bir prosedür geliştirilmiştir. Kontrol ile kıyaslandığında kolhisin uygulamalarının embriyonik kallus kümelerinin embriyonik potansiyelini ve yaşama oranını önemli oranda azalttığı tespit edilmiştir. Kolhisin ile muamele edilmeyen bitkilerin kromozom sayılarının korunduğu, uygulama yapılmış eksplantlarda ploidi seviyesinin yüksek oranda varyasyon gösterdiği tespit edilmiştir. %0.2 kolhisin dozunun tetraploid bitkicik (% 25) eldesi için en etkili doz olduğu kaydedilmiştir. Çalışma boyunca kimerik ya da miksoploid bitkilere rastlanılmadığı belirtilmiştir. Yapılan çalışma yöntemiyle asma somatik embriyolarından kimerik bitki oluşmasının engellendiği sonucuna varılmıştır. Bu protokolün kullanılmasıyla asma genetik çeşitliliğinin artışının sağlandığı ve yöntemin çeşit geliştirmek için değerli bir araç olabileceği sonucuna varılmıştır.

Ekbiç ve Tangolar (2016) tarafından, 'Trakya İlkeren' ve 'Flame Seedless' üzüm çeşitlerinde kolhisin uygulamaları ile *in vivo* koşullarda poliploidinin uyarımı çalışılmıştır. Kolhisin uygulamaları %0.5, %0.75 ve %1'lik kolhisin çözeltisine batırılmış pamukların sürgün uçlarına 1, 3 ve 5 gün güreyle kapatılmasıyla yapılmıştır. 'Trakya İlkeren' çeşidinde %1; 'Flame Seedless' çeşidinde ise %0.75 ve %1 dozlarının sürgün uçlarının tamamının kurumasına neden olduğu saptanmıştır. Her iki çeşitte canlı sürgün ucu oranı açısından kontrole en yakın sonuçlar %0.5'lik kolhisin dozunun 1 ya da 3 günlük sürelerle uygulanmasından elde edilmiş; 'Trakya İlkeren' çeşidinde %0.75'lik dozun 3 ve 5 gün süreyle uygulanmasında ise canlılık oranlarının %50'nin altına düştüğü gözlenmiştir. Kolhisin uygulama doz ve sürelerinin artışına bağlı olarak her iki çeşitte yaprak alanı ve sürgün uzunluğu değerlerinde ve stoma sayısında azalma; stoma genişliği ve uzunluğunda artış saptanmıştır.

Kara ve ark. (2018a) tarafından, 41B anacı tek göz çelikleri sera koşullarında köklendirilerek hızlı büyümeye geçtikleri dönemin hemen başında farklı süre (24, 48, 72 ve 96 saat) ve dozlarda (%0.1, %0.3, %0.5, %0.7, %0.9 ve %1.1) kolhisin uygulamaları yapılmış ve poliploidi uyarımına yönelik etkileri incelenmiştir. Kolhisin uygulamalarının doz ve uygulama sürelerine göre morfolojik değişikliklere neden olduğu bildirilmiştir.

Stoma boyu, stoma genişliği ve stoma alanında artış stoma sayısında ise azalma tespit edilmiştir. Ancak (FC) analizlerinde sitolojik değişiklik tespit edilmemiştir. Sonuçta, 41B tek göz çeliklerinden oluşan sürgünlere farklı doz ve uygulama süreleriyle yapılan kolhisin uygulamaları sonucu farklılık olduğu düşünülen 240 adet materyalde FC analizine göre mitotik otoploid bitkilere ulaşılamadığı kaydedilmiştir. Bununla birlikte kolhisinle muamele edilmiş materyalde tespit edilen önemli morfolojik farklılıklar ve FC analizlerindeki sınırlı varyasyon nedeniyle materyalin gelişiminin takip edilmesi amacıyla araziye aktarılarak izlendiği bildirilmiştir.

Kara ve ark. (2018c) tarafından, farklı asma fidelerinde poliploidi uyarımına yönelik, apikal meristem bölgelerine farklı kolhisin (Kontrol, 1 g L^{-1}, 2 g L^{-1}, 3 g L^{-1}, 4 g L^{-1}, 5 g L^{-1}, 6 g L^{-1}) dozları uygulanmıştır. Morfolojik ve sitolojik parametreler, poliploidizasyon işlemlerinden 16 hafta sonra değerlendirilmiştir. Tetraploid uyarımı için test edilen üzüm genotiplerinde morfolojik ve sitolojik analizler sonucunda asma fidelerinin ebeveynleri gibi 2n = 2x = 38 yapıda olduğu ve kolhisin kaynaklı mutasyonun başarısız olduğu belirlenmiştir. Diğer taraftan 5 g L^{-1} uygulaması yapılmış 'Trakya İlkeren' çeşit fidelerinde anöploid (2n = 2x = 40) bitki olduğu tespit edilmiştir. Üzüm genotiplerinin genom katlaması için kolhisin uyarımına neredeyse hiç cevap vermediği bildirilmiştir.

Özalp ve ark. (2018), tetraploid hatların elde edilmesi amacıyla 'Michele Palieri' sofralık üzüm çeşidi fidelerinde kotiledon aşamasında 4 farklı kolhisin (%0.3, %0.6, %0.9, %1.2) uygulamasının etkilerini belirlemişlerdir. Uygulamalar sonrasında sürgün ucunda kuruma olmadığı ve canlılık oranlarının %100 olduğu belirlenmiştir. Kolhisin uygulamalarının sürgün uzunluğunu değişen oranlarda etkilediği kaydedilmiştir. FC incelemeleri sonucunda tüm örneklerde diploid yapının korunduğu, kolhisin uygulamalarının kromozom sayısında değişiklik meydana getirmediği tespit edilmiştir. Örneklerin DNA içeriklerinin 1.00 pg diploid (2n) büyüklüğünde olduğu belirlenmiştir.

2.4. Poliploidinin Tespiti

Ploidi seviyesinin arttırılması, ploidinin uyarılması, başarı oranının ölçülmesi ve doğrulama süreçlerini içermektedir. Uyarma aşaması, ortam, mitozu önleyen etken, doku tipi, uygulama süresi ve konsantrasyonları olmak üzere çok sayıda değişkene bağlıdır. Poliploidi başarısının ölçülmesi ve sonuçların doğrulanmasında, kromozom sayımı, flow

sitometri analizi ve alternatif olarak morfolojik gözlemlerden faydalanılmaktadır (Dhooghe ve ark., 2011).

Bitkilerde stoma iriliği ve birim alanda bulunan stoma sayısı ile ploidi düzeyi arasında ilişki bulunmaktadır (Sattler ve ark., 2016).

Yamane ve Kurihara (1980) tarafından, 'Neo Muscat' ve 'Thompson Seedless' üzüm çeşitlerinde tomurcuklar %0.2'lik kolhisin çözeltisinde bekletilerek sırasıyla dört ve üç adet tetraploid bitki genotipi elde edilmiştir. 'Neo Muscat' çeşidinden elde edilen tetraploid bitkilerin stoma büyüklüğünün diploidlerden %40 oranında daha büyük, 1 mm^2 alandaki stoma sayısının ise diploid bitkilerle karşılaştırıldığında yaklaşık %40 oranında daha az olduğu belirlenmiştir.

Boso ve ark. (2016) tarafından, *Vitis* türleri arasındaki stoma yoğunlukları karşılaştırılmıştır. Çalışmada, 12 üzüm çeşidinde, doğrudan bir üretici melezinde (DPH) ve *V. vinifera* olmayan SO4 ve 110 R anaçlarında, yaprakların alt epidermisindeki stoma yoğunluğu ve boyutu incelenmiştir. En yüksek stoma yoğunlukları 'SO4', 'Chasselas Dorée', 'Albariño' ve 'Cabernet Sauvignon' genotiplerinde belirlenirken en düşük stoma yoğunluğu 'Castañal', 'Torrontés', 'Caiño Blanco' ve 'Jacquez' (DPH) çeşitlerinde tespit edilmiştir. Diğer tüm incelenen çeşitler arasında en yüksek stoma uzunluğu ve genişliği 'Treixadura' ve 'Caiño Blanco' çeşitlerinde tespit edilmiş, en kısa ve dar stomalar 'Jacquez' (DPH) çeşidinde belirlenmiştir. Çeşitlerin yaprak boyutları ile stoma uzunluğu veya genişliği arasında herhangi bir ilişki tespit edilememiştir. İncelenen değişkenler ve *vinifera'*ya ait olma durumu arasında da herhangi bir bağlantı tespit edilmedi bildirilmiştir.

Yang ve ark. (2006) tarafından, asmalarda diploid somatik embriyolara 10 ve 20 mg L^{-1} kolhisin konsantrasyonları 1, 2 ve 3 gün aralıklarla uygulanmış ve uygulamalar sonucunda elde edilen bitkilerde ploidi seviyesi stoma gözlemleri ve FC analizleriyle kontrol edilmiştir. Stoma uzunluğu diploid genotipler de 26.2 µm tetraploid genotipler de ise 36.6 µm olarak tespit edilmiştir. Diploid genotiplerin stoma genişliği değeri 18.4 µm olarak belirlenirken tetraploid genotiplerin stoma genişliği 26.6 µm olarak kaydedilmiştir. Birim alana (1 mm^2) alana düşen stoma sayısı diploid genotiplerde 187.2 adet mm^{-2}, tetraploid genotiplerde ise 160.6 mm^{-2} olarak tespit edilmiştir.

Kunter ve ark. (2015), 'Kalecik Karası', 'Sultani Çekirdeksiz' ve 'Uslu' üzüm çeşitlerinde iyonize radyasyon uygulamaları sonucunda elde edilmiş kimerik genotiplerde stoma yoğunluğu, büyüklüğü ve yapısal özellikleri incelemişlerdir. İyonize radyasyon uygulamalarının stoma yoğunluğu ve büyüklüğü üzerindeki etkisi önemli

bulunmuştur. Kimerik yapılı bitkilerde stoma yoğunluğunun kontrole göre azalış gösterdiği kaydedilmiştir. 'Kalecik Karası', 'Sultani Çekirdeksiz', 'Uslu' çeşitlerinde stoma yoğunluklarının sırasıyla 158.64-115.38, 209.12-151.43, 201.91-151.43 adet/mm^2 arasında değiştiği tespit edilmiştir. Kimerik bitkilerde genel olarak stomaların epidermise gömülü olduğu gözlenmiştir.

Kromozom sayımı, hücreler içindeki gerçek kromozom sayısının belirlenmesini sağlar dolayısıyla analizler içinde en kusursuz, en eksiksiz olanıdır, ancak sitogenetik teknikler zahmetlidir ve türlere göre özel protokoller gerektirmektedir. Hücrelerin etkili bir şekilde boyanması ve mikroskobik olarak görselleştirilmesi gerektiğinden, yöntem zaman alıcı ve emek yoğunluğu gerektirmektedir. Özellikle çok küçük boyutlu kromozomlar sayılırken, hücrelerin 3 boyutlu yapıları nedeniyle kromozom sayımlarında yanlışlıklar yapılabilmektedir (Ochatt ve ark., 2011).

Asmada kromozom araştırmaları 1920'lerin sonunda başlamıştır. Kromozom sayısının belirlenilmesi üzerine odaklanılması, Olmo (1937) tarafından *Vitis vinifera* 'da kromozom sayımları ile başlamıştır ve şu ana kadar, kendiliğinden ortaya çıkabilen veya uyarılmış kromozom katlanmasının kromozom değişimlerine etkilerinin belirlenmesiyle ilgili olarak devam etmiştir. *Vitis* türlerinin kromozom sayısının çok olması yanında (2n=38), kromozom boyutlarının küçük olması araştırmacılara güçlük çıkartmaktadır (Kuksova ve ark., 1997; Pierozzi ve Moura, 2016; Castro ve ark., 2018). Karyotip analizleri *Vitis* ve *Muscadinia* cinslerinin, üç temel kromozom kümesine sahip eski poliploidler olduğuna dair ipuçları sağlamıştır. Bu kombinasyonlar, *Vitis* 'de (6 + 7) + 6 = 19 iken *Muscadinia*'da 6 (7) + 7 = 20 şeklindedir (Jaillon ve ark., 2007; Cattonaro ve ark., 2014).

Diğer taraftan, flow sitometri (FC) kromozom sayısı bakımından çok az araştırmanın yapıldığı bir bitkinin kromozom sayısı belirlenemediğinde, ploidi düzeyinin belirlenmesi için son derece etkili bir yöntemdir. FC analizi, DNA içeriğindeki bir artışın kromozom sayısındaki artışlara karşılık geldiği varsayılarak, göreceli veya mutlak DNA içeriği ile korelasyonla, ploidi düzeyi belirlenmektedir. Bilinen ploidi düzeyine sahip bir örneğin DNA içeriği, analiz edilen numunenin ploidi düzeyini belirlemek için bir standart olarak kullanılır (Ochatt ve ark., 2011; Tuna, 2014).

Xie ve ark. (2015) tarafından, asma anacı 101-14 Millardet et de Grasset (*Vitis riparia* x *V. rupestris*) (101-14 Mgt) (2n = 2x = 38) x *Muscadinia rotundifolia cv. Trayshed* (2n = 2x = 40) melezlerinde *in vitro* koşullarında tetraploidinin uyarılması için bir protokol oluşturmaya çalışılmıştır. Farklı eksplant kaynakları, kolhisin ve orizalinin 3

farklı dozu ile 24, 48 ve 72 saat süre ile muamele edilmiştir. Kolhisin ile muamele edilmiş, sürgün uçları, anterler ve pre-embriyonik kültürlerde gelişen bitkilerde ploidi kromozom sayımları ve FC analizleriyle belirlenmiştir. Stoma gözlemlerinin (stoma boyutu ve sayıları, bekçi hücrelerdeki kloroplast sayıları) ve ploidi seviyesi ile korelasyon gösterdiği kaydedilmiştir. Stoma bekçi hücrelerindeki kloroplast sayılarının kromozom sayımı ve FC ölçümlerine göre kolaylıkla yapıldığı ve analizlerin yapılabilmesi için gereken iş gücünü azalttığı belirtilmiştir.

Chen ve ark. (2009) tarafından, 'Red Globe' üzüm çeşidi sürgünlerinden son yıllarda geliştirilen yeni genotipin ploidi yapısının tespiti amacıyla stoma bekçi hücrelerinin boyutu ve bu hücrelerdeki kloroplast sayılarının belirlenmesi için ölçüm ve sayımlar yapılmış aynı zamanda kök ucu hücrelerinde kromozom sayımları ile yapılan gözlemler desteklenmiştir. Yeni 'Red Globe' genotipinde stoma bekçi hücrelerinin 'Red Globe' üzüm çeşidinden biraz daha uzun ve genişliğinin ise daha dar olduğu, ebeveyn ve yeni genotipte stoma bekçi hücrelerinin kloroplast sayılarının sırasıyla 10.63 ve 11.35 olduğu belirlenmiştir. Stoma bekçi hücrelerinde hem kloroplast sayıları hem de boyutunda önemli bir farklılık olmadığından yeni genotipin L_1 katmanının diploid olduğu bildirilmiştir. Yeni genotip ve ebeveyn 'Red Globe' polen tanelerinin büyüklüğünün sırasıyla 35.46 ve 33.03 µm olduğunu ve polen tanelerinin genişliğinin de sırasıyla 22.95 ve 18.04 µm olduğu bildirilmiştir. Yeni genotipin polen tanelerinin uzunluk ve genişliğinde önemli bir uzunluk farkı olduğu ve bu yüzden yeni genotipin L2 yapısının ploidi seviyesinin tetraploid olduğu sonucuna varılmıştır. Yeni genotipin kök ucu hücrelerindeki kromozom sayısının 2n=4x=76, 'Red Globe' üzüm çeşidinin 2n=2x=38 olduğu ve bu sonuca dayanarak 'Red Globe' üzüm çeşidi yeni genotipinin L_3 yapısında ploidi seviyesinin tetraploid olduğu belirtilmiştir.

Prado ve ark. (2010) tarafından, otokton 6 İspanyol üzüm (*Vitis vinifera* L.) çeşidinde somatik embriyogenesis ile elde edilen bitkilerin ismine doğruluğu FC ve mikrosatellit analizler ile test edilmiştir. 'Merenzao' çeşidi dışında test edilen tüm çeşitlerden somatik embriyogenesis yoluyla tetraploid bitkilerin elde edildiğini, ayrıca 'Albarin˜o' çeşidinde bir oktoploid bitki ve 'Torronte´s' çeşidinden de miksoploid iki bitki elde edildiği bildirilmiştir. Ploidi seviyelerindeki farklılığın somaklonal varyasyon kaynaklı olduğu sonucuna varılmıştır. En yüksek poliploidi oranı (%28.57) 'Brancellao' çeşidinde belirlenirken, çeşidin arazideki ana bitkilerinin %50'sinin miksoploid olduğu bildirilmiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Çalışma 2016-2018 dönemlerinde Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü uygulama serası ve laboratuvarlarında yürütülmüştür. Denemede Konya ili Hadim ilçesinden ve Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü gen koleksiyonundan elde edilen 'Trakya İlkeren', 'Ekşi Kara' ve 'Gök Üzüm' çeşitlerinin tohumları, tek göz çelikleri ve mikro çelikleri kullanılmıştır. *In vivo* ve *in vitro* koşullarda farklı eksplant kaynaklarına farklı doz ve sürelerde kolhisin uygulamaları yapılmış ve uygulamaların poliploidi başarısına etkileri tespit edilmiştir. Flow sitometri (FC) yöntemi ile sitolojik analiz de Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü Laboratuvarlarında yapılmıştır.

3.1. Materyal

Çalışmada kullanılan 'Trakya İlkeren', 'Ekşi Kara' ve 'Gök Üzüm' ve 'Kyoho' üzüm çeşitlerinin özellikleri aşağıda açıklanmıştır.

3.1.1. '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 adapte olmuştur. Üzerinde klon seleksiyonu ve diğer ıslah çalışmaları halen devam etmektedir (Kara, 2015). Popülasyonda farklı tipleri kabul edilmekle birlikte tarafımızdan yapılan çalışmalarda bu farklılıkların, çeşidin döllenme biyolojisine bağlı olduğu anlaşılmıştır. 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. Bölgede, üretici bağlarında salkım ve tane boyutları, boncuklanma oranı, tane gelişimi, çiçeklenme dönemindeki hava koşulları ile bal arısı aktivitesine bağımlı tozlanmayla yakından ilişkilidir. Keselenerek kendine tozlanan çiçek salkımlarında çekirdekli tane bağlama olmaz. Üretici bağlarından alınan polen örnekleri canlılık oranı %90'ı geçerken çimlenme oranları %3'ten az bulunmuştur. Ekşi Kara üzümü sofralık, kurutmalık ve şıralık olarak değerlendirilmektedir. Natürel kuru üzüm çerezlik olarak pazarlanırken döllenme kusuruna bağlı partenokarpik taneleri kuş üzümü (kişniş) olarak pazarlanmaktadır. 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 (Kara ve Ecevit, 1998; Kara ve ark., 2002; Kara ve ark., 2016a; Kara ve ark., 2017a).

3.1.2. 'Gök Üzüm'

Konya ili Hadim ve Bozkır ilçelerinde yetiştiriciliği yoğun olarak yapılan 'Gök Üzüm', 'Ekşi Kara' çeşidinin tozlanmasında kullanılan en önemli çeşit niteliğindedir (Kara ve ark., 2016b; Kara ve ark., 2017a; Kara ve ark., 2017b). 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, narin 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 çıkmaktadır (Kara ve ark., 2003; Kara ve ark., 2016b).

3.1.3. 'Trakya İlkeren'

'Alphonse Lavallée' x 'Perlette' melezidir. 1993 yılında tescil edilen çok erkenci sofralık çeşitler arasındadır. Omuzlu salkımları iri (450 g), taneleri orta iri (4.7 g) mavi-siyah renkli, yuvarlak şekilli, etli suludur. Erkenci niteliği ile öne çıktığı gibi Hadim ve Bozkır gibi 1500 m ve üzerinde kısa vejetasyonlu alanlarda denenmektedir. Yörede çeşitle ilgili elde edilen tecrübeler olumludur (Kara ve Demirhan, 2005). Konya bağ alanlarında son yıllarda denenen çeşitlerden en çok dikkati çekenler arasındadır (Kara, 2014).

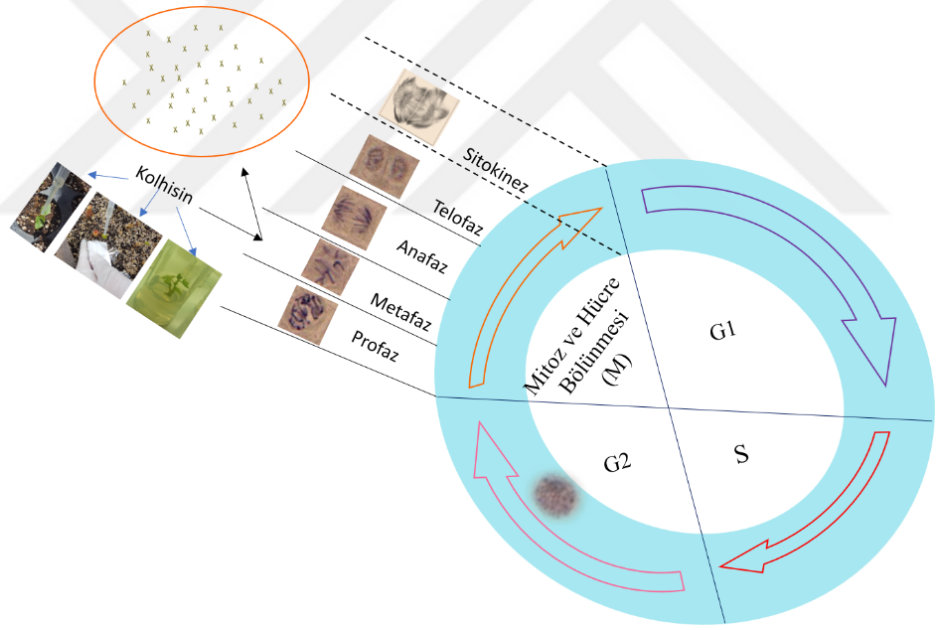
3.1.4. 'Kyoho'

1945 yılında Y. Ohinoue, tarafından 'Ishihara wase' ve 'Centennial' melezlemesi sonucunda elde edilmiştir (Yamane, 1996). 'Ishihara wase' ve 'Centennial' çeşitleri sırasıyla 'Campbell Early' (*V. labruscana*) ve 'Razakı' (*V. vinifera*) çeşitlerinden meydana gelen tetraploid somatik mutantlardır (Kunter ve Karataş, 2011; Yamada ve Sato, 2016). 'Kyoho', taneleri iri (12 ila 14 g) ve mor renkte ve foxy aromasına sahiptir. Tanelerde tam olgunluk döneminde çatlama görülebilir. Taneleri kısa raf ömrüne sahiptir. Hastalıklara dayanımı orta derecedir (Yamada ve Sato, 2016). Çalışmada

kloroplast sayımlarında, kolhisin uygulamaları yapılmış bitki materyallerinin kloroplast sayılarının karşılaştırılması amacıyla tetraploid kontrol olarak kullanılmıştır.

3.1.5. Kolhisin

Çalışılan üzüm çeşitlerinde kromozom katlaması amacıyla kolhisin kullanılmıştır. Kolhisin ($C_{22}H_{25}O_6$), çayır safranı veya güz çiğdemi bitkisinin (*Colchicum autumnale* L.) tohum veya yumrusundan elde edilen bir alkoloiddir. Mitoz bölünmenin metafaz aşamasında α ve β tübülin dimerlerine bağlanarak iğ oluşumunu önlemekte bu sayede poliploidiyi teşvik etmektedir. (Şekil 3.1) (Planchais ve ark., 2000). Kolhisinin bitki tübülinlerine afinitesi, hayvan hücresi tübülinlerine göre daha düşüktür (Dhooghe ve ark., 2011). Bitkilerde düşük (0.5 mM <doz) dozlarda bile etkilidir (Allum ve ark., 2007). Bu çalışmada, Sigma-Aldrich firmasından temin edilen kolhisin kullanılmıştır. Kolhisin, % 1 Dimetilsülfoksit (DMSO) dozu kullanılarak çözülmüştür (Yang ve ark., 2006).



Şekil 3.1. Kolhisin uygulamasının hücre döngüsündeki etkileri (İnterfaz: G1+S+G2) Planchais ve ark. (2000)'e göre revize edilmiştir.

3.2. Yöntem

3.2.1. Kotiledon aşamasında bitkilere birinci yıl kolhisin uygulamaları

Poliploidi teşviki için; Hadim ilçesinden hasat edilen 'Ekşi Kara', 'Gök Üzüm', 'Trakya İlkeren' çeşitlerinden ve Bahçe Bitkileri bölüm koleksiyonundan elde edilen

çekirdekler kullanılmıştır (Şekil 3.2). Çeşit çekirdekleri çimlenmeyi erkene almak amacıyla +4 °C'de 90 gün süre ile katlama işlemine (Sabır ve Kara, 2011) tabi tutulmuştur. 21.02.2016 tarihinde tohumlar çıkartılıp çeşme suyunda temizlendikten sonra sera koşullarında 2:1 torf:perlit karışımı içeren viyollere (32 gözlü) ekilmiştir (Şekil 3.3).



Şekil 3.2. 'Ekşi Kara' (a), 'Trakya İlkeren' (b) 'Gök Üzüm' (c) çeşit çekirdekleri



Şekil 3.3. Sera koşullarında çekirdeklerin viyollere ekilmesi

Çimlenen bitkilerin sürgün ucu meristem bölgesine günde 2 defa olmak üzere (08:30 ve 18:00 saatlerinde) takip eden üç gün boyunca yedi farklı kolhisin dozu (1 g L^{-1}, 2 g L^{-1}, 3 g L^{-1}, 4 g L^{-1}, 5 g L^{-1}, 7.5 g L^{-1}, 10 g L^{-1}) birer damla damlatılmıştır (Şekil 3.4). Kontrol bitkileri sadece saf su ile muamele edilmiştir (Jaskani ve ark., 2005; Chen ve ark., 2014; Ma ve ark., 2014; Sattler ve ark., 2016). Uygulamalar tesadüf parselleri deneme planına göre 3 tekerrürlü ve her tekerrürde 20 adet fide olacak şekilde düzenlenerek yapılmıştır.



Şekil 3.4. Meristematik bölgeye kolhisin uygulamasının yapılışı

3.2.2. Kotiledon aşamasında bitkilere ikinci yıl kolhisin uygulamaları

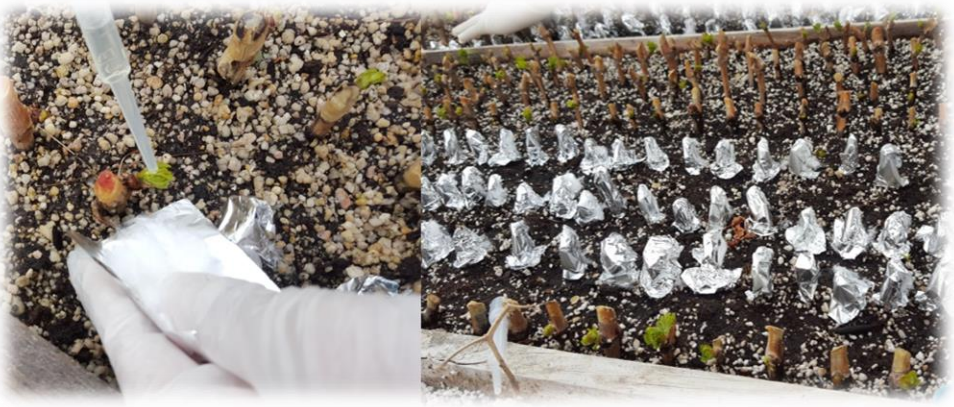
İlk yıl denemelerinde çekirdeklerde çimlenmenin az oluşu ve bazı dozlarda kurumanın çok olması nedeniyle. İkinci yıl işlemler tekrar edilip kolhisin dozlarında değişiklik yapılmıştır. Çimlenen bitkilerin sürgün ucu meristem bölgesine günde iki defa olmak üzere (08:30 ve 18:00 saatlerinde) takip eden üç gün boyunca altı farklı kolhisin dozu (1 g L^{-1}, 2 g L^{-1}, 3 g L^{-1}, 4 g L^{-1}, 5 g L^{-1}, 6 g L^{-1}) birer damla damlatılmıştır. Kontrol bitkileri sadece saf su ile muamele edilmiştir (Jaskani ve ark., 2005; Chen ve ark., 2014; Ma ve ark., 2014; Sattler ve ark., 2016). Uygulamalar tesadüf parselleri deneme planına göre 3 tekerrürlü ve her tekerrürde 20 adet fide olacak şekilde düzenlenerek yapılmıştır.

3.2.3. Tek göz çeliklerine kolhisin uygulamaları

'Ekşi Kara', 'Gök Üzüm' ve 'Trakya İlkeren' çeşitlerinde tek göz çeliklerinde kışlık gözlerde tomurcukların patlamasından kısa bir süre sonra hızlı gelişme dönemindeyken 2.5 g L^{-1}, 5 g L^{-1}, 7.5 g L^{-1} kolhisin dozları 48 ve 72 saat sürelerle pamukla emdirilerek uygulanmıştır. Kontrol bitkilerine sadece saf su ile uygulama yapılmıştır. Uygulama sonrası saf su ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Uygulamalar tesadüf parselleri deneme planına göre 3 tekerrürlü ve her tekerrürde 15 adet kışlık göz olacak şekilde düzenlenerek yapılmıştır (Şekil 3.5, Şekil 3.6, Şekil 3.7).



Şekil 3.5. Hadim yöresinden getirilen çubuklardan tek göz çeliği hazırlanması ve hazırlanan tek göz çeliklerine nem kaybını önlemek amacıyla parafin uygulanması



Şekil 3.6. Hızlı gelişme dönemindeyken kolhisin uygulamasının yapılışı



Şekil 3.7. ‘Trakya İlkeren’ üzüm çeşidinde kolhisin uygulamaları sonrası gelişme durumu

3.2.4. *In vivo* sürgün ucu kolhisin uygulamaları

Tek göz çeliklerine kolhisin uygulanması aşamasında çeliklerde gelişmenin çok yavaş olması nedeniyle sürgün ucu aşamasında kullanılacak çeliklere 50 °C ‘de 30 dk. termoterapi uygulaması yapılmıştır (Waite ve Morton, 2007). Sürgün ucuna kolhisin uygulamaları Ekbiç ve Tangolar (2016) tarafından yapılan uygulamalar modifiye edilerek uygulanmıştır. Sera koşullarında ‘Ekşi Kara’, ‘Gök Üzüm’ ve ‘Trakya İlkeren’ çeşitlerinin sürgünleri aktif büyüme dönemi içerisindeyken tüm uygulama gruplarında 15 cm üzerinden sürgün uçları budama makası ile kesilmiştir. Koltuk sürgünlerinin sürmeye başladığı dönemde sürgün uçları 3 farklı (2.5 g L^{-1}, 5 g L^{-1}, 7.5 g L^{-1}) kolhisin dozuna 24-48 saat süreyle günde 3 defa (sabah, öğle ve akşam) olmak üzere daldırılarak uygulama yapılmıştır. Kontrol bitkilerine sadece saf su ile uygulama yapılmıştır. Uygulama sonrası

saf su ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Uygulamalar tesadüf parselleri deneme desenine göre 3 tekerrürlü ve her tekerrürde 10 adet sürgün ucu olacak şekilde yapılmıştır.

3.2.5. *In vitro* kolhisin uygulamaları

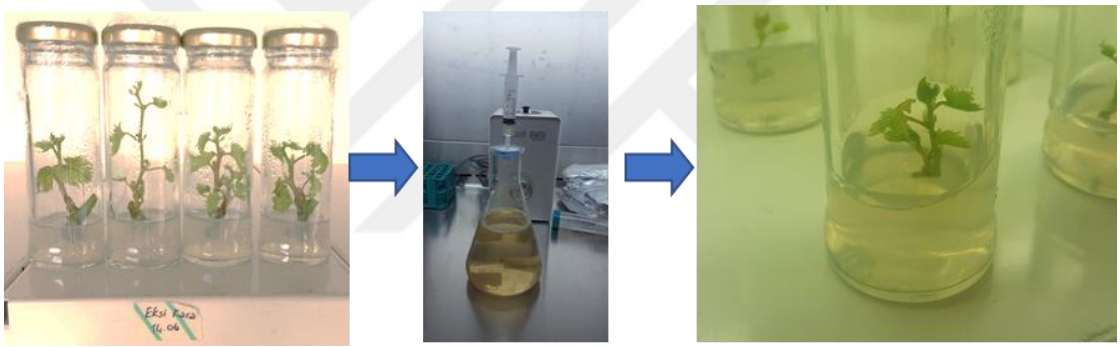
Ekşi Kara', 'Gök Üzüm', 'Trakya İlkeren' çeşitlerinde kolhisin uygulamaları öncesinde temiz materyal elde etmek amacıyla aktif dönemde eksplant alma (Şekil 3.8) işlemi gerçekleştirilmiştir (Gray ve Benton, 1991; Di Genova ve ark., 2014). 'Ekşi Kara', 'Gök Üzüm', 'Trakya İlkeren' çeşitlerinden alınan sürgünler yaprakları kesilerek tek boğum içeren mikro çelikler halinde hazırlanmıştır. Boğumlar laboratuvarda ilk aşama olarak akan çeşme suyu altında 30 dakika bekletilmiş ve daha sonra yüzey sterilizasyonu işleminden geçirilmiştir. Yüzey sterilizasyonu için boğumlar ilk olarak %70'lik etanol içinde 2 dakika bekletilmiştir. Etil alkolden çıkartılan eksplantlar, %12'lik Sodyum hipoklorit (NaOCl) çözeltisinde 15 dakika süreyle tutulup, devamında 3 kez saf su ile çalkalanarak (hava akışlı steril kabinde) yıkandıktan sonra Murashige Skoog (MS) ortamı içeren kavanozlara yerleştirilmiştir (Murashige ve Skoog, 1962). MS ortamına %3 sükroz ve %0.7 agar eklenmiştir. Başlangıç aşamasında ve sürgün oluşturma aşamasında 'Trakya İlkeren' çeşidi için 1 mg L^{-1}, 'Ekşi Kara' ve 'Gök Üzüm' çeşitleri için 0.8 mg L^{-1} BAP ilave edilmiştir. Besin ortamının pH'sı 5.8 olarak ayarlanarak, 121 °C'de 15 dakika süreyle otoklavda tutulmak suretiyle sterilizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir (Singh ve ark., 2000). Kültüre alınan eksplantlar, 25±1°C olarak kontrol edilebilen iklim odasında 3000 lüks m^{-2} aydınlatma şiddetinde ışık kaynağı olan raflara konularak, 16 saat aydınlık 8 saat karanlık foto periyotta geliştirilmiştir (Notsuka ve ark., 2000).



Şekil 3.8. Eksplantların laboratuvar ortamına getirilmesi

Kültüre alınan eksplantların çoğunda materyal alınan bölgeye bağlı olarak bakteri oluşumu görülmüştür. Bunu önlemeye yönelik olarak ortama 0.25 mg L^{-1} dozunda geniş spektrumlu antibiyotik ilave edilmiştir (Thomas ve Prakash, 2004; Oliveira ve ark., 2010; Mbah ve Wakil, 2012).

Köklendirme aşamasında MS besin ortamına, kök oluşumunu uyarıcı etkiye sahip olmasından dolayı 1 mg L^{-1} IBA ilave edilmiştir. Kolhisin dozları (10 mg L^{-1}, 20 mg L^{-1} ve 30 mg L^{-1}) köklenme aşamasında besin ortamına ilave edilerek uygulanmıştır. Deneme tesadüf parselleri deneme desenine göre 3 tekerrürlü ve her tekerrürde 20 mikro çelik olacak şekilde kurulmuştur. Kolhisin DMSO'in 60 °C'de bozulmasından dolayı sterilizasyondan sonra besin ortamı jel kıvamına gelmeden hemen önce "Sartarius Minisart NML" marka 0.2 mikrometre çapında filtre ile sterilize (Şekil 3.9) edilerek ilave edilmiştir. Aynı şekilde geniş spektrumlu antibiyotik ilavesi de besin ortamı jel kıvamına gelmeden önce yapılmıştır (Mbah ve Wakil, 2012).



Şekil 3.9. Kolhisinin sterilize edilerek ortama ilavesi

Köklenme gerçekleştikten sonra bitkiciklerin dış koşullara aktarımı yapılmıştır (Şekil 3.10). Bitkiciklerin kök bölgesi ılık suda besin ortamından temizlendikten ve fungusitle muamele edildikten sonra, içlerinde eşit oranda steril torf ve perlit ile hazırlanmış harç bulunan polietilen bardaklara dikilmişlerdir. İlk aşamada üzerleri bardakla kapatılmıştır. 2-3 günde bir bardak üzerindeki delik sayısı arttırılmıştır. Bitkiler dış ortama alıştıktan sonra sera koşullarına aktarımı gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.10. Köklenen bitkilerin dış koşullara alıştırılması

3.3. Ploidi Düzeyinin Belirlenmesi

3.3.1. Sürgün ucu canlılık oranı (%)

Kolhisin uygulaması yapılan bitkilerin sürgün uçlarında, canlı sürgün uçları sayısının uygulama yapılan tüm bitkilerin sürgün uçları sayısına oranlanması ile belirlenmiştir [(Şekil 3.11), (Kara ve ark., 2018a)].



Şekil 3.11. Kotiledon aşamasında ve tek göz çeliklerine kolhisin uygulamalarında sürgün ucu zararlanmaları

3.3.2. Sürgün uzunluğu (cm)

In vivo koşullarda kolhisin uygulamaları yapılmış bitkilerde**,** vejetasyon sonunda cetvel ve şerit metre ile uygulama noktasının üzerinden 'cm' cinsinden ölçülerek tespit edilmiştir [(Şekil 3.12), (Kara ve ark., 2018a)].



Şekil 3.12. Kotiledon aşamasında uygulama yapılmış bitkilerde sürgün uzunluğunun ölçülmesi

3.3.3. Sürgün çapı (mm)

In vivo koşullarda kolhisin uygulamaları yapılmış bitkilerde**,** vejetasyon sonunda dijital kumpas ile sürgün üzerinde üçüncü ve dördüncü boğumdan mm cinsinden ölçülerek tespit edilmiştir [(Şekil 3.13), (Sabır ve Kara, 2011; Kara ve ark., 2018a)].



Şekil 3.13. Sürgün çapı ölçümü

3.3.4. Stoma gözlemleri [stoma yoğunluğu (adet mm^{-2}), stoma genişliği (µm), stoma uzunluğu (µm)]

3.3.4.1.Yaprak epidermal izinin çıkartılması

Yaprak epidermal izleri *in vivo* koşullarda birinci yıl elde dilen bitkilerde uçtan dördüncü yaprağın abaksiyal tarafında üç farklı bölgeye şeffaf oje uygulanmasıyla elde edilmiştir (Şekil 3.14). Alt epidermis sıyrılıp lam üzerine yerleştirilerek örneklerde stoma genişliği ve uzunluğu, x 40 büyütmeli objektif ve x 10 büyütmeli oküler mikro metre gözlemine bağlı olarak belirlenmiştir (Moghbel ve ark., 2015). İkinci yıl verilerinde kloroplast sayımında kullanılan yöntem (Yuan ve ark., 2009) kullanılarak stoma ölçümleri yapılmıştır.



Şekil 3.14. Yaprak epidermal izinin çıkartılması

3.3.5. Canlılık oranı (%)

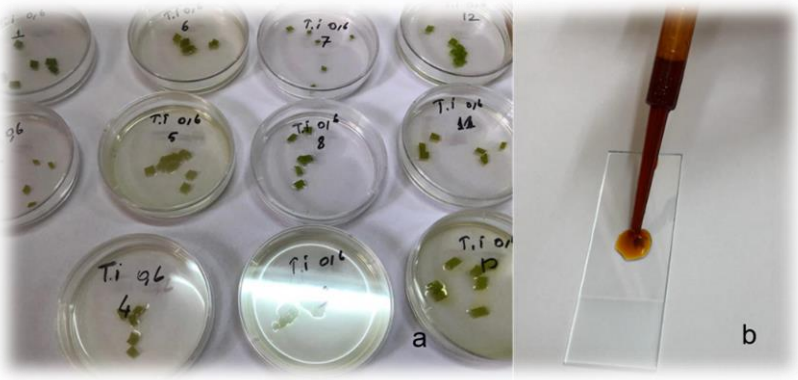
In vitro koşullarda köklendirme aşamasında 10 mg L^{-1}, 20 mg L^{-1}, 30 mg L^{-1} dozlarında kolhisin uygulaması yapılmış mikro çeliklerde canlılık oranı, yaşayan mikro çeliklerin aktarılan mikro çeliklere oranlanması ile (%) belirlenmiştir (Tepe ve ark., 2002; Sinski ve ark., 2014).

3.3.6. Gelişme oranı (%)

In vitro koşullarda köklendirme aşamasında 10 mg L^{-1}, 20 mg L^{-1}, 30 mg L^{-1} dozlarında kolhisin uygulaması yapılmış mikro çeliklerde gelişme oranı, sürgün oluşturan ve köklenerek gelişmesine devam eden mikro çeliklerin canlı mikro çeliklere oranlanması ile (%) belirlenmiştir (Tepe ve ark., 2002; Sinski ve ark., 2014).

3.3.7. Kloroplast sayımı (adet stoma^{-1})

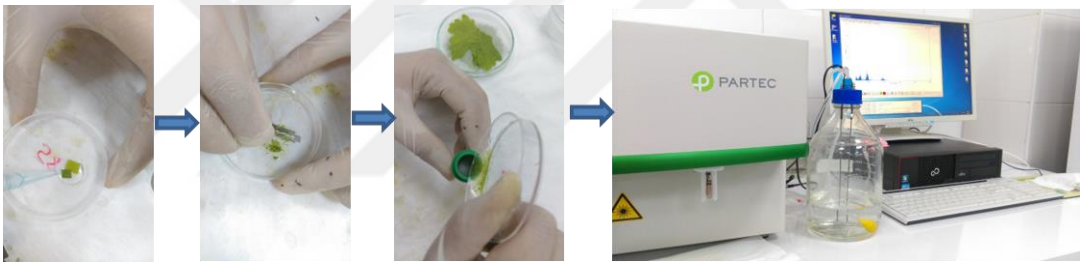
In vivo ve *in vitro* koşullarda kolhisin uygulaması yapılmış bitkilerin hepsinde kloroplast sayımı yapılmıştır. Stoma bekçi hücrelerindeki kloroplast sayısı uçtan dördüncü yapraklardan alınan yaprak kesitlerinde sayılmıştır. İlk olarak, taze yaprakların Carnoy solüsyonunda (3 kısım etil alkol: 1 kısım 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 (Şekil 3.15). Her örnekte 30 adet stomada kloroplast sayımı yapılmıştır. Kloroplast sayısı mikroskopta × 400 kat büyütülerek sayılmıştır (Yuan ve ark., 2009). Kolhisin ile muamele edilen örneklerin kloroplast sayısı tetraploid (4x) 'Kyoho' üzüm çeşidi ile karşılaştırılmıştır.



Şekil 3.15. Kloroplast sayımı için örneklerin hazırlanışı (a: Carnoy çözeltisi içerisinde rengin açılması, b: I-KI çözeltisinde boyama)

3.3.8. Flow sitometri (FC) analizi

Kolhisin uygulaması yapılmış bitkilerden FC analizi için (3-4 haftalık) taze yaprak örnekleri alınmıştır. Yaprak örneklerinden kesitler alınarak 0.5 cm^2 büyüklüğündeki petri kabına yerleştirilmiş ve 500 µl izolasyon buffer (Partec-Nuclei Extraction Buffer) ilave edilerek yaprak dokusu küçük parçalara ayrılana kadar jilet kullanılarak parçalanmıştır. İzolasyon buffer eklenerek yapılan parçalama işlemi sonucunda hücre çekirdeklerinin serbest kalması sağlanmış ve çekirdek zarı üzerinde açıklıklar oluşturulmuştur. Petri kabındaki örnekler 10-15 saniye süreyle çalkalanmış ve Partec- CellTrics 30 µm- green filtre ile süzülerek tüp içerisine (Partec-Sample Tubes, 3.5 ml, 55x12 mm) aktarılmıştır. Tüplere 1600 µl boyama solüsyonu [Partec-DAPİ (4,6 diamidino-2-phenylinole) Staining Buffer] ilave edilerek ışık izolasyonu olan bir ortamda 5 dakika bekletilmiştir (Şekil 3.16). Sonrasında örnekler FC cihazında analiz edilmiştir (Tuna, 2014). Örneklerin DNA içerikleri DNA içeriği bilinen domates ve 4x yapılı 'Kyoho' üzüm çeşidi ile karşılaştırılmıştır.

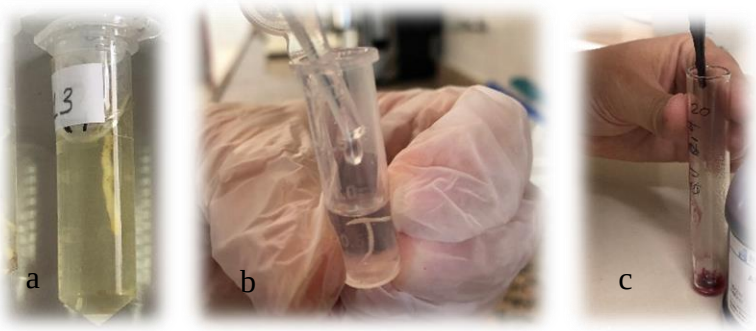


Şekil 3.16. Flow sitometri analizi için örneklerin hazırlama aşamaları

3.3.9. Kromozom sayımı

In vivo ve *in vitro* ortamda geliştirilen ve ploidi seviyesinin farklı olduğu kloroplast sayımları ile öngörülen bitkilerin kök ucu hücrelerinde kromozom sayımları yapılmıştır. Bunun için kök uçları sabah erken saatlerde (10:30-11:00) alınmıştır. Kök örnekleri ön işlem uygulaması olarak, 0.002 M 8-hydroxyquinoline solüsyonunda, +4 °C' de 8 saat süreyle bekletilmiştir (Şekil 3.17 a). 8-hydroxyquinoline solüsyonundan çıkartılan kök uçları saf su ile temizlenmiş ve +4 °C' de 8 saat süreyle Carnoy çözeltisinde tespit edilmiştir. Hidroliz işlemi oda sıcaklığında 30 dakika boyunca 5 N HCl asit içerisinde bekletilerek gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.17 b). Hidroliz işleminden sonra kök uçları saf sudan geçirilmiştir. Boyama aşamasında; + 4 °C'de %1'lik aseto orsein içerisinde 1-2 gün süre ile bekletilerek kök dokularının boyanması sağlandıktan sonra (3.17 c), kök ucunun 0.5-1 mm'lik uç kısmı temiz lam üzerine alınarak, %45'lik asetik

asit ile ezme preparat hazırlanmıştır. Uygun metafaz elde edildikten sonra kromozomların resimleri Olympus BX53 mikroskobu-Olympus DP72 dijital kamera ve Leica DM 1000-Leica DFC290 ile çekilmiştir (Uysal ve ark., 2009; Bozkurt, 2015).



Şekil 3.17. a. Kök uçlarının 8-hydroxyquinoline solüsyonunda bekletilmesi, b. Hidroliz işleminin gerçekleştirilmesi, c. Aseto orsein ile boyama işleminin gerçekleştirilmesi

3.3.8. İstatistiksel analiz

Kolhisin uygulamaları sonucunda elde edilen veriler SPSS 22.0 istatistik programında (SPSS Inc, Chicago, IL, USA) Duncan çoklu karşılaştırma testi ve doz ve süre uygulamaları JMP 13.0 istatistik programında Tukey testi ile $p<0.05$ önem seviyesinde karşılaştırılmıştır (Yue ve ark., 2017).

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

4.1. Kotiledon Aşamasında Kolhisin Uygulamalarının Sonuçları

İlk yıl denemelerinde çekirdeklerde çimlenmenin az oluşu ve bazı dozlarda kurumanın çok olması nedeniyle sonuçlar kısmında iki yıla ait verilerin değerlendirmesine yer verilmiştir.

4.1.1 Kotiledon aşamasında kolhisin uygulamalarının birinci yıl sonuçları

4.1.1.1. Sürgün ucu canlılık oranı (%)

Kolhisin uygulamalarının *in vivo* koşullarda sürgün ucu canlılık oranlarına etkileri istatistiki olarak ($p<0.05$) önemli bulunmuştur. Kolhisin uygulamaları sonucunda tüm çeşitlerde; 1 g L^{-1} kolhisin dozu uygulanan bitkilerin sürgün ucunun canlı olduğu ve gelişmelerine vejetasyon süresince devam ettikleri belirlenmiştir (Çizelge 4.1.1).

Çizelge 4.1.1. Uygulama Yapılan Çeşitlerde Sürgün Ucu Canlılık Oranları (%)*

	Ekşi Kara	Trakya İlkeren	Gök Üzüm
Kontrol	100.00±0.00 a	100.00±0.00 a	100.00±0.00 a
1 g L^{-1}	100.00±0.00 a	100.00±0.00 a	100.00±0.00 a
2 g L^{-1}	82.00±1.39 b	82.63±1.45 c	78.08±1.13 e
3 g L^{-1}	81.10±0.60 b	79.47±1.47 d	76.23±1.12 f
4 g L^{-1}	71.00±1.40 d	85.12±1.18 b	83.21±0.71 c
5 g L^{-1}	73.00±1.30 c	87.08±1.16 b	87.13±1.03 b
7.5 g L^{-1}	69.03±1.63 e	85.99±1.49 b	80.15±1.03 d

*: Aynı sütunda farklı harflerle ifade edilen ortalamalar arasında Duncan çoklu karşılaştırma testine göre %5 düzeyinde farklılık vardır.

Artan kolhisin dozlarıyla birlikte çeşitlerde sürgün ucu kuruma oranlarında artış meydana gelmiş ve ‘Ekşi Kara’ üzüm çeşidinde canlılık oranları kolhisin dozlarıyla orantılı olarak azalmıştır. ‘Ekşi Kara’, ‘Trakya İlkeren’ ve ‘Gök Üzüm’ çeşitlerinde sürgün ucunda en fazla zarar sırasıyla 7.5 g L^{-1} (% 69.03) ve 3 g L^{-1} (% 79.47; 76.23) dozlarında kaydedilmiştir. 10 g L^{-1} kolhisin uygulanan bitkilerin hepsinde (%100) büyüme noktasının kuruması ile tanımlanan kör fide oluşumu belirlenmiştir. Vejetasyon süresince kör sürgün oluşturan fidelerde kotiledon düzeyinde kurumalarla birlikte fidelerin tamamen kuruduğu gözlenmiştir (Şekil 4.1.1).

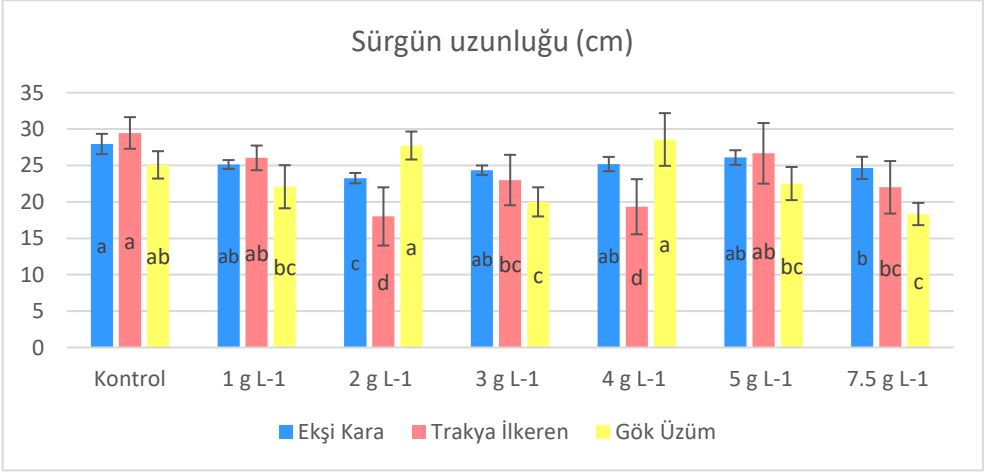


Şekil 4.1.1. Kolhisin uygulaması sonucunda kör fide oluşumu

4.1.1.2. Sürgün uzunluğu (cm)

Kolhisin uygulamalarının sürgün uzunluğu üzerine etkileri, gelişen sürgünlerin boyutlarının yaklaşık olarak vejetasyon sonunda (16 Ekim 2017) ölçülmesiyle tespit edilmiştir. Kolhisin dozlarının çeşit bazında sürgün uzunluğunu değişen oranlarda etkilediği verilerin arasındaki farklılığın istatistiki açıdan önemli ($p<0.05$) olduğu belirlenmiştir.

'Ekşi Kara' üzüm çeşidi fidelerinde kontroldeki sürgün uzunluğu 27.95 cm olarak tespit edilirken en kısa sürgün uzunluğu 23.26 cm değeri ile 2 g L^{-1} uygulamasında belirlenmiştir. 'Trakya İlkeren' üzüm çeşidinde kontroldeki sürgün uzunluğu 29.47 cm iken uygulamalarda sırasıyla 26.04 cm, 18.00 cm, 23.00 cm 19.33 cm, 26.67 cm, 22.00 cm olarak kaydedilmiştir. Kolhisin uygulamaları sürgün gelişmesinde gerilemeye neden olmuştur. 'Gök Üzüm' çeşidi fidelerinde en düşük sürgün uzunluğu 7.5 g L^{-1} uygulamasında (18.33) elde edilirken en yüksek sürgün uzunluğu 2 g L^{-1} uygulamasında (27.74) kaydedilmiştir (Şekil 4.1.2).



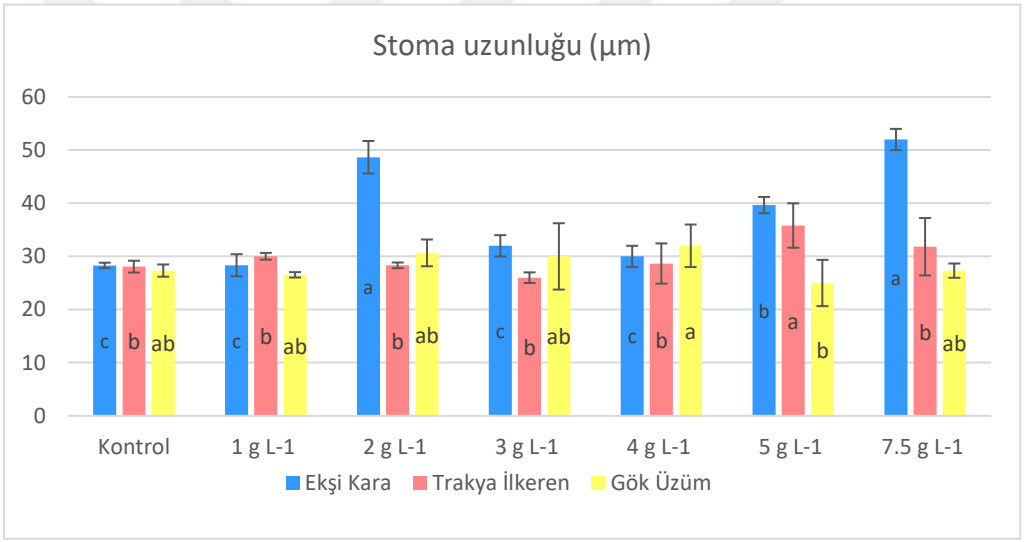
Şekil 4.1.2. Uygulamaların üzüm çeşitlerinde sürgün uzunluğuna etkileri

4.1.1.3. Stoma uzunluk (µm), genişlik (µm) ve yoğunluk (adet mm^{-2}) gözlemleri

Yaprak epidermal izlerinde yapılan değerlendirmeler sonucunda kolhisin uygulamalarının stoma özelliklerini önemli ölçüde etkilediği tespit edilmiştir.

Çizelge 4.1.2 ve Şekil 4.1.3'te de görüldüğü üzere 'Ekşi Kara' üzüm çeşidi fidelerinde kolhisin uygulamaları stoma uzunluğu değerlerini arttırmıştır. 2 g L^{-1} (48.67 µm), ve 7.5 g L^{-1} (52.00 µm) uygulamalarında kontrole (28.30 µm) göre stoma uzunluğu artmış ve bu artış istatistiki olarak önemli ($p<0.05$) bulunmuştur. Bu değerleri takiben 5 g L^{-1} kolhisin uygulamasında stoma uzunluğu değeri 39.67 µm olarak belirlenmiştir.

'Trakya İlkeren' çeşidi fidelerinin kontroldeki stoma uzunluğu 28.08 µm olarak tespit edilirken 1 g L^{-1}, 2 g L^{-1}, 3 g L^{-1}, 4 g L^{-1}, 5 g L^{-1}, 7.5 g L^{-1} kolhisin uygulamalarında sırasıyla 30.02 µm, 28.32 µm, 26.00 µm, 28.67 µm, 35.82 µm, 31.82 µm'dir (Çizelge 4.1.2, Şekil 4.1.3).



Şekil 4.1.3. Kolhisin uygulamalarının stoma uzunluğu üzerine etkileri

'Gök Üzüm' çeşidi fidelerinin kontroldeki stoma uzunluğu 27.33 µm olarak tespit edilirken 1 g L^{-1}, 2 g L^{-1}, 3 g L^{-1}, 4 g L^{-1}, 5 g L^{-1}, 7.5 g L^{-1} kolhisin uygulamalarında sırasıyla 26.54 µm, 30.67 µm, 30.00 µm, 32.00 µm, 25.00 µm 27.32 µm olarak kaydedilmiştir (Çizelge 4.1.2, Şekil 4.1.3).

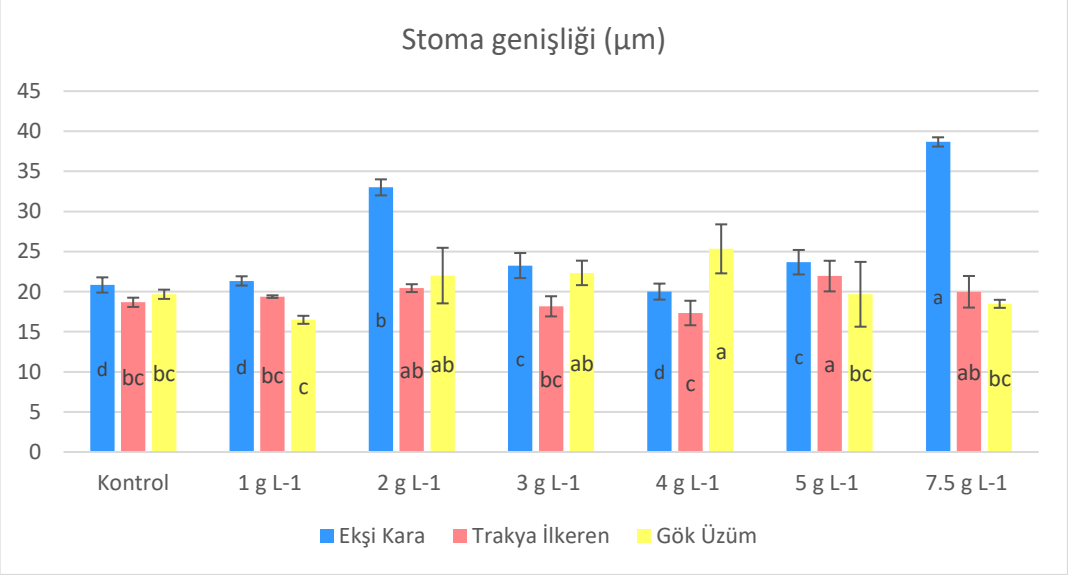
Çizelge 4.1.2. Uygulamaların stoma uzunluğuna (µm) etkileri*

	Ekşi Kara	Trakya İlkeren	Gök Üzüm
Kontrol	28.30±0.52 c	28.08±1.12 b	27.33±1.15 ab
1 g L^{-1}	28.33±2.08 c	30.02±0.64 b	26.54±0.50 ab
2 g L^{-1}	48.67±3.06 a	28.32±0.53b	30.67±2.52 ab
3 g L^{-1}	32.00±2.00 c	26.00±1.00 b	30.00±6.24 ab
4 g L^{-1}	30.00±2.00 c	28.67±3.79 b	32.00±4.00 a
5 g L^{-1}	39.67±1.53 b	35.82±4.18 a	25.00±4.36 b
7.5 g L^{-1}	52.00±2.00 a	31.82±5.40 ab	27.32±1.35 ab

*: Aynı sütunda farklı harflerle ifade edilen ortalamalar arasında Duncan çoklu karşılaştırma testine göre %5 düzeyinde farklılık vardır.

Faklı dozlardaki kolhisin uygulamalarının stoma genişliklerine (µm) etkilerinin tüm asma genotiplerinde önemli ($p<0.05$) olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.1.4).

'Ekşi Kara' üzüm çeşidi fidelerinde stoma uzunluğu değerlerine paralel olarak stoma genişliği (µm) değerleri 2 g L^{-1} (33.00 µm) ve 7.5 g L^{-1} (38.67 µm), uygulamalarında kontrole (20.83 µm) göre artış göstermiştir (Çizelge 4.1.3, Şekil 4.1.4).



Şekil 4.1.4. Uygulamaların stoma genişliğine etkileri

'Trakya İlkeren' çeşidi fidelerinde kontrolde stoma genişliği 18.67±0.58 µm olarak belirlenirken 1 g L^{-1}, 2 g L^{-1}, 3 g L^{-1}, 4 g L^{-1}, 5 g L^{-1}, 7.5 g L^{-1} kolhisin uygulamalarında sırasıyla 19.38 µm, 20.44 µm, 18.17 µm, 17.33 µm, 21.94 µm, 19.98 µm olarak kaydedilmiştir (Çizelge 4.1.3, Şekil 4.1.4).

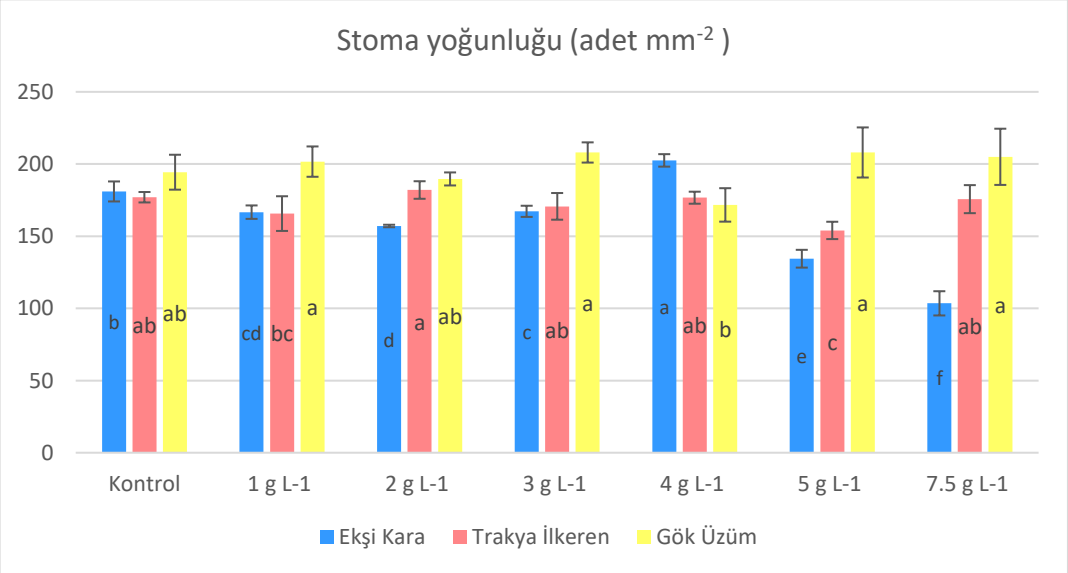
'Gök Üzüm' çeşidinde en düşük stoma genişliği 16.48 µm değeri ile 1 g L^{-1} uygulamasında en yüksek değer ise 25.33 µm değeri ile 4 g L^{-1} uygulamasındadır (Çizelge 4.1.3, Şekil 4.1.4).

Çizelge 4.1.3. Uygulamaların stoma genişliği (µm) üzerine etkileri*

	Ekşi Kara	Trakya İlkeren	Gök Üzüm
Kontrol	20.83±0.95 d	18.67±0.58 bc	19.67±0.58 bc
1 g L^{-1}	21.33±0.58 d	19.38±0.16 bc	16.48±0.50 c
2 g L^{-1}	33.00±1.00 b	20.44±0.49 ab	22.00±3.46 ab
3 g L^{-1}	23.25±1.56 c	18.17±1.26 bc	22.33±1.53 ab
4 g L^{-1}	20.00±1.00 d	17.33±1.53 c	25.33±3.06 a
5 g L^{-1}	23.67±1.53 c	21.94±1.91 a	19.67±4.04 bc
7.5 g L^{-1}	38.67±0.58 a	19.98±1.97 ab	18.48±0.50 bc

*: Aynı sütunda farklı harflerle ifade edilen ortalamalar arasında Duncan çoklu karşılaştırma testine göre %5 düzeyinde farklılık vardır.

'Ekşi Kara' üzüm çeşidinde kolhisin uygulamaları stoma uzunluğu (µm) ve genişliğiyle (µm) ters orantılı olarak stoma sayısında önemli bir düşüşe neden olmuştur ($p<0.05$, Şekil 4.1.5). 7.5 g L^{-1} uygulaması yapılan fidelerin stoma yoğunluğu (103.49 adet mm^{-2}) kontrol bitkilerinden (167.48 adet mm^{-2}) önemli derecede düşüktür (Şekil 4.1.5, Çizelge 4.1.4).



Şekil 4.1.5. Uygulamaların stoma yoğunluğu üzerine etkileri

'Trakya İlkeren' çeşidi fidelerinde stoma boyutlarındaki artışa bağlı olarak 1 g L^{-1} (165.67 adet mm^{-2}) ve 5 g L^{-1} (165.67 adet mm^{-2}) kolhisin uygulamalarında stoma yoğunluğunun kontrole göre azalış gösterdiği görülmüştür (Şekil 4.1.5, Çizelge 4.1.4).

Çizelge 4.1.4. Kolhisin uygulamalarının stoma yoğunluğu (adet mm^{-2}) üzerine etkileri*

	Ekşi Kara	Trakya İlkeren	Gök Üzüm
Kontrol	181.00±6.93 b	177.00±3.61 ab	194.33±12.10 ab
1 g L^{-1}	166.67±4.66 cd	165.67±12.01 bc	201.67±10.50 a
2 g L^{-1}	157.07±0.87 d	182.00±6.08 a	189.67±4.51 ab
3 g L^{-1}	167.23±3.87 c	170.67±9.24 ab	208.00±7.00 a
4 g L^{-1}	202.51±4.32 a	176.67±4.16 ab	171.67±11.59 b
5 g L^{-1}	134.41±6.16 e	154.00±6.00 c	208.00±17.35 a
7.5 g L^{-1}	103.49±8.39 f	175.67±9.71 ab	205.00±19.47 a

*: Aynı sütunda farklı harflerle ifade edilen ortalamalar arasında Duncan çoklu karşılaştırma testine göre %5 düzeyinde farklılık vardır.

'Gök Üzüm' çeşidi fideleri stoma yoğunluğu değerlerinde uygulamalar arasındaki farklılık istatistiki olarak ($p<0.05$) önemlidir. En düşük stoma yoğunluğu 171.67 adet mm^{-2} değeri ile 4 g L^{-1} uygulamasında belirlenirken, en yüksek stoma yoğunluğu değerleri 3 g L^{-1} (208 adet mm^{-2}) ve 5 g L^{-1} (208 adet mm^{-2}) uygulamalarında kaydedilmiştir (Şekil 4.1.5, Çizelge 4.1.4).

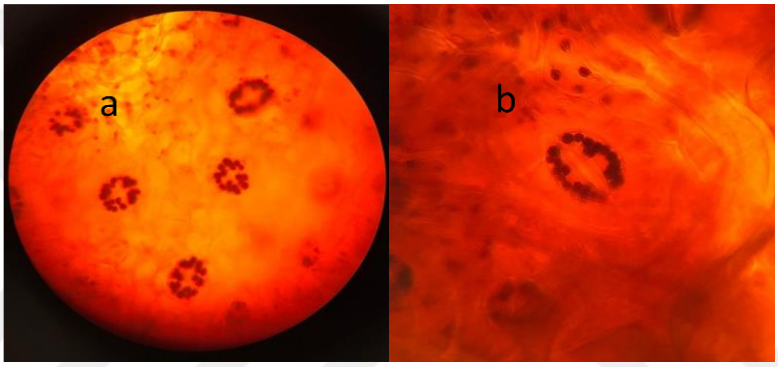
4.1.1.4. Kloroplast (adet stoma^{-1}) sayımı sonuçları

Her yaprak kesitinde 30 adet stoma da kloroplast sayımı yapılmıştır. Kyoho kloroplast sayımları da çeşit bazında yenilenmiştir. Kolhisin uygulamaları ve kontrol olarak kullanılan 4x 'Kyoho' üzüm çeşidi stoma bekçi hücreleri kloroplast sayıları arasındaki farklılığın önemli olduğu ve kolhisin uygulamalarının kloroplast sayılarının 18-20 aralığında değiştiği, tetraploid 'Kyoho' üzüm çeşidi kloroplast sayılarının ise 38-40 aralığında olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.1.5; Şekil 4.1.6 a,b). Kolhisin uygulaması yapılmış bitki stomalarındaki kloroplast sayılarının kontrole göre değişiklik göstermediği tespit edilmiştir.

Çizelge 4.1.5. Uygulamaların kloroplast sayısı (adet stoma $^{-1}$) üzerine etkileri*

		Ekşi Kara		Trakya İlkeren		Gök Üzüm	
	Stoma Sayısı	Ortalama	Aralık	Ortalama	Aralık	Ortalama	Aralık
Kyoho	30	39.33±1.15 a	38-40	38.48±0.50 a	38-40	38.73±0.64 a	38-40
Kontrol	30	19.73±0.28 b	18-20	18.75±0.66 b	18-20	19.15±1.03 b	18-20
1 g L^{-1}	30	19.92±0.14 b	18-20	19.49±0.50 b	18-20	19.22±1.07 b	18-20
2 g L^{-1}	30	19.99±1.00 b	18-20	19.33±1.15 b	18-20	19.00±1.00 b	18-20
3 g L^{-1}	30	19.97±0.50 b	18-20	19.14±1.03 b	18-20	19.00±1.00 b	18-20
4 g L^{-1}	30	19.94±0.10 b	18-20	18.98±0.97 b	18-20	19.19±1.05 b	18-20
5 g L^{-1}	30	20.07±0.65 b	18-22	19.67±0.58 b	18-20	19.93±0.13 b	18-20
7.5 g L^{-1}	30	19.87±0.13 b	18-20	19.44±0.51 b	18-20	19.33±1.15 b	18-20

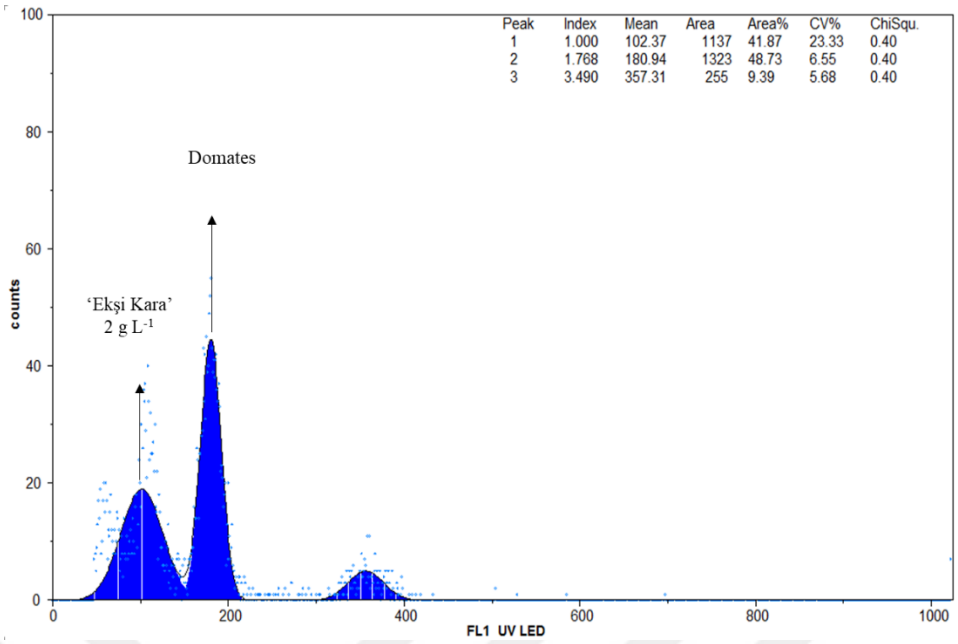
*: Aynı sütunda farklı harflerle ifade edilen ortalamalar arasında Duncan çoklu karşılaştırma testine göre %5 düzeyinde farklılık vardır.



Şekil 4.1.6. a. 'Ekşi Kara' 2 g L^{-1} stoma bekçi hücreleri (x1000) b. 'Kyoho' (x1000)

4.1.1.5. Flow sitometri (FC) analizi sonuçları

Kotiledon aşamasında kolhisin uygulamaları sonucunda stoma ölçümleri ve morfolojik gözlemlerde diploidlerine oranla farklılık olduğu düşünülen örneklerde ploidi seviyesini belirlemek amacıyla FC analizi gerçekleştirilmiştir. FC analizi sonucunda diploid bitkinin pik noktası 100 kanalında, kontrol bitkisi olarak kullanılan domates ve tetraploid yapılı 'Kyoho' çeşidinin pik noktasının ise beklendiği gibi 200 kanalında ortaya çıktığı tespit edilmiştir (Şekil 4.1.7). FC analizi sonucunda, kolhisin dozları ile muamele edilen asma fidelerinin ploidi düzeylerinde bir farklılık tespit edilmemiştir.



Şekil 4.1.7. Flow sitometri sonuçları

4.1.2 Kotiledon aşamasında kolhisin uygulamalarının ikinci yıl sonuçları

4.1.2.1. Sürgün ucu canlılık oranı (%)

Kolhisin uygulamalarının *in vivo* koşullarda sürgün ucu canlılık oranlarına etkileri istatistiki olarak ($p<0.05$) önemli bulunmuştur. Çeşitlere göre değişmekle birlikte, artan kolhisin dozlarıyla sürgün ucu canlılık oranlarında azalmalar meydana gelmiştir. 'Ekşi Kara' ve 'Gök Üzüm' çeşitlerinde 1 g L^{-1} kolhisin dozu uygulanan bitkilerin sürgün uçlarında kuruma oluşmadan gelişmelerine devam ettikleri belirlenmiştir (Çizelge 4.1.6).

'Ekşi Kara' fidelerinde kontrole (%100) göre en düşük sürgün ucu canlılık oranları sırasıyla 4 g L^{-1} (%31.77), 6 g L^{-1} (%47.26) ve 3 g L^{-1} (%51.84) dozlarında tespit edilmiştir (Çizelge 4.1.6).

'Trakya İlkeren' ve 'Gök Üzüm' çeşitlerinde 'Ekşi Kara' üzüm çeşidine göre uygulama yapılan sürgün uçlarında daha az kuruma gerçekleşmiştir. 'Trakya İlkeren' üzüm çeşidinde sürgün ucu canlılık oranları en yüksek kontrolde (%100) kaydedilirken en düşük sürgün ucu canlılık oranı %60.17 oranı ile 3 g L^{-1} kolhisin uygulamasında tespit edilmiştir.

'Gök Üzüm' çeşidi fidelerinde en yüksek sürgün ucu canlılık oranları kontrolde (%100) belirlenirken en düşük sürgün ucu canlılık oranları ise %94.04 değeri ile 3 g L^{-1} kolhisin uygulamasında kaydedilmiştir (Çizelge 4.1.6).

Çizelge 4.1.6. Kolhisin uygulamalarının sürgün ucu canlılık oranlarına (%) etkileri *

	Ekşi Kara	Trakya İlkeren	Gök Üzüm
Kontrol	100.00±0.00 a	100.00±0.00 a	100.00±0.00 a
1 g L^{-1}	100.00±0.00 a	90.90±0.90 b	100.00±0.00 a
2 g L^{-1}	93.78±0.86 b	85.23±1.37 c	94.37±1.09 b
3 g L^{-1}	51.84±2.02 d	60.17±2.02 f	94.04±1.00 b
4 g L^{-1}	31.77±0.25 f	68.06±1.01 e	94.15±2.02 b
5 g L^{-1}	90.90±0.10 c	99.67±0.58 a	98.67±2.31 a
6 g L^{-1}	47.26±1.09 e	79.19±1.20 d	98.15±3.21 a

*: Aynı sütunda farklı harflerle ifade edilen ortalamalar arasında Duncan çoklu karşılaştırma testine göre %5 düzeyinde farklılık vardır.



Şekil 4.1.8. 'Trakya İlkeren' üzüm çeşidi fidelerinde 2 g L^{-1} dozunda yaprak düzeyinde meydana gelen değişiklikler

4.1.2.2. Sürgün uzunluğu (cm)

Kolhisin uygulamalarının sürgün boyuna etkileri sürgün gelişmesinin durduğu dönemde (10 Eylül 2018) sürgünlerin boyutlarının ölçülmesiyle tespit edilmiştir. Kolhisin uygulamalarının sürgün gelişmesinde gerilemeye neden olduğu gözlenmiştir (Çizelge 4.1.7, Şekil 4.1.9).

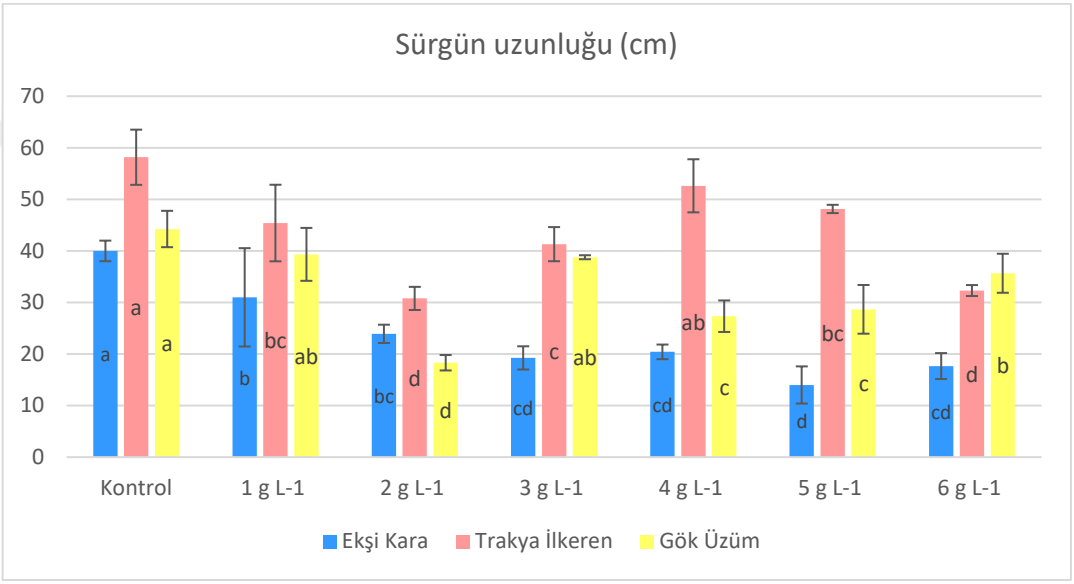
'Ekşi Kara' üzüm çeşidi fidelerinde kontroldeki sürgün uzunluğu 40.00 cm olarak tespit edilirken en kısa sürgün uzunluğu 14.00 cm değeri ile 5 g L^{-1} uygulamasında belirlenmiştir. 'Trakya İlkeren' üzüm çeşidinde Çizelge 4.1.7, Şekil 4.1.9'da görüldüğü üzere kontroldeki sürgün uzunluğu 58.17 cm iken yapılan uygulamalara göre sürgün boyları sırasıyla 45.41 cm, 30.79 cm, 41.31 cm, 52.63±5.15 cm, 48.14 cm, 32.31 cm'dir.

'Gök Üzüm' çeşidi fidelerinden elde edilen verilere göre en düşük sürgün uzunluğu 2 g L^{-1} uygulamasında (18.31 cm) elde edilirken en yüksek sürgün uzunluğu kontrolde (44.25 cm) kaydedilmiştir (Çizelge 4.1.7, Şekil 4.1.9).

Çizelge 4.1.7. Kolhisin uygulamalarının sürgün uzunluğuna (cm) etkileri*

	Ekşi Kara	Trakya İlkeren	Gök Üzüm
Kontrol	40.00±2.00 a	58.17±5.35 a	44.25±3.53 a
1 g L^{-1}	31.00±9.54 b	45.41±7.43 bc	39.33±5.13 ab
2 g L^{-1}	23.92±1.77 bc	30.79±2.24 d	18.31±1.50 d
3 g L^{-1}	19.25±2.25 cd	41.31±3.31 c	38.78±0.38 ab
4 g L^{-1}	20.42±1.42 cd	52.63±5.15 ab	27.33±3.06 c
5 g L^{-1}	14.00±3.61 d	48.14±0.80 bc	28.67±4.73 c
6 g L^{-1}	17.67±2.52 cd	32.31±1.06 d	35.67±3.79 b

*: Aynı sütunda farklı harflerle ifade edilen ortalamalar arasında Duncan çoklu karşılaştırma testine göre %5 düzeyinde farklılık vardır.



Şekil 4.1.9. Uygulamaların üzüm çeşitlerinde sürgün uzunluğuna etkileri

4.1.2.3. Sürgün çapı (mm)

Kolhisin uygulamalarının sürgün çapına etkileri yaklaşık olarak vejetasyon süresi sonunda 10 Eylül 2018'de sürgünlerin üçüncü ve dördüncü boğum arası çapının ölçülmesiyle tespit edilmiştir.

'Ekşi Kara' ve 'Trakya İlkeren' çeşitlerinde uygulamaların sürgün çapına yaptıkları etkiler istatistiki olarak önemli ($p<0.05$) bulunmuştur (Çizelge 4.1.7, Şekil 4.1.10). Artan kolhisin dozuna bağlı olarak 'Ekşi Kara' ve 'Trakya İlkeren' çeşitlerinde sürgün çapı değerlerinde azalmalar meydana geldiği kaydedilmiştir. 'Ekşi Kara' üzüm çeşidinde kontrolde sürgün çapı 2.58 mm iken en düşük sürgün çapı değerleri 5 g L^{-1} (1.84 cm), 6 g L^{-1} (1.94 cm) ve 3 g L^{-1} (1.95 cm) kolhisin uygulamalarındadır (Çizelge 4.1.8, Şekil 4.1.10).

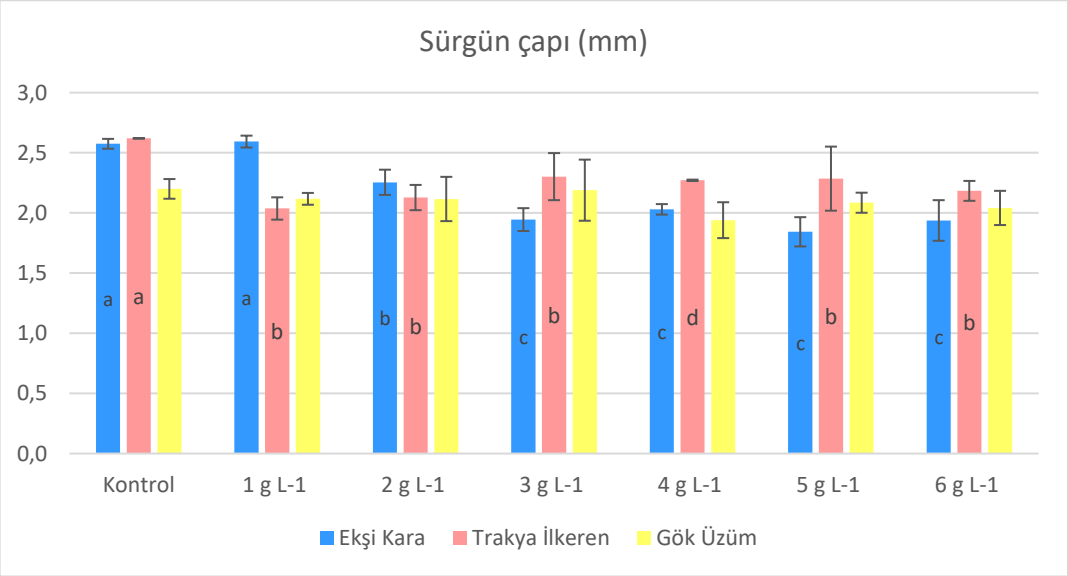
Çizelge 4.1.8. Uygulamaların sürgün çapına (mm) etkileri*

	Ekşi Kara	Trakya İlkeren	Gök Üzüm
Kontrol	2.58±0.04 a	2.62±0.00 a	2.20±0.08
1 g L^{-1}	2.59±0.05 a	2.04±0.09 b	2.12±0.05
2 g L^{-1}	2.26±0.10 b	2.13±0.11 b	2.12±0.18
3 g L^{-1}	1.95±0.10 c	2.30±0.20 b	2.19±0.25
4 g L^{-1}	2.03±0.04 c	2.27±0.01 b	1.94±0.15
5 g L^{-1}	1.84±0.12 c	2.29±0.27 b	2.09±0.08
6 g L^{-1}	1.94±0.17 c	2.18±0.08 b	2.04±0.14

*: Aynı sütunda farklı harflerle ifade edilen ortalamalar arasında Duncan çoklu karşılaştırma testine göre %5 düzeyinde farklılık vardır.

'Trakya İlkeren' çeşidi fidelerinde sürgün çapı kontrolde 2.62 mm iken en düşük sürgün çapı değerleri sırasıyla 1 g L^{-1} (2.04 mm), 2 g L^{-1} (2.13 mm), 6 g L^{-1} (2.18 mm) kolhisin dozlarında belirlenmiştir (Çizelge 4.1.8, Şekil 4.1.10).

'Gök Üzüm' çeşidi fidelerinde sürgün çapı değerlerine kolhisin uygulamalarının etkileri istatistiki olarak önemli bulunmamıştır. En yüksek çap değeri 2.20 mm olarak kontrolde belirlenirken en düşük oran 1.94 mm değeri ile 4 g L^{-1} kolhisin dozundan elde edilmiştir (Çizelge 4.1.8, Şekil 4.1.10).



Şekil 4.1.10. Kolhisin uygulamalarının sürgün çapına etkileri

4.1.2.4. Stoma uzunluk (µm), genişlik (µm) ve yoğunluk (adet mm^{-2}) gözlemleri

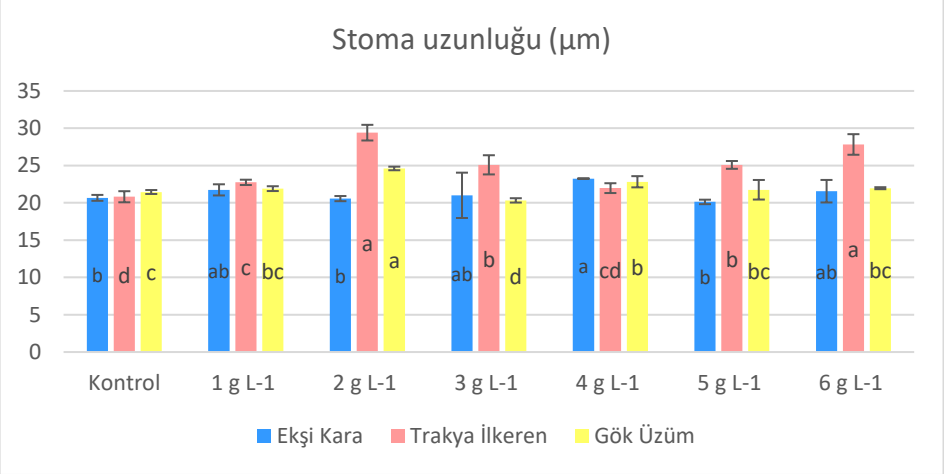
Yaprak epidermal izlerinde (1 Eylül 2018) mikroskobik ölçümler sonucunda kolhisin uygulamalarının stoma özelliklerini önemli ölçüde etkilediği tespit edilmiştir.

Çizelge 4.1.9. Uygulamaların stoma uzunluğuna (µm) etkileri*

	Ekşi Kara	Trakya İlkeren	Gök Üzüm
Kontrol	20.67±0.39 b	20.82±0.74 d	21.45±0.26 c
1 g L^{-1}	21.74±0.75 ab	22.75±0.36 c	21.90±0.32 bc
2 g L^{-1}	20.57±0.34 b	29.41±1.05 a	24.61±0.24 a
3 g L^{-1}	21.01±3.04 ab	25.09±1.29 b	20.33±0.29 d
4 g L^{-1}	23.25±0.05 a	21.97±0.66 cd	22.82±0.75 b
5 g L^{-1}	20.12±0.30 b	25.08±0.52 b	21.75±1.31 bc
6 g L^{-1}	21.56±1.51 ab	27.82±1.38 a	21.96±0.13 bc

*: Aynı sütunda farklı harflerle ifade edilen ortalamalar arasında Duncan çoklu karşılaştırma testine göre %5 düzeyinde farklılık vardır.

'Ekşi Kara' üzüm çeşidinde stoma uzunluğu değerlerinde dozlar arasında büyük oranda farklılık olmadığı belirlenmiştir. Kontroldeki stoma uzunluğu 20.67 µm iken uygulamalarda tespit edilen stoma uzunlukları sırasıyla 21.74 µm, 20.57 µm, 21.01 µm, 23.25 µm, 20.12 µm, 21.56 µm'dir (Çizelge 4.1.9, Şekil 4.1.11).

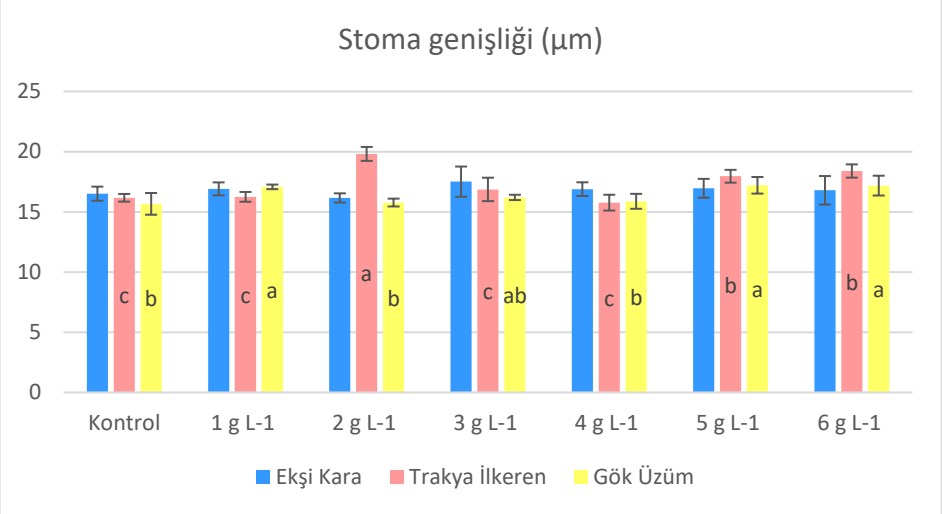


Şekil 4.1.11. Kolhisin uygulamalarının stoma uzunluğu üzerine etkileri

'Trakya İlkeren' çeşidi fidelerinde farklı kolhisin uygulamaları stoma uzunluğunu arttırmıştır. Kontroldeki stoma uzunluğu 20.82 µm olarak tespit edilirken en yüksek stoma uzunluğu değerleri 2 g L^{-1} (29.41 µm), 6 g L^{-1} (27.82 µm) ve 5 g L^{-1} (25.08 µm) uygulamalarında kaydedilmiştir (Şekil 4.1.9, Şekil 4.1.11).

'Gök Üzüm' çeşidinde kontroldeki stoma uzunluğu 21.45 µm belirlenirken kolhisin uygulamalarında tespit edilen stoma uzunlukları sırasıyla 21.90 µm, 20.33 µm, 22.82 µm, 23.25 µm, 21.75 µm, 21.96 µm'dir (Çizelge 4.1.9, Şekil 4.1.11).

‘Trakya İlkeren’ ve ‘Gök Üzüm’ çeşitlerinde faklı dozlardaki kolhisin uygulamalarının stoma genişliklerine (µm) etkilerinin önemli olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.1.10, Şekil 4.1.12).



Şekil 4.1.12. Kolhisin uygulamalarının stoma genişliği üzerine etkileri

‘Ekşi Kara’ üzüm çeşidi fidelerinde stoma genişliği değerlerinde kontrole göre belirgin bir artış olmadığı belirlenmiştir ($p>0.05$). Çizelge 4.1.10, Şekil 4.1.12’ da görüldüğü gibi kontroldeki stoma genişliği 16.51 µm’dir. Uygulamalardaki stoma genişlikleri sırasıyla 21.74 µm, 16.91 µm, 16.15 µm, 17.51 µm, 16.89 µm, 16.96 µm, 16.79 µm olarak kaydedilmiştir.

‘Trakya İlkeren’ üzüm çeşidi fidelerinde stoma genişliği (µm) değerleri de stoma uzunluğuna benzer şekilde, 2 g L^{-1} (19.81 µm), 6 g L^{-1} (18.39 µm) ve 5 g L^{-1} (17.95 µm) kolhisin uygulamalarında, kontrole (20.83 µm) göre artış göstermiştir (Çizelge 4.1.10, Şekil 4.1.12).

‘Gök Üzüm’ çeşidinde kontroldeki stoma genişliği 15.66 µm olarak belirlenirken kolhisin uygulamalarında stoma genişlikleri sırasıyla, 17.07 µm, 15.77 µm, 16.20 µm, 15.87 µm, 17.20 µm, 17.18 µm’dir (Çizelge 4.1.10, Şekil 4.1.12).

Çizelge 4.1.10. Kolhisin uygulamalarının stoma genişliği (µm) üzerine etkileri*

	Ekşi Kara	Trakya İlkeren	Gök Üzüm
Kontrol	16.51±0.59	16.17±0.32 c	15.66±0.90 b
1 g L^{-1}	16.91±0.54	16.24±0.41 c	17.07±0.19 a
2 g L^{-1}	16.15±0.38	19.81±0.58 a	15.77±0.33 b
3 g L^{-1}	17.51±1.26	16.86±0.97 c	16.20±0.22 ab
4 g L^{-1}	16.89±0.57	15.76±0.66 c	15.87±0.62 b
5 g L^{-1}	16.96±0.78	17.95±0.53 b	17.20±0.69 a
6 g L^{-1}	16.79±1.18	18.39±0.55 b	17.18±0.82 a

*: Aynı sütunda farklı harflerle ifade edilen ortalamalar arasında Duncan çoklu karşılaştırma testine göre %5 düzeyinde farklılık vardır.

Kolhisin uygulaması yapılmış fidelerin yaprak stoma yoğunluğu değerlerinde stoma boyutlarına bağlı olarak azalmalar meydana geldiği tespit edilmiştir ($p<0.05$, Çizelge 4.1.11, Şekil 4.1.13).

'Ekşi Kara' üzüm çeşidi stoma yoğunluğu en düşük 305.15 adet mm^{-2} değeri ile 5 g L^{-1} dozunda tespit edilirken en yüksek stoma yoğunluğu değeri 3 g L^{-1} (448.43 adet mm^{-2}) dozunda kaydedilmiştir (Çizelge 4.1.11, Şekil 4.1.13).

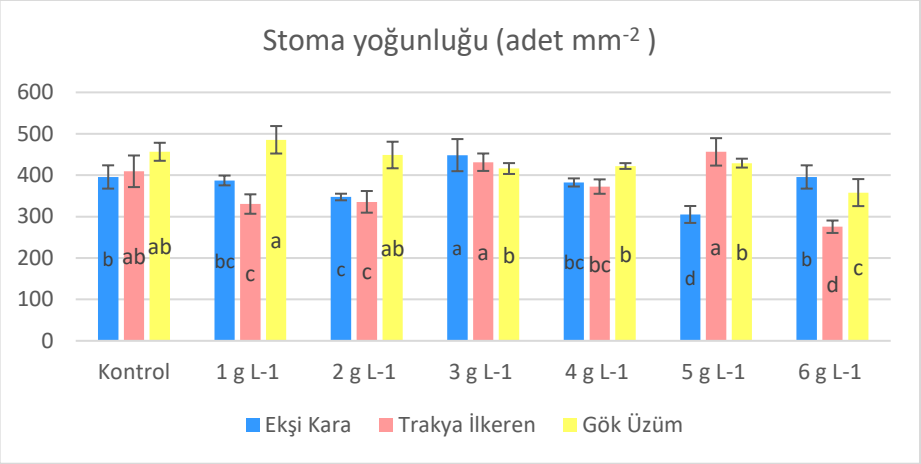
Çizelge 4.1.11. Uygulamaların stoma yoğunluğuna (adet mm^{-2}) etkileri*

	Ekşi Kara	Trakya İlkeren	Gök Üzüm
Kontrol	395.73±28.14 b	409.42±38.17 ab	456.52±21.74 ab
1 g L^{-1}	387.29±11.85 bc	330.35±23.49 c	485.51±33.21 a
2 g L^{-1}	347.34±7.98 c	335.62±26.15 c	448.79±32.09 ab
3 g L^{-1}	448.43±38.78 a	431.39±21.06 a	416.09±13.09 b
4 g L^{-1}	382.50±9.79 bc	372.49±17.38 bc	422.14±7.02 b
5 g L^{-1}	305.15±20.44 d	456.32±33.14 a	429.16±10.73 b
6 g L^{-1}	395.73±28.14 b	275.51±15.00 d	357.97±32.63 c

*: Aynı sütunda farklı harflerle ifade edilen ortalamalar arasında Duncan çoklu karşılaştırma testine göre %5 düzeyinde farklılık vardır.

'Trakya İlkeren' üzüm çeşidinde kolhisin uygulamaları stoma uzunluğu (µm) ve genişliği (µm) değerleriyle ters orantılı olarak stoma sayısında önemli ($p<0.05$) bir düşüşe neden olmuştur. 6 g L^{-1} uygulaması yapılan fidelerin stoma yoğunluğu (275.51 adet mm^{-2}) kontrol bitkilerinden (409.42 adet mm^{-2}) önemli derecede düşüktür (Çizelge 4.1.11, Şekil 4.1.13).

'Gök Üzüm' çeşidi fidelerinde uygulamaların stoma yoğunluğu değerlerini belirgin bir şekilde etkilemediği tespit edilmiş, en yüksek stoma yoğunluğu kontrolde (485.51 adet mm^{-2}) en düşük stoma yoğunluğu ise 6 g L^{-1} (357.97 adet mm^{-2}) uygulamasında kaydedilmiştir (Çizelge 4.1.11, Şekil 4.1.13).



Şekil 4.1.13. Uygulamaların stoma yoğunluğu üzerine etkileri

4.1.2.5. Kloroplast (adet stoma^{-1}) sayımı sonuçları

Tetraploid 'Kyoho' üzüm çeşidi stoma bekçi hücrelerindeki kloroplast sayısı ve kolhisin uygulamaları kloroplast sayıları arasındaki farklılık önemli bulunmuştur. Uygulamalara göre değişmekle birlikte 18-38 aralığında değiştiği, 'Kyoho' üzüm çeşidinin ise kloroplast sayılarının 38-40 aralığında olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.1.12, Şekil 4.1.14, Şekil 4.1.15).

'Gök Üzüm' çeşidi fidelerinde uygulamalardaki bekçi hücresi kloroplast sayısı kontrole göre değişiklik göstermemiştir (Çizelge 4.1.12).

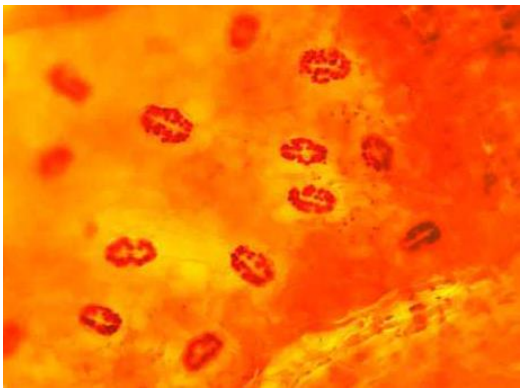
Çizelge 4.1.12. Uygulamaların kloroplast sayısı üzerine etkileri (adet stoma^{-1})*

		Ekşi Kara		Trakya İlkeren		Gök Üzüm	
	Stoma Sayısı	Ortalama	Aralık	Ortalama	Aralık	Ortalama	Aralık
Kyoho	30	38.67±1.15 a	38-40	38.45±0.77 a	38-40	38.67±1.15 a	38-40
Kontrol	30	19.33±1.15 d	18-20	19.88±0.21 d	38-40	19.28±0.63 b	38-40
1 g L^{-1}	30	20.08±0.33 cd	18-22	19.53±0.06 d	18-20	19.82±0.32 b	18-20
2 g L^{-1}	30	19.51±0.43 cd	18-20	26.79±1.29 b	18-38	20.00±0.00 b	18-20
3 g L^{-1}	30	20.05±0.59 cd	18-22	20.55±0.33 d	18-22	19.68±0.98 b	18-20
4 g L^{-1}	30	19.58±0.52 cd	18-20	20.66±0.98 d	18-22	20.24±0.15 b	18-20
5 g L^{-1}	30	24.19±1.28 b	18-30	20.76±0.49 d	18-22	19.56±0.07 b	18-20
6 g L^{-1}	30	21.15±1.30 b	18-22	24.81±1.09 c	18-38	19.33±1.15 b	18-20

*: Aynı sütunda farklı harflerle ifade edilen ortalamalar arasında Duncan çoklu karşılaştırma testine göre %5 düzeyinde farklılık vardır.

'Ekşi Kara' üzüm çeşidi kloroplast sayısında kontrole göre belirgin farklılıklar 5 g L^{-1} (24.19 adet stoma $^{-1}$) kolhisin uygulamasında kaydedilmiştir.

'Trakya İlkeren' çeşidi fidelerinde en yüksek kloroplast sayısı değerleri 2 g L^{-1} (26.79 adet stoma $^{-1}$) ve 6 g L^{-1} (26.79 adet stoma $^{-1}$) uygulamalarındadır.



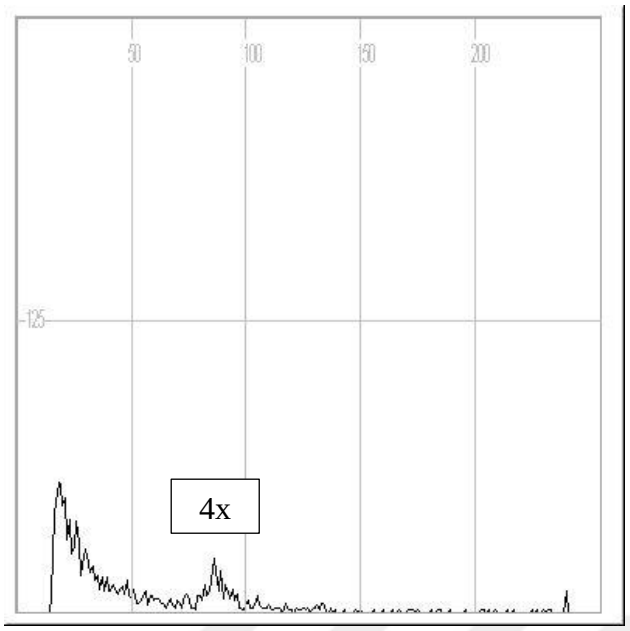
Şekil 4.1.14. ‘Trakya İlkeren’ üzüm çeşidi fidelerinde 2 g L^{-1} dozunda belirlenen kloroplast sayıları (x1000)



Şekil 4.1.15. ‘Trakya İlkeren’ üzüm çeşidi fidelerinde 6 g L^{-1} dozunda belirlenen kloroplast sayıları (x1000)

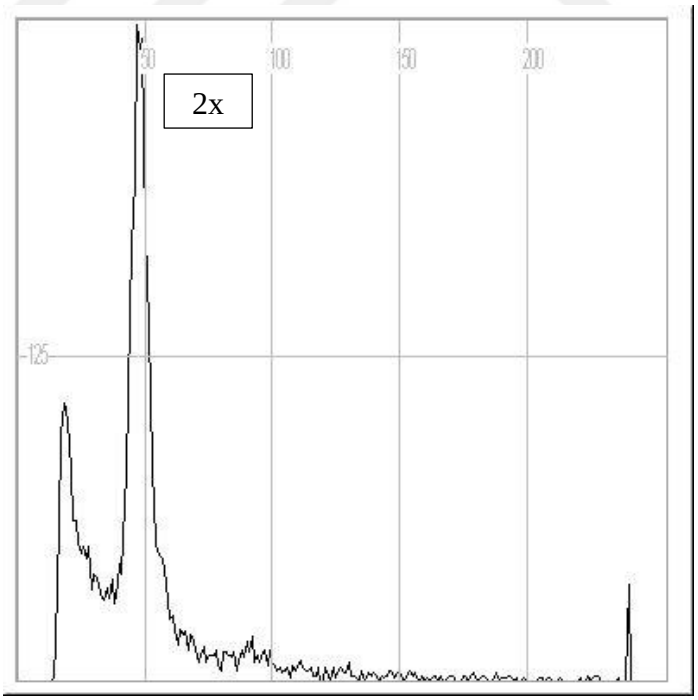
4.1.2.6. Flow sitometri (FC) analizi sonuçları

İkinci yıl kolhisin uygulamaları yapılan bitkilerde kloroplast sayımları temel alınarak flow sitometri analizi yapılmıştır. Analizler sonucunda, ‘Ekşi Kara’ üzüm çeşidinde 5 g L^{-1} uygulaması sonucu tetraploid bitki oluşumu tespit edilmiştir. Ploidi seviyesi kontrole göre artış göstermiştir (Şekil 4.1.16).

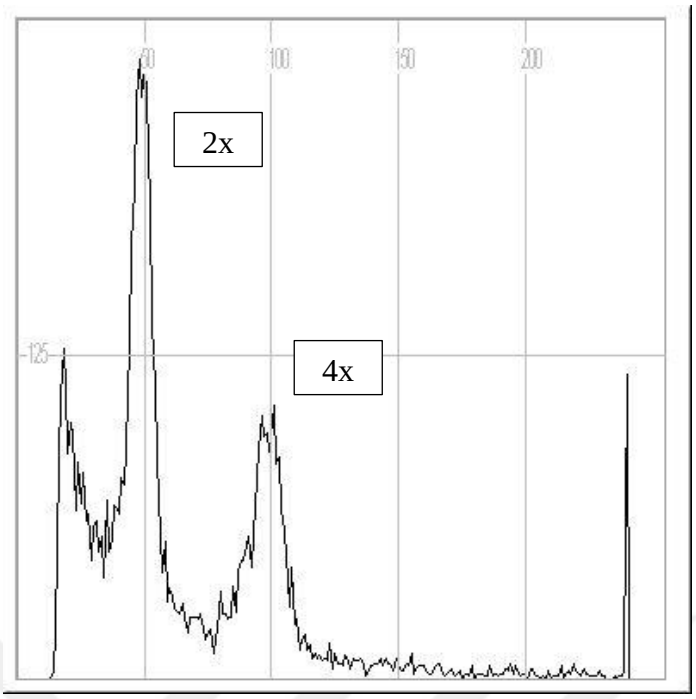


Şekil 4.1.16. ‘Ekşi Kara’ üzüm çeşidinde 5 g L^{-1} uygulaması sonucunda tetraploid bitki örneğinin FC analizi sonucu

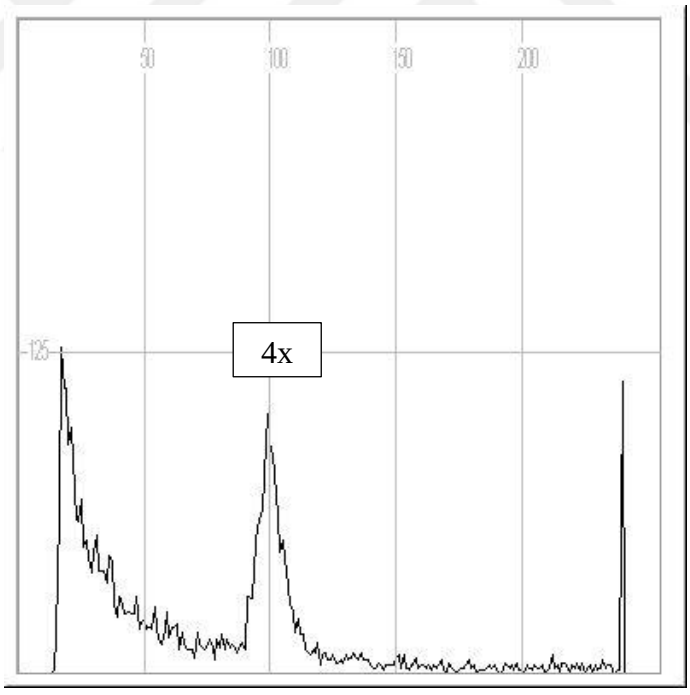
‘Trakya İlkeren’ çeşidinde 2 g L^{-1} ve 6 g L^{-1} uygulamalarında ploidi seviyesinin orijinal diploidlerine oranla değiştiği ve tetraploid ve miksoploid form oluştuğu belirlenmiştir (Şekil 4.1.17, 4.1.18, 4.1.19).



Şekil 4.1.17. ‘Trakya İlkeren’ üzüm çeşidinde 2 g L^{-1} uygulaması sonucunda diploid bitki örneğinin FC analizi sonucu



Şekil 4.1.18. ‘Trakya İlkeren’ üzüm çeşidinde 2 g L^{-1} uygulaması sonucunda miksoploid bitki örneğinin FC analizi sonucu



Şekil 4.1.19. ‘Trakya İlkeren’ üzüm çeşidinde 6 g L^{-1} uygulaması sonucunda tetraploid bitki örneğinin FC analiz sonucu

4.2. Tek Göz Çeliklerine Kolhisin Uygulamaları

4.2.1. Sürgün ucu canlılık oranı (%)

Hızlı gelişme döneminde yapılan kolhisinin farklı doz ve süre uygulamalarının interaksiyonlarının sürgün ucu canlılık oranlarında meydana getirdikleri farklılık istatistiki olarak önemsiz bulunmuştur. Bu sebeple kolhisin dozlarının çeşit içerisinde değerlendirilmesinin sonuçları verilmiştir.

Sürgün ucu kuruma oranlarının kotiledon aşamasında yapılan uygulamalara göre daha düşük olduğu ve kolhisin dozlarının çeşit bazında farklı etkileri olduğu kaydedilmiştir (Çizelge 4.2.1, Şekil 4.2.1).

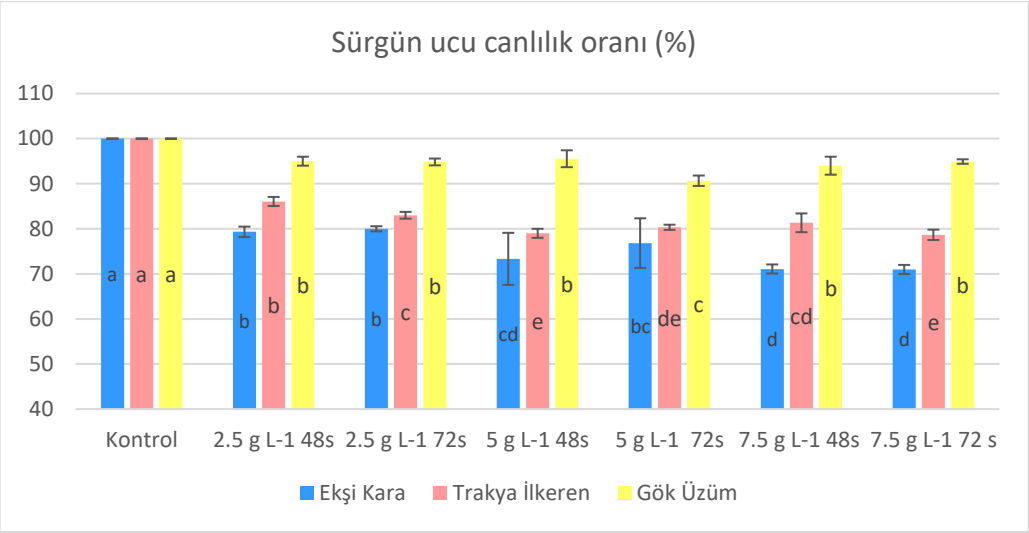
'Ekşi Kara' üzüm çeşidinde sürgün ucu canlılık oranlarının doz ve süre ile orantılı olarak değişim göstermediği fakat çeşitli dozlardaki kolhisin uygulamalarının sürgün ucu canlılık oranlarında azalmalara neden olduğu Çizelge 4.2.1, Şekil 4.2.1'de görülmektedir. Kontrolde sürgün ucu canlılık oranları %100 belirlenirken kolhisin uygulamaları içerisinde en düşük sürgün ucu canlılık oranları %70.98 değeri ile 7.5 g L^{-1} 72-s uygulamasındadır.

Çizelge 4.2.1. Hızlı gelişme döneminde kolhisin uygulamalarının sürgün ucu canlılık oranlarına (%) etkileri*

	Ekşi Kara	Trakya İlkeren	Gök Üzüm
Kontrol	100.00±0.00 a	100.00±0.00 a	100.00±0.00 a
2.5 g L^{-1} 48 s	79.33±1.15 b	86.07±1.01 b	95.00±1.00 b
2.5 g L^{-1} 72 s	80.00±0.57 b	83.00±0.75 c	94.83±0.76 b
5 g L^{-1} 48 s	73.33±5.77 cd	79.00±1.00 e	95.54±1.88 b
5 g L^{-1} 72 s	76.83±5.50 bc	80.33±0.58 de	90.67±1.15 c
7.5 g L^{-1} 48 s	71.08±1.01 d	81.33±2.08 cd	94.00±2.00 b
7.5 g L^{-1} 72 s	70.98±1.00 d	78.67±1.15 e	94.92±0.50 b

*: Aynı sütunda farklı harflerle ifade edilen ortalamalar arasında Duncan çoklu karşılaştırma testine göre %5 düzeyinde farklılık vardır.

'Trakya İlkeren' üzüm çeşidinde sürgün ucu canlılık oranları doğrusal olarak azalış göstermemiştir. Uygulamalara göre sürgün ucu canlılık oranlarında en fazla azalma %78.67 değeri ile 7.5 g L^{-1} 72-s uygulamasında belirlenmiştir. Bu oranı %79 değeri ile 5 g L^{-1} 48-s kolhisin dozu takip etmiştir (Çizelge 4.2.1, Şekil 4.2.1).



Şekil 4.2.1. Hızlı gelişme döneminde kolhisin uygulamalarının sürgün ucu canlılık oranlarına etkileri

'Gök Üzüm' çeşidinde uygulama yapılan sürgün uçları, 'Ekşi Kara' ve 'Trakya İlkeren' üzüm çeşitlerine göre daha az zarar görmüştür. Kontrolde sürgün ucu canlılık oranları %100'dür. Kolhisin uygulamaları arasında en düşük sürgün ucu canlılık oranları %90.67 değeri ile 5 g L^{-1} 72-s uygulamasında belirlenmiştir (Çizelge 4.2.1, Şekil 4.2.1).

4.2.2. Sürgün uzunluğu (cm)

Kolhisin uygulamalarının sürgün uzunluğuna etkileri sürgün uzamasının durduğu (24 Ekim 2017) dönemde gelişen sürgünlerin boyutlarının ölçülmesiyle tespit edilmiştir. Kolhisin uygulamalarının sürgün gelişmesinde gerilemeye neden olduğu gözlenmiştir (Çizelge 4.2.2, Şekil 4.2.2).

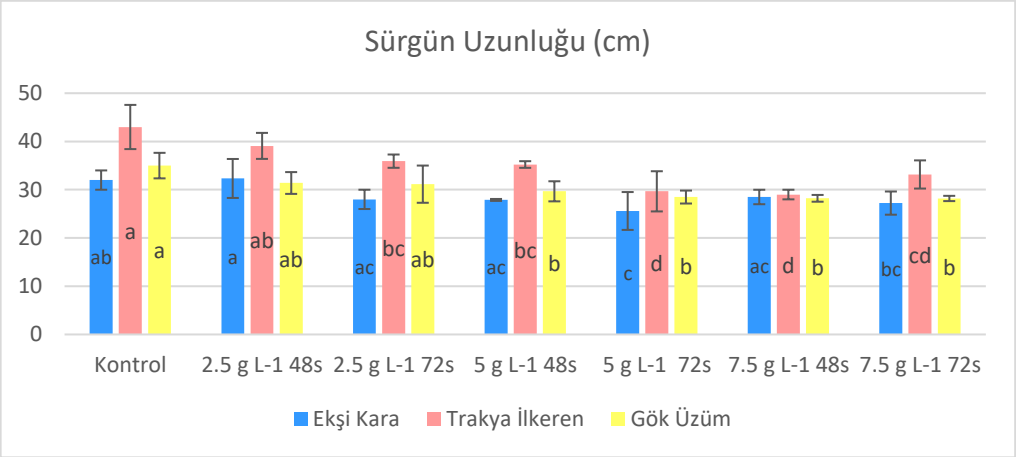
Çizelge 4.2.2. Kolhisin uygulamalarının sürgün uzunluğuna (cm) etkileri*

	Ekşi Kara	Trakya İlkeren	Gök Üzüm
Kontrol	32.00±2.00 ab	43.00±4.58 a	35.00±2.65 a
2.5 g L^{-1} 48 s	32.33±4.04 a	39.08±2.70 ab	31.39±2.26 ab
2.5 g L^{-1} 72 s	28.00±2.00 ac	35.92±1.38 bc	31.15±3.86 ab
5 g L^{-1} 48 s	27.88±0.20 ac	35.23±0.69 bc	29.67±2.08 b
5 g L^{-1} 72 s	25.59±3.92 c	29.67±4.16 d	28.48±1.34 b
7.5 g L^{-1} 48 s	28.49±1.50 ac	29.00±1.00 d	28.22±0.70 b
7.5 g L^{-1} 72 s	27.23±2.41 bc	33.16±2.92 cd	28.19±0.54 b

*: Aynı sütunda farklı harflerle ifade edilen ortalamalar arasında Duncan çoklu karşılaştırma testine göre %5 düzeyinde farklılık vardır.

'Ekşi Kara' üzüm çeşidinde kontroldeki sürgün uzunluğu 32.00 cm iken en kısa sürgün uzunluğu 25.59 cm değeri ile 5 g L^{-1} 72-s uygulamasında belirlenmiştir. Kolhisin

dozlarındaki artışa bağlı olarak sürgün uzunluğu değerleri sınırlı düzeyde azalış göstermiştir (Çizelge 4.2.2, Şekil 4.2.2).



Şekil 4.2.2. Kolhisin uygulamaların sürgün uzunluğuna etkileri

'Trakya İlkeren' üzüm çeşidinde kolhisin dozlarındaki artışa bağlı olarak sürgün uzunluğu değerleri azalış göstermiştir. Kontrolde sürgün uzunluğu 43 cm olarak belirlenirken en kısa sürgün uzunluğu 29 cm değeri ile 7.5 g L^{-1} 48-s uygulamasındadır. Bu değeri takiben en kısa sürgün uzunluğu 5 g L^{-1} 72-s (29.67 cm) uygulamasında kaydedilmiştir (Çizelge 4.2.2, Şekil 4.2.2).

'Gök Üzüm' çeşidi sürgün uzunluğu değerlerinin artan kolhisin dozlarıyla birlikte azalış gösterdiği ($p<0.05$) fakat bu farklılığın sınırlı düzeyde kaldığı tespit edilmiştir. Kontrolde sürgün uzunluğu 35 cm olarak belirlenirken en kısa sürgün uzunlukları sırasıyla 7.5 g L^{-1} 48-s (28.22 cm) ve 7.5 g L^{-1} 72-s (28.19 cm) uygulamalarında kaydedilmiştir (Çizelge 4.2.2, Şekil 4.2.2).

4.2.3. Sürgün çapı (mm)

Kolhisin uygulamalarının sürgün çapına etkileri (24 Ekim 2017) gelişen sürgünlerin üçüncü ve dördüncü boğum arası çapının ölçülmesiyle tespit edilmiştir. Kolhisin uygulamalarının sürgün çapını (mm) değişen oranlarda etkilediği belirlenmiştir (Çizelge 4.2.3, Şekil 4.2.3).

Çizelge 4.2.3. Uygulamaların sürgün çapına (mm) etkileri*

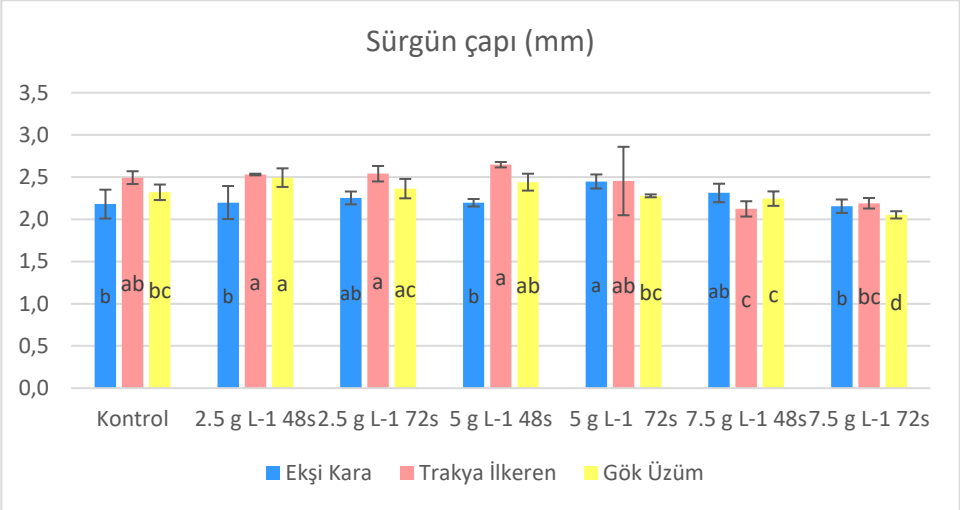
	Ekşi Kara	Trakya İlkeren	Gök Üzüm
Kontrol	2.18±0.17 b	2.49±0.08 ab	2.32±0.09 bc
2.5 g L^{-1} 48 s	2.20±0.20 b	2.53±0.01 a	2.49±0.11 a
2.5 g L^{-1} 72 s	2.25±0.08 ab	2.54±0.09 a	2.36±0.12 ac
5 g L^{-1} 48 s	2.20±0.04 b	2.65±0.03 a	2.44±0.10 ab
5 g L^{-1} 72 s	2.45±0.08 a	2.45±0.41 ab	2.28±0.02 bc
7.5 g L^{-1} 48	2.31±0.11 ab	2.12±0.09 c	2.24±0.09 c
7.5 g L^{-1} 72 s	2.16±0.08 b	2.19±0.06 bc	2.05±0.04 d

*: Aynı sütunda farklı harflerle ifade edilen ortalamalar arasında Duncan çoklu karşılaştırma testine göre %5 düzeyinde farklılık vardır.

'Ekşi Kara' çeşidinde kontrolde sürgün çapı 2.18 mm iken, kolhisin uygulamalarında sırasıyla 2.20 mm, 2.25 mm, 2.20 mm, 2.45 mm, 2.31 mm, 2.16 mm'dir. Sürgün çapı değerleri kolhisin uygulamalarından değişen oranlarda etkilenmiştir (Çizelge 4.2.3, Şekil 4.2.3).

'Trakya İlkeren' çeşidinde sürgün çapı kontrolde 2.49 mm'dir. Uygulamalarda en düşük sürgün çapı değerleri sırasıyla 7.5 g L^{-1} 48-s (2.12 mm) ve 7.5 g L^{-1} 72-s (2.16 mm) uygulamalarında tespit edilmiştir (Çizelge 4.2.3, Şekil 4.2.3).

'Gök Üzüm' çeşidinde kolhisin uygulamaları sürgün çapını değişen oranlarda etkilemiştir. Sürgün çapı kontrolde 2.32 mm iken 7.5 g L^{-1} 72-s uygulamasında 2.05 mm'dir (Çizelge 4.2.3, Şekil 4.2.3).



Şekil 4.2.3. Uygulamaların sürgün çapına etkileri

4.2.4. Stoma uzunluk (µm), genişlik (µm) ve yoğunluk (adet mm^{-2}) gözlemleri

Yaprak epidermal izlerinde, stoma uzunluk (µm) ve genişlik (µm) değerleri mikroskobik ölçümlerle belirlenmiştir. Yapılan değerlendirmeler sonucunda kolhisin dozlarının stoma özelliklerini önemli ölçüde etkilediği tespit edilmiştir (Çizelge 4.2.4, Şekil 4.2.4).

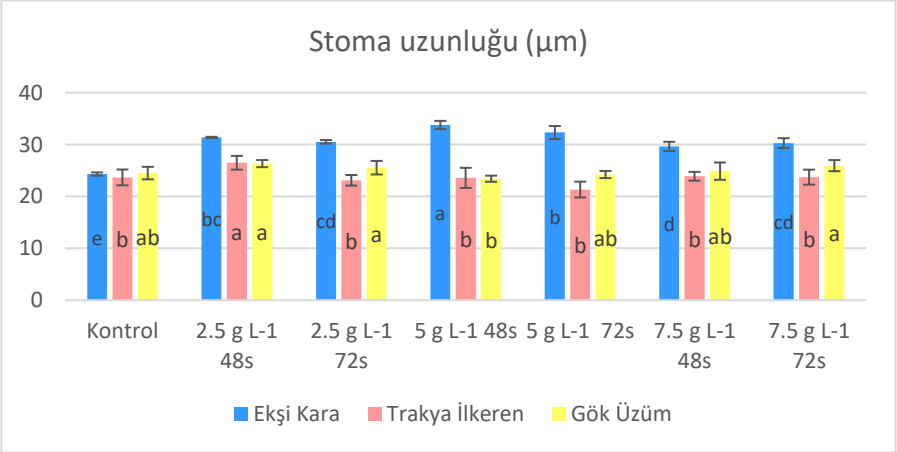
Çizelge 4.2.4. Uygulamaların stoma uzunluğuna (µm) etkileri*

	Ekşi Kara	Trakya İlkeren	Gök Üzüm
Kontrol	24.31±0.32 e	23.67±1.53 b	24.51±1.21 ab
2.5 g L^{-1} 48 s	31.37±0.13 bc	26.49±1.33 a	26.34±0.69 a
2.5 g L^{-1} 72 s	30.53±0.34 cd	23.12±1.02 b	25.54±1.31 a
5 g L^{-1} 48 s	33.78±0.79 a	23.58±1.94 b	23.42±0.59 b
5 g L^{-1} 72 s	32.33±1.26 b	21.33±1.53 b	24.23±0.69 ab
7.5 g L^{-1} 48	29.65±0.89 d	23.89±0.85 b	24.88±1.67 ab
7.5 g L^{-1} 72 s	30.28±0.95 cd	23.72±1.45 b	25.95±1.07 a

*: Aynı sütunda farklı harflerle ifade edilen ortalamalar arasında Duncan çoklu karşılaştırma testine göre %5 düzeyinde farklılık vardır.

Kolhisin uygulamaları ‘Ekşi Kara’ çeşidinde stoma uzunluğunu önemli ($p<0.05$) bir şekilde etkilemiştir. En düşük stoma uzunluğu kontrolde (24.31 µm) belirlenirken en yüksek stoma uzunluğu değerleri 5 g L^{-1} 48-s (32.33 µm) ve 5 g L^{-1} 72-s (32.33 µm) uygulamalarında kaydedilmiştir (Çizelge 4.2.4, Şekil 4.2.4).

‘Trakya İlkeren’ çeşidinde stoma uzunluğu kontrolde 23.67 µm iken en yüksek stoma uzunluğu değeri 26.49 değeri ile 2.5 g L^{-1} 48-s uygulamasında tespit edilmiştir. Diğer kolhisin doz ve süre uygulamalarına ait stoma uzunluk değerleri arasında belirgin bir farklılık yoktur (Çizelge 4.2.4, Şekil 4.2.4).



Şekil 4.2.4. Uygulamaların stoma uzunluğuna etkileri

‘Gök Üzüm’ çeşidinde kolhisin uygulamalarının stoma uzunluğu değerlerini değişen oranlarda etkilediği tespit edilmiştir. Kontrolde stoma uzunluğu 24.51 µm olarak tespit edilirken, 2.5 g L^{-1} 48-s (26.34 µm) ve 7.5 g L^{-1} 72-s (25.95 µm) kolhisin uygulamalarının stoma uzunluğunu arttırdığı kaydedilmiştir.

Faklı dozlardaki kolhisin uygulamalarının stoma genişliklerine (µm) etkileri ‘Ekşi Kara’ üzüm çeşidinde istatistiksel olarak önemlidir ($p<0.05$). Diğer çeşitlerde elde edilen stoma genişliği değerleri arasındaki farklılık istatistiki olarak önemsiz ($p>0.05$) bulunmuştur (Çizelge 4.2.5, Şekil 4.2.5).

Çizelge 4.2.5. Uygulamaların stoma genişliğine (µm) etkileri*

	Ekşi Kara	Trakya İlkeren	Gök Üzüm
Kontrol	17.51±0.31 d	15.67±0.58	16.20±0.66
2.5 g L^{-1} 48 s	20.54±0.29 c	16.42±0.52	17.11±0.42
2.5 g L^{-1} 72 s	20.95±0.89 c	15.92±0.88	16.80±1.02
5 g L^{-1} 48 s	27.28±1.43 a	16.13±0.93	15.89±0.36
5 g L^{-1} 72 s	25.80±1.10 b	15.75±0.66	15.94±0.21
7.5 g L^{-1} 48 s	21.36±0.47 c	16.90±0.41	16.70±0.68
7.5 g L^{-1} 72 s	21.61±0.58 c	16.44±0.64	15.98±0.74

*: Aynı sütunda farklı harflerle ifade edilen ortalamalar arasında Duncan çoklu karşılaştırma testine göre %5 düzeyinde farklılık vardır.

‘Ekşi Kara’ çeşidinde kolhisin uygulaması yapılan bitkilerde stoma genişliğinin kontrole (17.51 µm) göre önemli artış gösterdiği belirlenmiştir. Stoma uzunluğundaki artışa paralel olarak en yüksek stoma genişliği değerleri 5 g L^{-1} 48-s (27.28 µm) ve 5 g L^{-1} 72-s (25.80 µm) uygulamalarında kaydedilmiştir (Çizelge 4.2.5, Şekil 4.2.5).

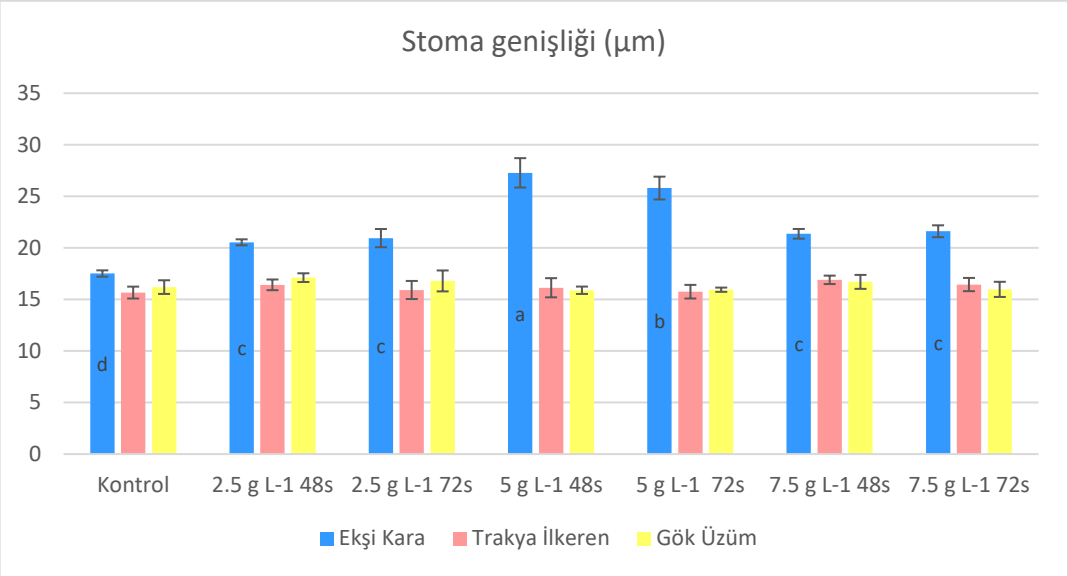
‘Trakya İlkeren’ çeşidinde stoma genişliği kontrolde 15.67 µm’dir. 7.5 g L^{-1} 48-s (16.90±0.41) ve 7.5 g L^{-1} 72-s (16.44) kolhisin uygulamalarında kontrole göre stoma genişliği değerlerinde artış görülmüştür (Çizelge 4.2.5, Şekil 4.2.5).

‘Gök Üzüm’ çeşidinde kolhisin uygulamalarının stoma genişliğini farklı oranlarda etkilediği tespit edilmiştir. Kontrolde stoma genişliği 16.20 µm olarak belirlenirken 2.5 g L^{-1} 48-s (17.11 µm) kolhisin uygulamasında kontrole göre stoma genişliğinde artış olduğu kaydedilmiştir (Çizelge 4.2.5, Şekil 4.2.5).

Kolhisin uygulaması yapılmış bitkilerin yaprak stoma sayısı değerlerinde stoma boyutlarına bağlı olarak azalmalar meydana gelmiştir ($p<0.05$, Çizelge 4.2.6, Şekil 4.2.6).

‘Ekşi Kara’ üzüm çeşidinde kolhisin uygulamaları stoma sayısında önemli bir azalmaya neden olmuştur ($p<0.05$, 4.2.6, Şekil 4.2.6). 5 g L^{-1} 48-s (106.29 adet mm^{-2}) ve

5 g L^{-1} 72-s (104.88 adet mm^{-2}) uygulamaları yapılan bitkilerin stoma yoğunluğunun kontrol bitkilerinden (167.48 adet mm^{-2}) önemli derecede düşük olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.2.5. Uygulamaların stoma genişliğine etkileri

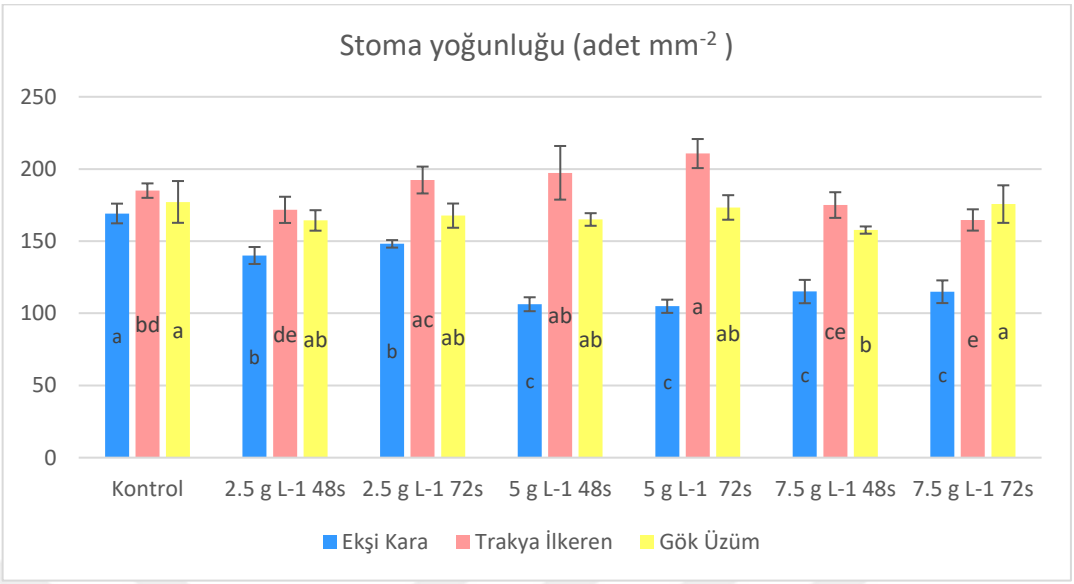
'Trakya İlkeren' çeşidinde uygulamalar stoma yoğunluğu değerlerini değişen oranlarda etkilemiştir. Kontrolde stoma yoğunluğu 185 adet mm^{-2} olarak belirlenirken stoma sayısında en fazla azalma 7.5 g L^{-1} 72-s (164.67 adet mm^{-2}) kolhisin uygulamasındadır (4.2.6, Şekil 4.2.6).

Çizelge 4.2.6. Uygulamaların stoma yoğunluğuna etkileri*

	Ekşi Kara	Trakya İlkeren	Gök Üzüm
Kontrol	169.16±6.82 a	185.00±5.00 bd	177.16±14.47 a
2.5 g L^{-1} 48 s	140.06±5.87 b	171.67±9.07 de	164.33±7.09 ab
2.5 g L^{-1} 72 s	148.12±2.59 b	192.33±9.29 ac	167.67±8.39 ab
5 g L^{-1} 48 s	106.29±4.82 c	197.33±18.58 ab	165.00±4.36 ab
5 g L^{-1} 72 s	104.88±4.58 c	210.67±10.07 a	173.33±8.50 ab
7.5 g L^{-1} 48	115.08±8.09 c	175.00±8.89 ce	157.67±2.52 b
7.5 g L^{-1} 72 s	114.95±7.86 c	164.67±7.37 e	175.67±13.01 a

*: Aynı sütunda farklı harflerle ifade edilen ortalamalar arasında Duncan çoklu karşılaştırma testine göre %5 düzeyinde farklılık vardır.

'Gök Üzüm' çeşidinde mm^2'ye düşen stoma sayısı, stoma boyutlarındaki değişime paralel olarak değişiklik göstermiştir. Kontrole göre (177.16 adet mm^{-2}) stoma yoğunluğunda en fazla azalma 7.5 g L^{-1} 48-s uygulamasında (157.67 adet mm^{-2}) kaydedilmiştir.



Şekil 4.2.6. Uygulamaların stoma yoğunluğu üzerine etkileri

4.2.5. Kloroplast sayımı (adet stoma^{-1}) sonuçları

Kolhisin uygulamaları ve 'Kyoho' üzüm çeşidi stoma bekçi hücreleri kloroplast sayıları arasındaki farklılığın önemli olduğu ve tüm kolhisin uygulamalarının kloroplast sayılarının 18-20 aralığında, tetraploid 'Kyoho' üzüm çeşidinin kloroplast sayılarının ise 38-40 aralığında olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.2.7, Şekil 4.2.7). Ancak, kolhisin uygulamaları yapılan bitki stomalarındaki kloroplast sayılarının kontrole göre değişiklik göstermediği kaydedilmiştir.

Çizelge 4.2.7 Uygulamaların kloroplast sayısı (adet stoma^{-1}) üzerine etkileri *

		Ekşi Kara		Trakya İlkeren		Gök Üzüm	
	Stoma Sayısı	Ortalama	Aralık	Ortalama	Aralık	Ortalama	Aralık
Kyoho	30	38.67±0.58 a	38-40	38.67±1.15 a	38-40	39.33±1.15 a	38-40
Kontrol	30	18.95±0.93 b	18-20	19.33±1.15 b	18-20	19.89±0.18 b	18-20
2.5 g L^{-1}48s	30	19.56±0.38 b	18-20	19.48±0.50 b	18-20	19.96±0.08 b	18-20
2.5 g L^{-1} 72s	30	19.33±0.33 b	18-20	19.90±0.09 b	18-20	19.40±0.69 b	18-20
5 g L^{-1} 48s	30	19.62±0.54 b	18-20	19.00±1.00 b	18-20	19.47±0.47 b	18-20
5 g L^{-1} 72s	30	19.33±1.15 b	18-20	18.67±1.15 b	18-20	19.87±0.23 b	18-20
7.5 g L^{-1} 48s	30	19.33±0.58 b	18-30	19.74±0.34 b	18-20	19.70±0.10 b	18-20
7.5 g L^{-1} 72s	30	19.52±0.50 b	18-20	19.95±0.09 b	18-20	19.33±1.15 b	18-20

*: Aynı sütunda farklı harflerle ifade edilen ortalamalar arasında Duncan çoklu karşılaştırma testine göre %5 düzeyinde farklılık vardır.

4.3. *In vivo* sürgün ucu kolhisin uygulamaları

4.3.1. Sürgün ucu canlılık oranı (%)

Kolhisin uygulamalarının *in vivo* koşullarda sürgün ucu canlılık oranlarına yaptıkları etkiler istatistiki olarak ($p<0.05$) önemli bulunmuştur. Sürgün ucu kuruma oranlarının çeşit bazında doz ve süre interaksiyonuna göre değişiklik göstermediği tespit edilmiştir. Bu sebeple uygulama bazında yapılan değerlendirmelere yer verilmiştir (Çizelge 4.3.1, Şekil 4.3.1).

'Ekşi Kara' üzüm çeşidinde kolhisin uygulamaları sürgün ucu canlılık oranlarını değişen oranlarda etkilemiştir. Sürgün ucu canlılık oranlarında azalış görülmekle birlikte azalışın doğrusal olmadığı belirlenmiştir. Kontrolde sürgün ucu canlılık oranları %100 iken toksik etki sonucu en fazla kuruma 2.5 g L^{-1} 24-s (%83.67) uygulamasında kaydedilmiştir (Çizelge 4.3.1, Şekil 4.3.1).

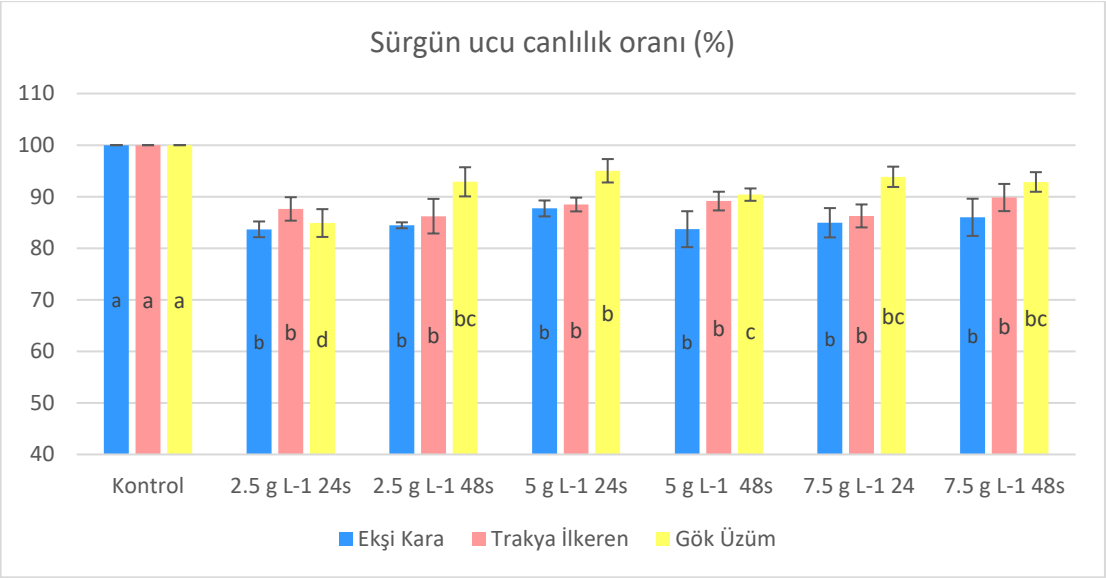
'Trakya İlkeren' üzüm çeşidinde sürgün ucu canlılık oranları kontrolde %100 olarak belirlenirken 2.5 g L^{-1} 24-s, 2.5 g L^{-1} 48-s, 5 g L^{-1} 24-s, 5 g L^{-1} 48-s, 7.5 g L^{-1} 24-s, 7.5 g L^{-1} 48-s, uygulamalarında sırasıyla %87.62, %86.22, %88.48, %89.15, %86.27, %89.84'tür (Çizelge 4.3.1, Şekil 4.3.1).

Çizelge 4.3.1 Uygulamaların sürgün ucu canlılık (%) oranına etkileri*

	Ekşi Kara	Trakya İlkeren	Gök Üzüm
Kontrol	100.00±0.00 a	100.00±0.00 a	100.00±0.00 a
2.5 g L^{-1} 24 s	83.67±1.53 b	87.62±2.27 b	84.89±2.70 d
2.5 g L^{-1} 48 s	84.45±0.57 b	86.22±3.36 b	92.88±2.83 bc
5 g L^{-1} 24 s	87.72±1.55 b	88.48±1.34 b	95.03±2.27 b
5 g L^{-1} 48 s	83.69±3.49 b	89.15±1.82 b	90.40±1.20 c
7.5 g L^{-1} 24 s	84.94±2.84 b	86.27±2.23 b	93.86±1.97 bc
7.5 g L^{-1} 48 s	86.00±3.61 b	89.84±2.64 b	92.85±1.90 bc

*: Aynı sütunda farklı harflerle ifade edilen ortalamalar arasında Duncan çoklu karşılaştırma testine göre %5 düzeyinde farklılık vardır.

'Gök Üzüm' çeşidinde 'Ekşi Kara' ve 'Trakya İlkeren' çeşitlerine nazaran kolhisin dozlarındaki artışla sürgün ucu zarar görme oranı daha azdır. Sürgün ucu canlılık oranları kontrolde %100 iken kolhisin uygulamaları arasında en düşük değer 2.5 g L^{-1} 24-s (%84.89) uygulamasındadır (Çizelge 4.3.1, Şekil 4.3.1).



Şekil 4.3.1. Uygulamaların sürgün ucu canlılığı üzerine etkileri

4.3.2. Sürgün uzunluğu (cm)

Kolhisin uygulamalarının sürgün uzunluğuna etkileri sürgün gelişmesinin durduğu dönemde (10 Eylül 2018) sürgünlerin boyutlarının ölçülmesiyle tespit edilmiştir. Sürgün uzunluğu değerlerine doz x süre interaksiyonunun etkileri istatistiki olarak önemlidir ($p<0.05$) (Çizelge 4.3.2).

'Ekşi Kara' çeşidinde 24 saat süre ile kolhisin uygulaması yapılmış bitkilerde kontrole göre sürgün uzunluğu değerlerinde azalma olduğu, 48 saat süreyle yapılan kolhisin uygulamaları değerlerinin ise kontrole göre istatistiki olarak farklılık göstermediği tespit edilmiştir (Çizelge 4.3.2). Sürgün uzunluğu değerleri artan kolhisin dozlarıyla birlikte doğrusal bir azalış göstermemiştir. Kontrolde sürgün uzunluğu 74.37 cm iken en kısa sürgün uzunluğu 59.69 değeri ile 2.5 g L^{-1} 24-s uygulamasındadır.

Çizelge 4.3.2. Uygulamaların sürgün uzunluğuna (cm) etkileri*

süre		Ekşi Kara	Trakya İlkeren	Gök Üzüm
24 s.	Kontrol	74.37±0.50 a	97.52±0.74 a	80.13±0.88 d
	2.5 g L^{-1}	59.69±4.94 b	87.93±2.85 ab	78.94±2.16 d
	5 g L^{-1}	60.22±2.04 b	83.72±1.97 b	83.78±3.27 cd
	7.5 g L^{-1}	74.61±2.80 a	71.42±3.97 c	115.11±6.81 ab
48 s.	2.5 g L^{-1}	73.60±3.00 a	87.11±2.69 b	93.28±0.25 b
	5 g L^{-1}	78.80±2.78 a	70.71±4.94 c	86.38±0.00 c
	7.5 g L^{-1}	71.18±3.50 a	86.07±6.54 b	94.61±1.02 b

*: Aynı sütunda farklı harflerle ifade edilen ortalamalar arasında Tukey karşılaştırma testine göre %5 düzeyinde farklılık vardır.

‘Trakya İlkeren’ üzüm çeşidinde farklı sürelerle kolhisin uygulamaları sürgün uzunluğunu değişen oranlarda etkilemiştir. Kontroldeki sürgün uzunluğu 97.52 cm olarak belirlenirken 5 g L^{-1} ve 7.5 g L^{-1} kolhisin dozlarının 24 ve 48 saat sürelerle sürgün ucuna uygulanmaları sonucunda sürgün gelişmesinin yavaşladığı kaydedilmiştir. 5 g L^{-1} 24-s, 5 g L^{-1} 48-s, 7.5 g L^{-1} 24-s, 7.5 g L^{-1} 48-s uygulamalarında sürgün boyları sırasıyla 83.72 cm, 70.71 cm, 71.42 cm, 86.07 cm’dir (Çizelge 4.3.2).

‘Gök Üzüm’ çeşidinde kolhisin uygulaması yapılan bitkilerin sürgün uzunluğu değerleri doğrusal bir azalış göstermemiştir. Kontrolde sürgün uzunluğu 80.13 cm olarak belirlenirken kolhisin uygulamaları arasında en düşük değer 24 saat süre ile 2.5 g L^{-1} kolhisin uygulamasında (78.94 cm) kaydedilmiştir (Çizelge 4.3.2).

4.3.3. Sürgün çapı (mm)

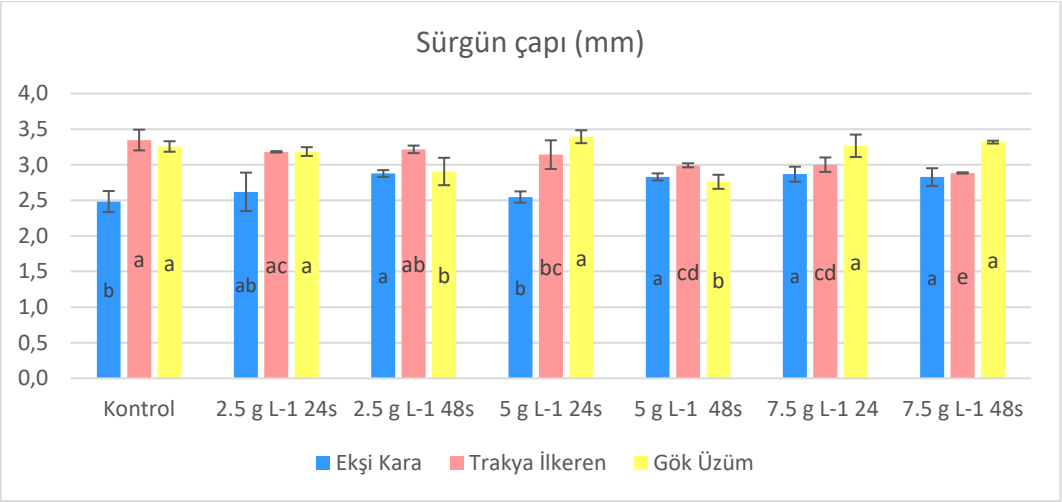
Kolhisin uygulamalarının sürgün çapına etkileri yaklaşık olarak vejetasyon sonunda (10 Eylül 2018) gelişen sürgünlerin üçüncü ve dördüncü boğum arası çapının ölçülmesiyle tespit edilmiştir. Sürgün çapı değerlerinin doz ve süre interaksiyonuna göre değişiklik göstermediği tespit edilmiştir. Bu sebeple uygulama bazında yapılan değerlendirmelere yer verilmiştir. Kolhisin uygulamalarının sürgün çapını (mm) değişen oranlarda etkilediği tespit edilmiştir (Çizelge 4.3.3, Şekil 4.3.2).

Çizelge 4.3.3. Uygulamaların sürgün çapına (mm) etkileri*

	Ekşi Kara	Trakya İlkeren	Gök Üzüm
Kontrol	2.48±0.15 b	3.35±0.15 a	3.26±0.07 a
2.5 g L^{-1} 24s	2.62±0.27 ab	3.18±0.01 ac	3.19±0.06 a
2.5 g L^{-1} 48s	2.88±0.05 a	3.22±0.05 ab	2.91±0.19 b
5 g L^{-1} 24s	2.55±0.08 b	3.14±0.20 bc	3.39±0.09 a
5 g L^{-1} 48s	2.83±0.05 a	2.99±0.03 cd	2.76±0.10 b
7.5 g L^{-1} 24	2.87±0.11 a	3.00±0.10 cd	3.27±0.16 a
7.5 g L^{-1} 48s	2.83±0.12 a	2.89±0.02 e	3.32±0.02 a

*: Aynı sütunda farklı harflerle ifade edilen ortalamalar arasında Duncan çoklu karşılaştırma testine göre %5 düzeyinde farklılık vardır.

‘Ekşi Kara’ çeşidinde kontrolde sürgün çapı 2.48 mm iken kolhisin uygulamalarında sırasıyla 2.62 mm, 2.88 mm, 2.55 mm, 2.83 mm, 2.87 mm, 2.83 mm’dir. Kolhisin uygulamalarıyla sürgün çapı değerlerinde doğrusal bir azalma ya da artış olmadığı kaydedilmiştir (Çizelge 4.3.2, Şekil 4.3.2).



Şekil 4.3.2 Uygulamaların sürgün çapına etkileri

'Trakya İlkeren' çeşidinde sürgün çapının kolhisin uygulamalarından etkilenerek azalış gösterdiği görülmüştür. Kontrolde sürgün çapı 3.35 mm olarak belirlenirken en düşük sürgün çapı değerleri sırasıyla 5 g L^{-1} 48-s (2.99 mm) ve 7.5 g L^{-1} 48-s (2.89 mm) uygulamalarında kaydedilmiştir (Çizelge 4.3.3, Şekil 4.3.2).

'Gök Üzüm' çeşidinde kolhisin uygulamaları sürgün çapını değişen oranlarda etkilemiştir. Sürgün çapı kontrolde 3.26 mm iken 2.5 g L^{-1} 48-s uygulamasında 2.91 mm'dir (Çizelge 4.3.3, Şekil 4.3.2).

4.3.4. Stoma uzunluk (µm), genişlik (µm) ve yoğunluk (adet mm^{-2}) gözlemleri

Stoma uzunluk (µm) ve genişlik (µm) değerleri yaprak epidermal izlerinde mikroskobik ölçümlerle belirlenmiştir. Yapılan ölçümler sonucunda doz x süre interaksiyonunun stoma özellikleri üzerine etkileri istatistiki olarak önemli ($p<0.05$) bulunmuştur (Çizelge 4.3.4).

'Ekşi Kara' çeşidinde stoma uzunluğu değerleri 2.5 g L^{-1} ve 7.5 g L^{-1} dozlarının 24 ve 48 saat süre uygulaması sonucunda kontrole (19.73 µm) göre artış göstermiştir. 5 g L^{-1} uygulamasında kontrole göre azalış (19.10 µm) olduğu tespit edilmiştir. En yüksek stoma uzunlukları sırasıyla 7.5 g L^{-1} 48-s (22.47 µm) ve 2.5 g L^{-1} 24-s (22.23 µm) uygulamalarında kaydedilmiştir (Çizelge 4.3.4).

'Trakya İlkeren' çeşidinde stoma uzunluğu kontrolde 20.37 µm'dir. 2.5 g L^{-1} ve 7.5 g L^{-1} dozlarının 24 ve 48 saat süre ile uygulanmalarıyla stoma uzunluğu değerlerinde artış olmuştur. En yüksek stoma uzunluğu değerleri sırasıyla 7.5 g L^{-1} 24-s (24.17 µm) ve 7.5 g L^{-1} 48-s (22.68 µm) uygulamalarında belirlenmiştir (Çizelge 4.3.4).

Çizelge 4.3.4 Uygulamaların stoma uzunluğuna (µm) etkileri*

Süre		Ekşi Kara	Trakya İlkeren	Gök Üzüm
24-s	Kontrol	19.73±0.28 cd	20.37±0.58 e	20.57±0.43 cd
	2.5 g L^{-1}	22.23±0.64 a	22.01±0.55 bd	26.23±2.43 a
	5 g L^{-1}	19.10±0.63 d	20.67±0.20 de	18.61±0.48 d
	7.5 g L^{-1}	20.94±0.38 b	24.17±0.59 a	23.81±0.81 ab
48-s	2.5 g L^{-1}	20.13±0.45 c	22.17±0.04 bc	19.64±0.14 d
	5 g L^{-1}	20.90±0.17 b	20.86±0.08 ce	20.65±1.08 cd
	7.5 g L^{-1}	22.47±0.23 a	22.68±0.73 b	23.17±0.05 bc

*: Aynı sütunda farklı harflerle ifade edilen ortalamalar arasında Tukey karşılaştırma testine göre %5 düzeyinde farklılık vardır.

'Gök Üzüm' çeşidinde kolhisin uygulamaları stoma uzunluğu değerlerini farklı oranlarda etkilemiştir. Kontrolde stoma genişliği 20.57 µm olarak belirlenirken 2.5 g L^{-1} 24-s (26.23 µm) kolhisin uygulamasında kontrole göre stoma uzunluğunda artış olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.3.4).

Faklı dozlardaki kolhisin uygulamalarının stoma genişliklerine (µm) etkilerinin tüm asma genotiplerinde önemli ($p<0.05$) olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.3.5).

'Ekşi Kara' çeşidinde stoma uzunluğu değerlerindeki artışa paralel olarak 7.5 g L^{-1} kolhisin dozunun 48 saat süre ile uygulanması ile kontrole (15.45 µm) göre stoma genişliği değeri (17.16 µm) artış göstermiştir (Çizelge 4.3.5).

'Trakya İlkeren' çeşidinde stoma genişliği kontrolde 15.20 µm'dir. 7.5 g L^{-1} kolhisin 48 saat süre ile uygulanmasıyla stoma uzunluğu değerleri (16.56 µm) kontrole göre artış göstermiştir. En düşük stoma genişliği değeri 2.5 g L^{-1} 24-s (13.97 µm) uygulamasında kaydedilmiştir (Çizelge 4.3.5).

Çizelge 4.3.5. Uygulamaların stoma genişliği (µm) üzerine etkileri*

Süre		Ekşi Kara	Trakya İlkeren	Gök Üzüm
24-s	Kontrol	15.45±0.40 bc	15.20±0.18 bc	15.67±1.11 ac
	2.5 g L^{-1}	15.09±0.32 bc	13.97±0.08 d	17.61±1.60 a
	5 g L^{-1}	13.88±0.08 d	14.80±0.43 c	13.81±0.61 c
	7.5 g L^{-1}	15.87±0.76 b	16.56±0.15 a	15.96±0.73 ac
48-s	2.5 g L^{-1}	15.39±0.23 bc	15.78±0.15 ab	14.90±0.29 bc
	5 g L^{-1}	14.45±0.13 cd	15.82±0.17 ab	17.35±0.68 ab
	7.5 g L^{-1}	17.16±0.21 a	15.12±0.60 bc	15.84±0.14 ac

*: Aynı sütunda farklı harflerle ifade edilen ortalamalar arasında Tukey karşılaştırma testine göre %5 düzeyinde farklılık vardır.

'Gök Üzüm' çeşidinde kolhisin uygulamaları stoma genişliği değerlerini değişen oranlarda etkilemiştir. Kontrolde stoma genişliği 15.67 µm olarak belirlenirken 2.5 g L^{-1}

24-s (17.61 µm) kolhisin uygulamasında kontrole göre stoma uzunluğunda artış olduğu kaydedilmiştir. 2.5 g L^{-1} 24-s uygulamasına en yakın değer 5 g L^{-1} 48-s (17.35 µm) uygulamasındadır (Çizelge 4.3.5).

'Ekşi Kara', 'Trakya İlkeren', Gök Üzüm' çeşitlerinde kolhisin uygulamaları ve süre kombinasyonlarının birim alana düşen stoma sayısına etkileri istatistiki olarak önemlidir (Çizelge 4.3.6).

Çizelge 4.3.6. Uygulamaların stoma yoğunluğu (adet mm^{-2}) üzerine etkileri*

Süre		Ekşi Kara	Trakya İlkeren	Gök Üzüm
24-s	Kontrol	525.97±17.78 a	543.48±21.74 a	506.58±13.17 ab
	2.5 g L^{-1}	423.92±5.40 c	510.57±13.85 a	492.83±9.50 bc
	5 g L^{-1}	297.10±33.21 d	425.69±5.47 cd	462.58±4.55 cd
	7.5 g L^{-1}	482.67±7.57 ab	468.33±5.00 b	528.83±11.05 a
48-s	2.5 g L^{-1}	452.09±5.71 bc	420.96±0.93 cd	453.47±10.76 d
	5 g L^{-1}	498.79±4.56 a	447.69±6.81 bc	433.91±2.97 d
	7.5 g L^{-1}	498.43±10.85 a	408.11±12.58 d	452.23±19.17 d

*: Aynı sütunda farklı harflerle ifade edilen ortalamalar arasında Tukey karşılaştırma testine göre %5 düzeyinde farklılık vardır.

'Ekşi Kara' üzüm çeşidinde kolhisin uygulamaları stoma sayılarında önemli bir düşüşe neden olmuştur ($p < 0.05$). Stoma yoğunluğu kontrolde 525.97 adet mm^{-2} iken en düşük stoma yoğunluğu değeri (297.10 adet mm^{-2}) 5 g L^{-1} kolhisin dozunun 24 saat süre ile uygulanması ile elde edilmiştir (Çizelge 4.3.6).

'Trakya İlkeren' çeşidinde stoma yoğunluğu kontrolde 543.48 adet mm^{-2}'dir. Stoma boyutlarındaki artışla ters orantılı olarak 7.5 g L^{-1} kolhisin dozunun 48 saat süre ile uygulanmasıyla stoma yoğunluğu değeri (408.11 adet mm^{-2}) kontrole göre azalış göstermiştir. Kolhisin uygulama süresi arttıkça stoma sayısı azalmıştır (Çizelge 4.3.6).

'Gök Üzüm' çeşidinde kolhisin uygulamalarının stoma yoğunluğunu değişen oranlarda etkilediği tespit edilmiştir. Kontrolde stoma yoğunluğu 506.58 adet mm^{-2} olarak belirlenirken en düşük stoma yoğunluğu değeri 5 g L^{-1} 48-s (433.91 adet mm^{-2}) uygulamasında belirlenmiştir (Çizelge 4.3.6).

4.3.5. Kloroplast sayımı (adet $stoma^{-1}$) sonuçları

Kolhisin uygulamaları ve 'Kyoho' üzüm çeşidi stoma bekçi hücreleri kloroplast sayıları arasındaki farklılığın önemli olduğu ve kolhisin uygulamalarının kloroplast sayılarının 18-26 aralığında, tetraploid 'Kyoho' üzüm çeşidi kloroplast sayılarının ise 38-40 aralığında olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.3.7). Kolhisin uygulamalarında doz

bazında bitki stomalarındaki kloroplast sayılarının kontrole göre değişiklik gösterdiği tespit edilmiştir. ‘Trakya İlkeren’ ve ‘Gök Üzüm’ çeşitlerinde kolhisin uygulamaları sonucu kloroplast sayılarının kontrol bitkisiyle paralellik gösterdiği (18-20) belirlenmiştir (Çizelge 4.3.7).

Çizelge 4.3.7. Uygulamaların kloroplast sayısı (adet stoma^{-1}) üzerine etkileri*

		Ekşi Kara		Trakya İlkeren		Gök Üzüm	
	Stoma Sayısı	Ortalama	Aralık	Ortalama	Aralık	Ortalama	Aralık
Kyoho	30	38.50±0.50 a	38-40	38.75±1.09 a	38-40	38.33±0.58 a	38-40
Kontrol	30	19.73±0.28 ef	18-20	20.53±0.42 bc	18-22	20.05±0.23 d	18-22
2.5 g L^{-1} 24s	30	24.92±1.01 b	18-26	20.45±0.08 bc	18-22	19.71±0.25 d	18-22
2.5 g L^{-1} 48s	30	20.42±0.05 e	18-22	20.25±0.12 bc	18-22	20.88±0.39 c	18-22
5 g L^{-1} 24s	30	21.34±0.15 d	18-22	20.91±0.21 b	18-22	21.76±0.48 b	18-22
5 g L^{-1} 48s	30	20.26±0.09 ef	18-22	20.29±0.15 bc	18-22	20.06±0.26 d	18-22
7.5 g L^{-1} 24s	30	23.11±0.12 c	18-28	20.20±0.00 bc	18-22	20.03±0.20 d	18-22
7.5 g L^{-1} 48s	30	19.58±0.04 f	18-20	19.84±0.01 c	18-22	20.83±0.15 c	18-22

*: Aynı sütunda farklı harflerle ifade edilen ortalamalar arasında Duncan çoklu karşılaştırma testine göre %5 düzeyinde farklılık vardır.

‘Ekşi Kara’ üzüm çeşidinde kolhisin uygulamaları kloroplast sayılarını doz bazında arttırmıştır. Stoma bekçi hücrelerinde görülen toplam kloroplast sayısı en düşük kontrolde (19.73 adet stoma^{-1}) belirlenirken en yüksek değer 24.92 değeri ile 2.5 g L^{-1} 24-s uygulamasında kaydedilmiştir (Çizelge 4.3.7).

4.4. *In vitro* kolhisin uygulamaları sonuçları

4.4.1. Canlılık oranı (%)

In vitro koşullarda köklendirme aşamasında 10 mg L^{-1}, 20 mg L^{-1}, 30 mg L^{-1} dozlarında kolhisin uygulaması yapılmış mikro çeliklerde canlılık oranları (%) belirlenmiştir. Uygulamaların canlılık oranlarına etkileri istatistiki olarak önemli ($p<0.05$) bulunmuştur (Çizelge 4.4.1, Şekil 4.4.1).

‘Ekşi Kara’, ‘Trakya İlkeren’, ‘Gök Üzüm’ çeşitlerinde kolhisin uygulamalarındaki artışla ters orantılı olarak mikro çeliklerin canlılık oranları azalış göstermiştir. Tüm çeşitlerde en düşük canlılık oranları 30 mg L^{-1} kolhisin uygulamalarında kaydedilmiştir. ‘Ekşi Kara’ üzüm çeşidinde kontrolde canlılık oranları %89.48 iken en düşük canlılık oranları 30 mg L^{-1} kolhisin uygulamasında (%45.67) tespit edilmiştir. ‘Trakya İlkeren’ çeşidinin *in vitro* koşullarda hassasiyet göstermesi sebebiyle kolhisin uygulamalarına tepkisi diğer iki çeşide oranla daha yüksektir (Çizelge 4.4.1).

Çizelge 4.4.1. Uygulamaların canlılık oranlarına (%) etkileri *

	Kültüre alınan mikro çelik sayısı	Ekşi Kara	Trakya İlkeren	Gök üzüm
Kontrol	60	89.48±1.78 a	84.76±0.67 a	93.67±1.53 a
10 mg L^{-1}	60	63.49±2.17 b	56.00±3.61 b	74.48±2.81 b
20 mg L^{-1}	60	52.05±3.63 c	42.00±2.00 c	52.60±2.16 c
30 mg L^{-1}	60	45.67±2.08 d	37.92±2.79 c	46.43±3.12 d

*: Aynı sütunda farklı harflerle ifade edilen ortalamalar arasında Duncan çoklu karşılaştırma testine göre %5 düzeyinde farklılık vardır.



Şekil 4.4.1. Kolhisin uygulaması sonrası mikro çelikte kuruma

4.4.2. Gelişme oranı (%)

In vitro koşullarda köklendirme aşamasında 10 mg L^{-1}, 20 mg L^{-1}, 30 mg L^{-1} dozlarında kolhisin uygulaması yapılmış mikro çeliklerde gelişme oranları (%) belirlenmiş ve istatistiki olarak önemli ($p<0.05$) bulunmuştur (Çizelge 4.4.2).

Çizelge 4.4.2. Uygulamaların gelişme oranına (%) etkileri *

	Ekşi Kara	Trakya İlkeren	Gök üzüm
Kontrol	92.48±0.50 a	90.73±0.73 a	94.12±1.02 a
10 mg L^{-1}	55.25±1.64 b	43.00±1.00 b	51.67±1.53 b
20 mg L^{-1}	41.75±1.64 c	42.67±2.52 b	44.00±4.00 c
30 mg L^{-1}	32.00±5.29 d	35.78±2.91 c	35.15±5.69d

*: Aynı sütunda farklı harflerle ifade edilen ortalamalar arasında Duncan çoklu karşılaştırma testine göre %5 düzeyinde farklılık vardır.

‘Ekşi Kara’, ‘Trakya İlkeren’, ‘Gök Üzüm’ çeşitlerinde kolhisin uygulamalarındaki artışa ters orantılı olarak mikro çeliklerin gelişme oranları azalmıştır. Tüm çeşitlerde 30 mg L^{-1} kolhisin uygulaması yapılmış mikro çeliklerde kontrole göre gelişme yavaşlamıştır. ‘Ekşi Kara’, ‘Trakya İlkeren’, ‘Gök Üzüm’ çeşitlerinde 30 mg L^{-1} kolhisin uygulamasında belirlenen gelişme oranları sırasıyla %32.00, %35.78, %35.15 olarak kaydedilmiştir (Çizelge 4.4.2).

4.4.3. Stoma uzunluk (µm), genişlik (µm) ve yoğunluk (adet mm^{-2}) gözlemleri

4.4.3.1. Stoma uzunluğu (µm)

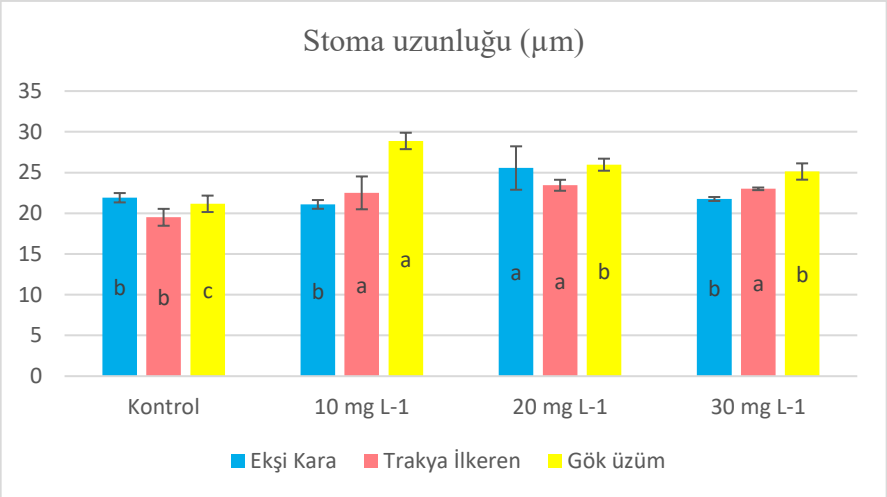
Kolhisin uygulaması yapılmış bitkilerde uygulamaların stoma uzunluğu üzerine etkileri istatistiki ($p<0.05$) olarak önemli bulunmuştur (Çizelge 4.4.3, Şekil 4.4.2). Çeşit bazında dozların stoma yoğunluğu üzerine etkilerinin değişken olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.4.3. Uygulamaların stoma uzunluğu üzerine etkisi*

	Ekşi Kara	Trakya İlkeren	Gök üzüm
Kontrol	21.91±0.57 b	19.50±1.01 b	21.16±1.04 c
10 mg L^{-1}	21.09±0.54 b	22.50±1.01 a	28.88±2.02 a
20 mg L^{-1}	25.55±2.67 a	23.44±0.74 a	25.96±0.68 b
30 mg L^{-1}	21.75±0.24 b	23.00±1.00 a	25.13±0.16 b

*: Aynı sütunda farklı harflerle ifade edilen ortalamalar arasında Duncan çoklu karşılaştırma testine göre %5 düzeyinde farklılık vardır.

'Ekşi Kara' üzüm çeşidinde 20 mg L^{-1} kolhisin uygulamasında stoma uzunluğu 25.55 µm olarak belirlenirken kontrolde stoma boyu 21.91 µm'dir (Çizelge 4.4.3, Şekil 4.4.2).



Şekil 4.4.2. Uygulamaların stoma uzunluğuna etkileri

'Trakya İlkeren' üzüm çeşidinde kolhisin dozundaki artışa paralel olarak stoma uzunluk değerlerinde artmıştır. En düşük stoma boyu kontrolde (19.50 µm) belirlenirken, en yüksek değer 20 mg L^{-1} kolhisin dozunda (23.44 µm) tespit edilmiştir (Çizelge 4.4.3, Şekil 4.4.2).

‘Gök üzüm’ çeşidinde kontrolde stoma boyu 21.16 µm’dir. En kısa stoma boyu kontrolde belirlenirken en uzun stoma 10 mg L^{-1} (28.88) kolhisin uygulamasında kaydedilmiştir (Çizelge 4.4.3, Şekil 4.4.2).

4.4.3.2. Stoma genişliği (µm)

Kolhisin uygulaması yapılmış bitkiciklerde uygulamaların stoma genişliği üzerine etkileri istatistiki olarak ($p<0.05$) önemli bulunmuştur. Kolhisin dozundaki artışla doğrusal olarak stoma genişliği değerlerinde de yükselme olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.4.4, Şekil 4.4.3).

‘Ekşi Kara’ üzüm çeşidinde stoma eni kontrolde 15.31 µm’dir. Kontrole kıyasla en geniş stoma boyutları sırasıyla 20 mg L^{-1} (19.55 µm) ve 30 mg L^{-1} (17.17 µm) kolhisin dozlarında tespit edilmiştir (Çizelge 4.4.4, Şekil 4.4.3).

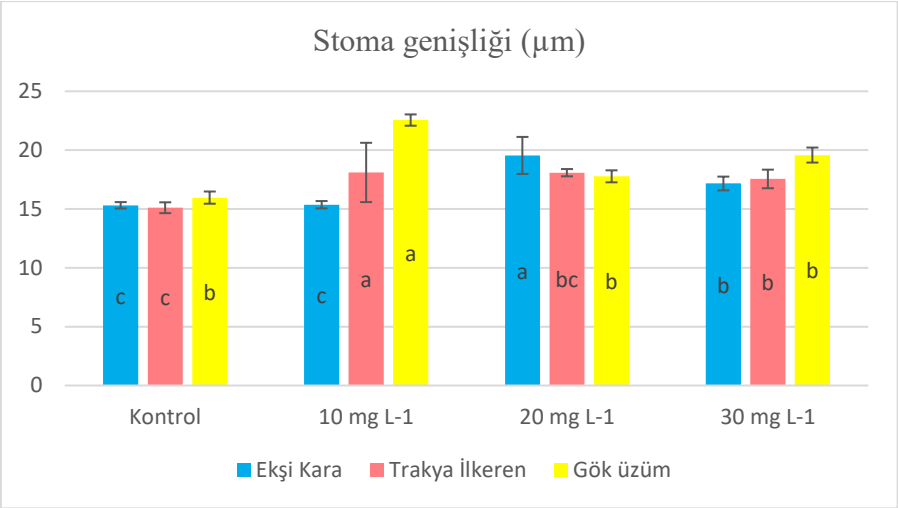
‘Trakya İlkeren’ üzüm çeşidinde en düşük (15.11 µm) stoma genişliği değeri kontroldedir Kolhisin uygulamalarında stoma genişliği değerleri sıralaması 10 mg L^{-1} (18.11 µm), 20 mg L^{-1} (18.08 µm), 30 mg L^{-1} (17.55 µm) şeklindedir (Çizelge 4.4.4, Şekil 4.4.3).

Çizelge 4.4.4. Uygulamaların stoma genişliği üzerine etkisi *

	Ekşi Kara	Trakya İlkeren	Gök üzüm
Kontrol	15.31±0.27 c	15.11±0.52 b	15.97±0.46 c
10 mg L^{-1}	15.36±0.31 c	18.11±0.52 a	22.56±2.52 a
20 mg L^{-1}	19.55±1.57 a	18.08±0.48 a	17.77±0.31 bc
30 mg L^{-1}	17.17±0.58 b	17.55±0.64 a	19.58±0.79 b

*: Aynı sütunda farklı harflerle ifade edilen ortalamalar arasında Duncan çoklu karşılaştırma testine göre %5 düzeyinde farklılık vardır.

‘Gök üzüm’ çeşidinde kontrolde stoma genişliği 15.97 µm olarak kaydedilmiştir. En düşük stoma genişliği kontrolde belirlenirken en geniş stoma 10 mg L^{-1} (22.56) kolhisin uygulamasındadır (Çizelge 4.4.4, Şekil 4.4.3).



Şekil 4.4.3. Uygulamaların stoma genişliğine etkileri

4.4.1.3. Stoma yoğunluğu (adet mm^{-2})

In vitro kolhisin uygulamaların stoma yoğunluğu üzerine etkileri istatistiki olarak önemli bulunmuştur. Mikroskobik gözlemler sonucunda birim alana düşen stoma sayısı stoma uzunluğu ve genişliği değerlerindeki artışa bağlı olarak azalış göstermiştir (Çizelge 4.4.5. Şekil 4.4.4).

'Ekşi Kara' üzüm çeşidinde stoma yoğunluğu en yüksek kontrolde (420.29 adet mm^{-2}) kaydedilmiştir. Stoma boyutlarındaki artışa bağlı olarak stoma yoğunluklarında belirgin bir azalma meydana gelmiştir. Uygulamalardan elde edilen stoma yoğunlukları sırasıyla, 10 mg L^{-1} (214.78 adet mm^{-2}), 20 mg L^{-1} (249.41 adet mm^{-2}), 30 mg L^{-1} (264.83 adet mm^{-2}) olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.4.5, Şekil 4.4.4).

Çizelge 4.4.5. Uygulamaların stoma yoğunluğu (adet mm^{-2}) üzerine etkileri*

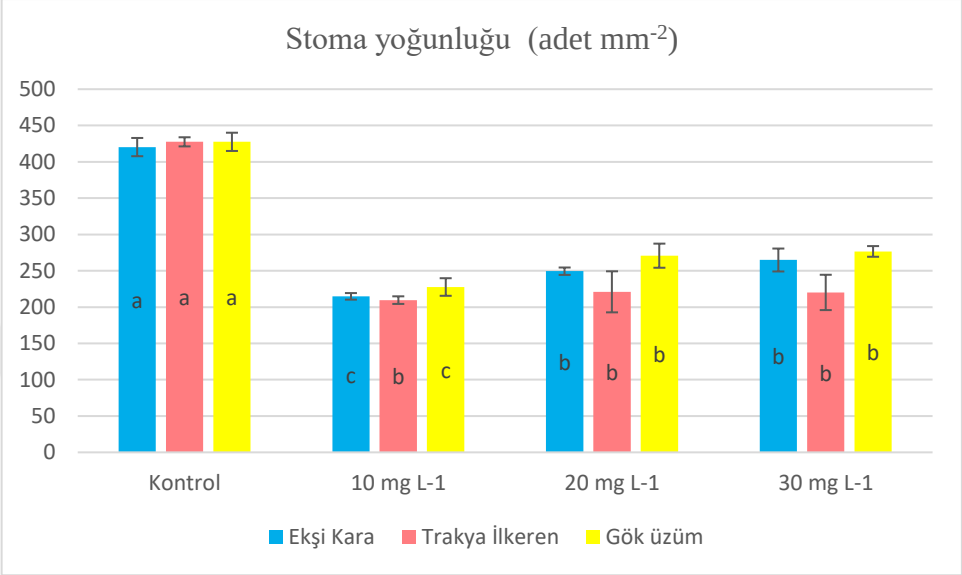
	Ekşi Kara	Trakya İlkeren	Gök üzüm
Kontrol	420.29±12.55 a	427.54±12.55 a	427.54±6.28 a
10 mg L^{-1}	214.78±4.52 c	209.60±12.11 b	227.66±5.23 c
20 mg L^{-1}	249.41±5.09 b	221.01±16.60 b	270.77±28.25 b
30 mg L^{-1}	264.83±15.77 b	220.20±7.34 b	276.63±24.32 b

*: Aynı sütunda farklı harflerle ifade edilen ortalamalar arasında Duncan çoklu karşılaştırma testine göre %5 düzeyinde farklılık vardır.

'Trakya İlkeren' üzüm çeşidinde kolhisin uygulamalarının stoma uzunluğu (µm) ve genişliğiyle (µm) orantılı olarak stoma sayısında önemli bir düşüşe neden oldukları kaydedilmiştir (Çizelge 4.3.5, Şekil 4.3.4). 10 mg L^{-1} uygulaması yapılan bitkiciklerin

stoma yoğunluğu (209.60 adet mm^{-2}) kontrolden (427.54 adet mm^{-2}) önemli derecede düşüktür.

'Gök Üzüm' çeşidinde kontrolde stoma yoğunluğu 427.54 adet mm^{-2} iken en düşük stoma yoğunluğu 10 mg L^{-1} (227.66 adet mm^{-2}) kolhisin uygulamasında tespit edilmiştir (Çizelge 4.4.5, Şekil 4.4.4).



Şekil 4.4.4. Uygulamaların stoma yoğunluğuna etkileri

4.4.4. Bitkiciklerde kloroplast sayımı (adet $stoma^{-1}$) sonuçları

Kolhisin uygulaması yapılmış bitkiciklerde uygulamaların kloroplast sayıları üzerine etkileri istatistiki olarak ($p<0.05$) önemli bulunmuştur. Kolhisin uygulaması yapılmış bitkilerin ploidi düzeyini karşılaştırmak amacıyla tetraploid 'Kyoho' üzüm çeşidi kullanılmıştır. 'Kyoho' üzüm çeşidinin *in vitro* koşullarda mikro çoğaltımı yapılmış olup herhangi bir uygulamaya tabi tutulmamıştır. Kolhisin uygulamaları ve 4x 'Kyoho' üzüm çeşidi stoma bekçi hücreleri kloroplast sayıları arasındaki farklılığın önemli olduğu belirlenmiştir. Uygulama yapılmış bitkilerde kloroplast aralığının kolhisin dozlarına göre değişiklik gösterdiği tespit edilmiştir. Kolhisin dozlarında kloroplast sayı değerleri 18-38 aralığındadır, tetraploid 'Kyoho' üzüm çeşidinde ise 38-40 aralığında değişim göstermiştir (Çizelge 4.4.6).

'Ekşi Kara' üzüm çeşidinde kolhisin uygulamaları kloroplast sayılarını doz bazında arttırmıştır. Stoma bekçi hücrelerinde görülen toplam kloroplast sayısı en düşük kontrolde (19.76 adet $stoma^{-1}$) belirlenirken en yüksek değer (23.44 adet $stoma^{-1}$) 20 mg L^{-1} dozunda kaydedilmiştir (Çizelge 4.4.6).

Çizelge 4.4.6. Uygulamaların kloroplast sayısına etkileri*

		Ekşi Kara		Trakya İlkeren		Gök Üzüm	
	Stoma Sayısı	Ortalama	Aralık	Ortalama	Aralık	Ortalama	Aralık
Kyoho	30	38.67±1.15a	38-40	39.33±1.15a	38-40	39.33±0.58a	38-40
Kontrol	30	19.76±0.42c	18-20	19.28±1.11b	18-20	20.94±0.48c	18-22
10 mg L^{-1}	30	22.95±0.47b	18-24	20.33±1.53b	18-22	24.91±2.60b	18-38
20 mg L^{-1}	30	23.44±3.01b	18-38	20.26±0.68b	18-22	25.45±2.24b	18-38
30 mg L^{-1}	30	21.58±2.74c	18-22	20.26±1.01b	18-22	24.41±1.31c	18-38

*: Aynı sütunda farklı harflerle ifade edilen ortalamalar arasında Duncan çoklu karşılaştırma testine göre %5 düzeyinde farklılık vardır.

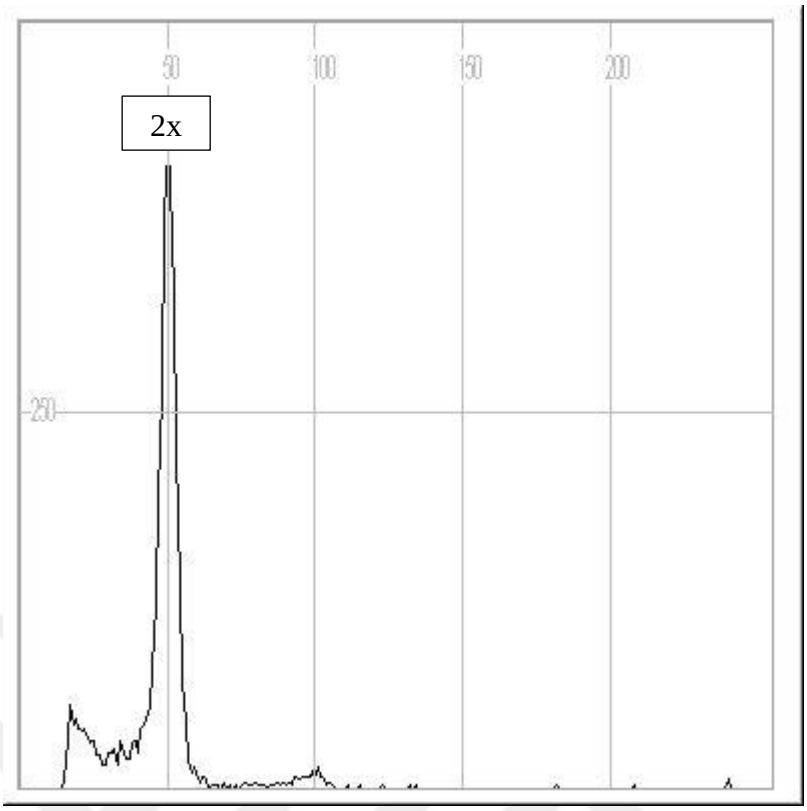
'Trakya İlkeren' üzüm çeşidinde kloroplast sayılarının kolhisin dozlarından etkilenmediği bu değerlerin çoğunlukla diploid kontrol bitkilere eşdeğer olduğu tespit edilmiştir. Kontrol bitkiciklerde kloroplast sayısı 19.28 adet $stoma^{-1}$ iken uygulamalar arasında en yüksek kloroplast sayısı 10 mg L^{-1} (20.33 adet $stoma^{-1}$) kolhisin uygulamasındadır (Çizelge 4.4.6).

'Gök Üzüm' çeşidinde kolhisin uygulamalarının kloroplast sayılarını doz bazında arttırdığı tespit edilmiştir. En düşük kloroplast sayısı 20.94 adet $stoma^{-1}$ olarak kontrolde belirlenirken en yüksek oran 20 mg L^{-1} (25.45 adet $stoma^{-1}$) kolhisin uygulamasında kaydedilmiştir (Çizelge 4.4.6).

Kloroplast sayımları sonucunda kontrole göre farklılık olduğu tespit edilen bitkiciklerde, aklimitizasyon başarısının düşük olması sebebiyle FC analizi gerçekleştirilememiştir.

4.4.5. Flow sitometri (FC) analizi sonuçları

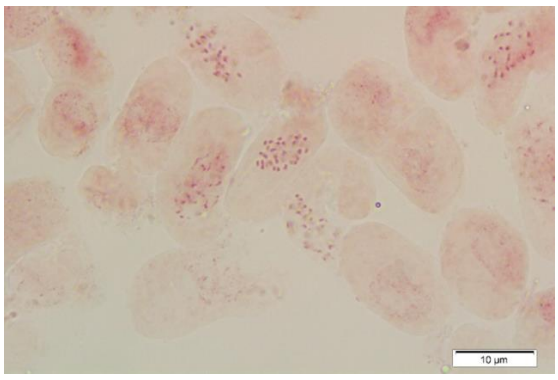
In vitro kolhisin uygulaması yapılmış bitkiciklerde dış koşullara aktarma sonucunda canlılığını devam ettiren bitkiciklerde kloroplast sayımları temel alınarak FC analizi yapılmıştır. Az sayıda bitki örneğinde yapılan analizler sonucunda genotiplerin ploidi seviyesinin diploidlerine oranla değişiklik göstermediği belirlenmiştir (Şekil 4.4.5).



Şekil 4.4.5. ‘Ekşi Kara’ çeşidinde 20 mg L^{-1} kolhisin uygulamasında diploid bitki örneğinin FC analiz sonucu

4.5. Kromozom Sayımı

‘Trakya İlkeren’ çeşidinde birinci yıl kotiledon uygulamalarında kloroplast sayımı ve FC analizi sonucunda orijinal diploidlerinden farklılık göstermediği tespit edilen 1 g L^{-1} kolhisin uygulaması yapılmış bitkinin kök ucu örneğinde kromozom sayısı 2n=38 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.5.1).



Şekil 4.5.1. ‘Trakya İlkeren’ (1 g L^{-1}) çeşidi kromozom örneği

Ploidi seviyesin değiştiği kloroplast sayımı ve FC analizi ile tespit edilen örneklerde sonbahar dönemine girilmesi nedeniyle aktif kök büyümesi yeterli düzeyde gerçekleşmediği için kromozom sayım işlemi gerçekleştirilememiştir. Materyal iklim odasına alınmış olup hazırlık çalışmaları devam etmektedir.

4.6. Tartışma

4.6.1. Sürgün ucu canlılık oranı (%)

Bahçe bitkilerinde, kolhisin uygulamalarıyla ploidinin uyarılması için yaprak taslakları çıkartılarak elde edilen sürgün ucu meristematik dokuları sıklıkla kullanılmaktadır (Dutt ve ark., 2007; Suzue ve ark., 2009). Sürgün ucu, meristematik hücreleri genetik değişimlerden daha az etkilenmeleri sebebiyle rejenerasyon çalışmalarında tercih edilmektedir (Sinski ve ark., 2014). Asmada, α ve β tübülinin asidik izoformları tomurcuklarda bulunurken daha bazik formları çiçek, sülük ve yapraklarda bulunmaktadır. Somatik embriyo ve sürgün uçları gibi eksplant kaynaklarında mikrotübüllerin farklı tübülin bileşiminde olmaları nedeniyle, eksplant kaynaklarının kolhisin ve orizaline karşı duyarlılık seviyeleri değişebilmektedir (Parrotta ve ark., 2010; Sinski ve ark., 2014). Mutasyonun neden olduğu hasar tunika ya da corpus hücrelerinde lokalize, dağılmış veya meristem boyunca eşit olarak dağılmakta ve türler arasında farklılık göstermektedir. Çoğu türde mutajenik etkili uygulamaların yapılmasıyla sürgün ucu bölgesinin zarar görmesi sonucunda koltuk sürgünlerinde sürme gerçekleştiği bildirilmiştir (Sekiguchi ve ark., 1971). Asmada da sürgün ucu bölgesine antimitotik kimyasalların uygulanması sonucunda, kullanılan kimyasalın toksik etki yapması nedeniyle sürgün ucunda kurumalar meydana geldiği bilinmektedir (Ekbiç ve Tangolar, 2016; He ve ark., 2016; Kara ve ark., 2018a; Kara ve ark., 2018b). Yaptığımız çalışmada antimimotik ajan olarak kolhisin kullanılmıştır. Bitkisel materyal olarak yöresel ‘Ekşi Kara’ ve ‘Gök Üzüm’ çeşitleri ile son yıllarda ıslah edilmiş üzüm çeşitleri arasında popüler olan ‘Trakya İlkeren’ üzüm çeşidi kullanılmıştır. Bitki materyallerinin antimitotik ajanlara *in vivo* ve *in vitro* koşullarda tepkilerinin farklı olduğuna yönelik önceki çalışmalar dikkate alınarak deneme *in vivo* ve *in vitro* koşullarda yürütülmüştür. Denemeden elde ettiğimiz veriler üzerindeki değerlendirmelere göre konsantrasyonlarındaki artışla birlikte sürgün ucu canlılık oranları, uygulama materyali ve doz-süre kombinasyonlarına bağlı olarak tüm çeşitlerde negatif yönde etkilenmiştir. *In*

vivo uygulamalar içerisinde en düşük sürgün ucu canlılık oranları ‘Ekşi Kara’ üzüm çeşidi fidelerinde kotiledon aşamasında ikinci yıl yapılan 4 g L^{-1} kolhisin uygulanmasında (%31.77) belirlenmiştir (Çizelge 4.1.6). Hızlı gelişme döneminde yapılan kolhisin uygulamaları sonucunda sürgün ucu canlılık oranlarının doz ve süre ile orantılı olarak değişim göstermediği tespit edilirken en düşük sürgün ucu canlılık oranları ‘Ekşi Kara’ üzüm çeşidinde 7.5 g L^{-1} 72-s (%70.98) kolhisin uygulamasında kaydedilmiştir. Düşük kolhisin doz ve süresiyle kolhisin uygulamaları yapılan bitkilerin vejetasyon süresince gelişmelerine devam ettikleri tespit edilmiştir.

Kolhisin dozlarının etkileri doz ve süre kombinasyonun yanı sıra tür ve çeşit bazında da değişiklik göstermektedir. *In vivo* kolhisin uygulamaları yapılan ‘Ekşi Kara’, ‘Trakya İlkeren’, ‘Gök Üzüm’ çeşitleri arasında sürgün ucunda en az zarar görme oranı ‘Gök Üzüm’ çeşidinde belirlenmiştir. Benzer sonuçlar daha önceki yapılan çalışmalarda da tespit edilmiştir. Ekbiç ve Tangolar (2016), ‘Trakya İlkeren’ ve ‘Flame Seedless’ üzüm çeşitlerinde ploidinin uyarılması amacıyla yaptıkları çalışmada, kolhisin uygulamaları içerisinde %0.5’lik kolhisin dozunun 1-3 günlük sürelerle uygulanması sonucunda sürgün ucu kuruma oranının daha az olduğunu tespit etmişlerdir. ‘Trakya İlkeren’ çeşidinde sürgün ucu canlılık oranlarının %0.75’lik dozun 3 ve 5 gün süreyle uygulanmasıyla % 50’nin altına düştüğünü bildirmişlerdir.

Kara ve ark. (2018a), bağ koşullarındaki omcalarda 96 saat süreyle %0.9 kolhisin+gliserin uygulamasında sürgün ucu kuruma oranını %7.14 olarak belirlemişlerdir. Uygulama yapılan 49 kombinasyonun 22’sinde sürgün ucunda kuruma gerçekleşmediği kaydedilmiştir. Sera koşullarında yapılan uygulamalarda en fazla kurumanın (%50.0) %1.1 kolhisin konsantrasyonunun 96 saat süre ile uygulanması sonucunda gerçekleştiğini belirlemişlerdir. Kolhisin uygulamalarının sera koşullarında tek göz çeliklerine yapılan uygulamaların sürgün ucu canlılık oranlarını daha yüksek oranda etkilediğini bildirmişlerdir.

Kara ve ark. (2018b), ‘Narince’ üzüm (*Vitis vinifera* L.) çeşidinde arazi koşullarında %1’lik kolhisin uygulamasının 96 saat süreyle pamuk ve folyo ile kapatılması ve sürgün ucunun kapatılmadan uygulanması sonucunda sürgün uçlarının tamamının kuruduğunu kaydetmişlerdir.

Özalp ve ark. (2018) tarafından, ‘Michele Palieri’ çeşidi fidelerine kotiledon aşamasında %0.3, %0.6, %0.9, %1.2 dozlarında kolhisin uygulaması yapılmış, uygulamaların sürgün ucu canlılık oranlarını etkilemediği (%100) bildirilmiştir.

Denememizde elde ettiğimiz sonuçlara göre farklı dozlarda kolhisin uygulamalarında sürgün ucu canlılık oranları %0-100 arasında değişim göstermiştir. Bu sonuçlar literatürle benzerlik göstermektedir.

4.6.2. Canlılık oranı (%)

In vitro koşullarda yapılan ploidi çalışmalarında kimyasal antimitotik ile düşük konsantrasyonlarda ya da daha kısa sürelerle uygulama yapılması ile canlılık oranlarında azalış olmamakta fakat tetraploidi oluşma frekansında azalma meydana gelmektedir (Väinölä, 2000; Zhang ve ark., 2008; Xie ve ark., 2015).

Tarafımızdan yapılan çalışmada kolhisin uygulamaları 'Ekşi Kara', 'Trakya İlkeren', 'Gök Üzüm' çeşitlerinin mikro çeliklerinde canlılık oranlarını azaltmıştır. 'Ekşi Kara' üzüm çeşidinde en düşük canlılık oranları 30 mg L^{-1} kolhisin (%45.67) uygulamasında tespit edilmiştir. Çeşit bazında ise 'Trakya İlkeren' çeşidinin kolhisin uygulamalarına tepkisi diğer iki çeşide oranla daha hassas bulunmuştur (Çizelge 4.4.1). Önceki yapılan çalışmalarda bu sonuçları doğrular niteliktedir. Xie ve ark. (2015), *in vitro* koşullarda farklı eksplantları (sürgün ucu, anter ve pre-embriyonik kallus) kolhisin ve orizalinin 3 farklı dozu ile 24, 48 ve 72 saat süre ile muamele etmişlerdir. Kolhisin ve orizalin uygulamaları sonucunda canlılık oranları sırasıyla %39.61 ve %41.65 olarak bildirilmiştir. Pre-embriyonik kalluslardan en yüksek oranda tetraploid bitki oluşma oranı 625 µM kolhisin dozunun 48 (%28.79) ve 72 saat (% 37.78) süreyle uygulanmasıyla elde edildiği belirtilirken kolhisin doz ve süresindeki artışla orantılı olarak canlılık oranlarında azalma kaydedilmiştir. En düşük canlılık oranları (%29.32) 72 saat süreyle 1250 µM kolhisin uygulamasında tespit edilmiştir.

Acanda ve ark. (2013), **'**Mencía' üzüm çeşidinde, embriyonik süspansiyonlarda kolhisin uygulamalarının canlılık oranlarını azalttığını tespit etmişlerdir. %0.1 kolhisin ile embriyonik potansiyelin %38.3, %0.2 kolhisin ile muamele edilen embriyonik süspansiyon kültürünün canlılık oranlarının ise % 52.5 olduğu ve embriyonik potansiyelin kolhisin uygulamalarından etkilenerek %13.8'e kadar azaldığı kaydedilmiştir. Kolhisin dozu artışıyla kallus yüzeyindeki embriyonik hücrelerin kolhisine daha çok maruz kalması sonucu ölmeleri nedeniyle embriyonik potansiyelin canlılık oranlarına göre daha fazla düşüş gösterdiği bildirilmiştir.

Yang ve ark. (2006), yapmış oldukları çalışmada diploid somatik embriyolara 10 ve 20 mg L^{-1} kolhisin konsantrasyonlarını 1, 2 ve 3 gün aralıklarla uygulamışlardır. Kolhisin doz ve süresinin artışıyla paralel olarak embriyo canlılık oranlarının azaldığını

ve en düşük canlılık oranlarının 20 mg L^{-1} uygulamasında olduğunu (%26) tespit etmişlerdir.

Çalışmamızda elde edilen veriler, kolhisin konsantrasyonundaki artışla birlikte canlılık oranlarının azaldığını göstermiştir. Canlılık üzerine yaptığı etkiler bakımından konsantrasyon artışı literatürle paralellik göstermektedir.

4.6.3. Sürgün uzunluğu (cm)

Sürgün uzunluğu değerleri kolhisin uygulamalarından değişen oranlarda etkilenmektedir. Daha önceki çalışmalarda tetraploid bitkilerin diploidlerine oranla boğum arası uzunluğunun kısaldığı ve buna paralel olarak sürgün boyunun orijinal diploidlerine göre kısa olduğu bildirilmiştir (Motosugi ve ark., 2002a). Bizim çalışmamızda elde edilen bulgular önceki çalışmalarla paralellik göstermektedir.

Kolhisin uygulamalarından etkilenme derecesine göre sürgün uzunluğu değerlerinde azalma olduğu belirlenmiştir. Kotiledon aşamasında yapılan kolhisin uygulamalarında her iki yıldaki değerler dikkate alındığında 2 g L^{-1} kolhisin uygulamasında tespit edilen sürgün uzunluğu değerlerinin, diğer uygulamalara göre sürgün uzunluğunu azaltıcı yönde etki yaptığı tespit edilmiştir (Çizelge 4.1.2, Çizelge 4.1.7).

Hızlı gelişme döneminde kolhisin uygulamaları yapılan örneklerin sürgün uzunluklarının kontrolden belirgin olarak farklılık göstermedikleri tespit edilmiştir. Kolhisin uygulamalarının ‘Ekşi Kara’, ‘Trakya İlkeren’, ‘Gök Üzüm’ çeşitlerinde sürgün uzunluğuna yaptıkları etkiler değerlendirildiğinde 7.5 g L^{-1} kolhisin konsantrasyonunun 24 saat süre ile uygulanmalarıyla sürgünlerde gelişme yavaşlamıştır (Çizelge 4.2.2).

In vivo koşullarda sürgün ucu kolhisin uygulamalarında ‘Ekşi Kara’ ve ‘Gök Üzüm’ çeşidinde kolhisin uygulamaları yapılan bitkilerin sürgün uzunluğu değerlerinde doğrusal bir azalma olmadığı tespit edilmiştir. ‘Trakya İlkeren’ üzüm çeşidinde 5 g L^{-1} ve 7.5 g L^{-1} kolhisin dozlarının 24-s ve 48-s sürelerle sürgün ucuna uygulanmaları sonucunda sürgün gelişmesi yavaşlamıştır (Çizelge 4.3.2).

Kolhisin uygulamalarıyla poliploidinin uyarıldığı diğer çalışmalarda da benzer sonuçlar alınmıştır. Ekbiç ve Tangolar (2016), kolhisin ile poliploidinin teşviki konusunda ‘Trakya İlkeren’ çeşidinde sürgün uzunluğunu kontrolde 126.1 cm olarak belirlemişlerdir. En düşük sürgün uzunluğu değerini %0.75 kolhisin dozunda (34.2 cm) kaydetmişlerdir. Uygulama süresi bakımından genel ortalamalar değerlendirildiğinde süre artışıyla sürgün uzunluğu değerlerinde belirgin düzeyde azalma olduğu bildirilmiştir.

Kara ve ark. (2018a), açık alanda yaptıkları kolhisin uygulamaları sonucunda 44. günde yapılan sürgün uzunluğu ölçümlerinde en düşük sürgün ucu canlılık oranlarını %1.1 kolhisin + gliserin solüsyonunda (34.06 cm), 75. günde 96 saat süreyle yapılan uygulamanın %1.1'lik kolhisin dozunda (43.38 cm) ve 120. gün sonunda ise 96 saat süreyle yapılan uygulamanın %1.1'lik uygulamada (47.87 cm) olduğunu tespit etmişlerdir. Kolhisin doz ve süresindeki artışa paralel olarak sürgün uzunluğu değerlerinde azalma bildirmişlerdir.

Özalp ve ark. (2018), kotiledon aşamasındaki 'Michele Palieri' üzüm çeşidinde kolhisin uygulamalarının morfoloji ve ploidi üzerine etkilerini incelemişler, kolhisin konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak sürgün uzunluğundaki azalmanın istatistiki olarak önemli olmadığını bildirmişlerdir.

4.6.4. Sürgün çapı (mm)

Artan ploidi seviyesinin bitkilerde gövde, sürgün çapı, yaprak ağırlığı gibi morfolojik özellikler üzerine tür ve çeşit bazında farklı etkiler yaptıkları bilinmektedir (Głowacka ve ark., 2010; Qiao ve ark., 2017).

Motosugi ve ark. (2007), tetraploid asma anaç sürgünlerinin diploidlerine göre daha zayıf gelişme göstermelerine rağmen gövde ve yaprak kalınlıklarında artış olduğunu belirlemişlerdir. Köklendirme ve şaşırtma safhasındaki tetraploid anaçlar üzerine aşılanan 'Kyoho' bitkilerinin sürgün ve boğum aralarının diploid anaçlar üzerine aşılananlara göre daha kısa olduğunu tespit etmişlerdir. Elde ettiğimiz verilerde de daha önceki yapılan çalışmalara benzer sonuçlara ulaşılmıştır. *In vivo* koşullarda kolhisin uygulamalarında kotiledon aşaması verilerinde kolhisin dozlarındaki artışa bağlı olarak sürgün çapı değerlerinde azalmalar olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.1.8). Hızlı gelişme döneminde kolhisin uygulamaları sonucunda tüm çeşitler de kontrole göre en düşük sürgün çapı değerleri 7.5 g L^{-1} 72-s kolhisin uygulamasında kaydedilmiştir. *In vivo* sürgün ucu uygulamalarında 'Ekşi Kara' çeşidinde sürgün çapı değerlerinde doğrusal bir azalma veya artış olmamıştır. 'Trakya İlkeren' çeşidinde sürgün çapı kolhisin uygulamalarından etkilenmiş ve azalış göstermiştir. 'Gök Üzüm' çeşidinde kolhisin uygulamaları sürgün çapını değişen oranlarda etkilemiştir (Çizelge 4.3.3).

4.6.5. Gelişme oranı (%)

Kolhisin uygulamaları canlılık ve gelişme oranlarını negatif yönde etkilemektedir (Tepe ve ark., 2002; Sinski ve ark., 2014)

Yaptığımız çalışmada her üç üzüm çeşidinde de kolhisin uygulamalarındaki artışla ters orantılı olarak bitkiciklerde gelişme oranları azalmıştır. Tüm çeşitlerde 30 mg L^{-1} kolhisin uygulaması yapılmış bitkiciklerde kontrole göre gelişmenin yavaşladığı tespit edilmiştir. 'Ekşi Kara', 'Trakya İlkeren', 'Gök Üzüm' çeşitlerinde 30 mg L^{-1} kolhisin uygulamasında belirlenen gelişme oranları sırasıyla %32.00, %35.78, %35.15 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.4.2).

4.6.6. Stoma gözlemleri

Tetraploid bitkilerde tür ve çeşidin tepkisine bağlı olarak hücre büyüklüğündeki artışa ('gigas' etkisi) paralel, sürgün çapı, polen boyutu, yaprak büyüklüğü ve stoma boyutlarında artışlar meydana gelmektedir (Motosugi ve ark., 2002a; Sattler ve ark., 2016). Stoma verileri otopoliploidinin uyarıldığı genotipler için genom büyüklüğünün yaklaşık olarak belirlenmesini sağlamaktadırlar (Yang ve ark., 2006).

Stoma boyutlarının artmasının birim alana (mm^2) düşen stoma sayısını azalttığı birçok araştırıcı tarafından rapor edilmiştir (Ma ve ark., 2014; Xie ve ark., 2015; Ekbiç ve Tangolar, 2016).

Sinski ve ark. (2014), 'BRS Clara' ve 'Crimson Seedless' çeşitlerinin 2n ve 4n kromozom sayısına sahip örneklerinde yaptıkları stoma ölçüm sonuçlarını karşılaştırmışlardır. Çalışmada elde edilen tetraploid bitkilerin stoma boyutlarında artışla birlikte birim alandaki stoma sayısında azalma meydana getirdiğini bildirmişlerdir.

Çalışmamızdan elde edilen veriler konuyla ilgili yapılan önceki çalışmalarla benzerlik göstermektedir. Kotiledon aşamasında yapılan uygulamalar sonucunda 'Ekşi Kara' üzüm çeşidi stoma yoğunluğu en düşük 305.15 adet mm^{-2} değeri ile 5 g L^{-1} dozunda tespit edilirken en yüksek stoma yoğunluğu değeri 3 g L^{-1} (448.43 adet mm^{-2}) dozunda kaydedilmiştir (Çizelge 4.1.11). 'Trakya İlkeren' üzüm çeşidinde kolhisin uygulamalarının, stoma uzunluğu (µm) ve genişliği (µm) değerlerinde meydana getirdikleri artışla orantılı olarak stoma sayısında önemli bir düşüşe neden oldukları tespit edilmiştir (Çizelge 4.1.11). 6 g L^{-1} kolhisin uygulaması yapılan fidelerin stoma yoğunluğu (275.51 adet mm^{-2}) kontrol bitkilerinden (409.42 adet mm^{-2}) önemli derecede düşüktür.

In vitro koşullarda kolhisin uygulaması sonucunda, 'Ekşi Kara' üzüm çeşidinde stoma yoğunluğu en yüksek kontrolde (420.29 adet mm^{-2}) kaydedilmiştir. Uygulamalardan elde edilen stoma yoğunlukları sırasıyla, 10 mg L^{-1} (214.78 adet mm^{-2}), 20 mg L^{-1} (249.41 adet mm^{-2}), 30 mg L^{-1} (264.83 adet mm^{-2}) olarak tespit edilmiştir. Gök üzüm çeşidinde kontrolde stoma yoğunluğu (427.54 adet mm^{-2}) olarak kaydedilmiştir. En

yüksek stoma yoğunluğu kontrolde belirlenirken en düşük stoma yoğunluğu 10 mg L^{-1} (227.66 adet mm^{-2}) kolhisin uygulamasında kaydedilmiştir (Çizelge 4.4.5). Stoma boyutlarındaki artışa bağlı olarak stoma yoğunluklarında azalma olduğu tespit edilmiştir.

Tarafımızca yapılan çalışmadan elde edilen bulgular önceki yapılan çalışmalara benzer olup stoma yoğunluğunda önemli azalışlar kaydedilmiştir.

4.6.6. Kloroplast sayısı (adet $stoma^{-1}$)

Bazı tür ve çeşitlerde yapılan ploidi çalışmalarında stoma bekçi hücrelerindeki kloroplast sayıları ve ploidi seviyesi arasında bir korelasyon olduğu gözlenmiştir (Yang ve Yang, 1990; Zhang ve ark., 2007; Yuan ve ark., 2009).

Xie ve ark. (2015), kolhisin ile muamele edilmiş, sürgün uçları, anterler ve pre-embriyonik kültürlerde gelişen bitkilerde ploidi seviyesi kromozom sayımları ve FC analizleriyle belirlenmiştir. Stoma gözlemlerinin (stoma boyutu ve sayıları, bekçi hücrelerdeki kloroplast sayıları) ploidi seviyesi ile korelasyon gösterdiği kaydedilmiştir. Tetraploid çeşitlerde stomalardaki kloroplast frekansı 23.5 olarak belirlenirken diploid çeşitlerde 14.4 olarak kaydedilmiştir. Stoma bekçi hücrelerindeki kloroplast sayılarının kromozom sayımı ve FC ölçümlerine göre kolaylıkla yapıldığı ve analizlerin yapılabilmesi için gereken iş gücünü azalttığı bildirilmiştir.

Chen ve ark. (2009), 'Red Globe' çeşidi sürgünlerinden son yıllarda geliştirilen yeni genotipin ploidi yapısının tespiti amacıyla stoma bekçi hücrelerinin boyutu ve bu hücrelerdeki kloroplast sayılarının belirlenmesi için ölçüm ve sayımlar yapmışlar ve aynı zamanda bu ölçümleri kök ucu hücrelerinin kromozomları ile de desteklemişlerdir. Yeni 'Red Globe' genotipinde stoma bekçi hücrelerinin 'Red Globe' üzüm çeşidinden biraz daha uzun ve genişliğinin ise daha dar olduğu, ebeveyn ve yeni genotipte stoma bekçi hücrelerinin kloroplast sayılarının sırasıyla 10.63 ve 11.35 olduğu belirlenmiştir. Stoma bekçi hücrelerinde hem kloroplast sayıları ve hem de boyutunda önemli bir farklılık olmadığından yeni genotipin L_1 katmanının diploid olduğu sonucuna varılmıştır.

Tarafımızca *in vivo* kotiledon aşamasında ve hızlı gelişme döneminde yapılan kolhisin uygulamaları sonuçları önceki (Xie ve ark., 2015) çalışmaları doğrular niteliktedir.

Kotiledon uygulamaları ikinci yıl verilerinde 'Gök Üzüm' çeşidi fidelerinde kolhisin uygulamaları yapılmış bitki stomalarındaki kloroplast sayılarının kontrole göre değişiklik göstermediği tespit edilmiştir. 'Ekşi Kara' üzüm çeşidinde ise kloroplast sayılarında kontrole göre belirgin farklılıklar 5 g L^{-1} kolhisin uygulamasında

belirlenmiştir. ‘Trakya İlkeren’ çeşidi fideleri kloroplast sayılarında en yüksek değerler 2 g L^{-1} (26.79 adet stoma $^{-1}$) ve 6 g L^{-1} (26.79 adet stoma $^{-1}$) dozlarında tespit edilmiştir.

In vitro koşullarda yetiştirilen bitkiciklerde yapılan analizler sonucunda ‘Ekşi Kara’ ve ‘Gök Üzüm’ çeşitlerinde kolhisin uygulamalarının kloroplast sayılarını doz bazında arttırdığı belirlenmiştir. Elde edilen en yüksek değerler 20 mg L^{-1} kolhisin uygulamalarında kloroplast sayıları çeşitlerde sırasıyla 23.44, 25.45 adet stoma^{-1}’dır.

In vivo koşularda ‘Ekşi Kara’ ve ‘Trakya İlkeren’ *in vitro* koşullarda ise ‘Ekşi Kara’ ve ‘Gök Üzüm’ çeşitlerinde kloroplast sayılarının kontrole göre artış göstermesi genotiplerin ploidi seviyesinin etkilendiğini ortaya koymaktadır.

4.6.7. Flow sitometri analizi

FC analizleri, üzerinde çalışılan türün kromozom boyutlarının küçük olduğu yada türün ploidi seviyesinin belirlenmesi için son derece etkili bir yöntem olarak kullanılmakta ve kolaylık sağlamaktadır (Ochatt ve ark., 2011).

Kotiledon aşamasında birinci yıl kolhisin uygulamaları sonucunda stoma ölçümleri ve morfolojik gözlemlerde diploidlerine oranla farklılık olduğu düşünülen örneklerde ploidi seviyelerini belirlemek amacıyla FC analizi yapılmıştır. Bu analizler sonucunda diploid bitkinin pik noktası 100 kanalında, kontrol bitkisi olarak kullanılan domates ve tetraploid yapılı ‘Kyoho’ çeşidinin pik noktasının ise beklendiği gibi 200 kanalında ortaya çıkmıştır. FC analizi sonucunda, kolhisin dozları ile muamele edilen asma fidelerinin ploidi düzeylerinde değişiklik olmadığı belirlenmiştir. Sonuçların kloroplast sayıları ile paralellik gösterdiği ve önceki çalışmaları doğrular nitelikte olduğu kaydedilmiştir (Xie ve ark., 2015; Kara ve ark., 2018a; Pan-pan ve ark., 2018).

İkinci yıl kolhisin uygulamaları yapılan bitkilerde, çeşit bazında ploidi seviyeleri değişen oranlarda etkilenmiştir. ‘Ekşi Kara’ üzüm çeşidinde 5 g L^{-1} uygulaması sonucu tetraploid bitki oluşumu tespit edilmiştir. Ploidi seviyesi kontrole göre artış göstermiştir (Şekil 4.1.16). ‘Trakya İlkeren’ çeşidinde 2 g L^{-1} ve 6 g L^{-1} uygulamalarında ploidi seviyesinin orijinal diploidlerine oranla değiştiği ve tetraploid ve miksoploid form oluştuğu belirlenmiştir (Şekil 4.1.17, 4.1.18, 4.1.19).

Birçok araştırıcı yaptıkları FC analizleri ile bitkilerin ploidi seviyelerindeki değişimi tespit etmeye çalışmışlardır (Yang ve ark., 2006; Dhooghe ve ark., 2011; Acanda ve ark., 2013; Acanda ve ark., 2015). Acanda ve ark. (2013), **‘**Mencía’ üzüm çeşidinde embriyogenik süspansiyon kültürü ile somatik embriyogenesis çalışması yapmışlardır. Bitkiye dönüşen somatik embriyolarda FC yöntemiyle yapılan analizler sonucunda ploidi

seviyesini %5.6 oranında tetraploid olarak tespit etmişlerdir. Diploid somatik embriyolardan gelişen bitkilerin çekirdek DNA içeriğinin, arazide yetiştirilen diploid bitkilerden daha düşük (%6.7) olduğunu ve bu protokolün düşük seviyelerde somaklonal varyasyona neden olduğunu bildirmişlerdir.

Noh ve ark. (2010), FC ve mikrosatellit analizleri ile otokton İspanyol üzüm (*Vitis vinifera* L.) çeşidinden elde edilen bitkilerin somatik embriyogenesis yöntemiyle ismine doğruluğunu test ettiklerini bildirmişlerdir. FC yöntemiyle 'Campbell Early' (*Vitis labrusca*) üzüm çeşidi sürgün uçlarından gelişen 3 farklı genç bitkide ploidi seviyesini incelemişler ve çalışmanın sonucunda alınan genç bitkilerin farklı ploidi seviyelerinde olduğunu bildirmişlerdir.

Kara ve ark. (2018a), tek göz çeliklerine farklı doz ve sürelerle kolhisin+gliserin uygulamaları yapmışlardır. FC analiz sonuçlarına göre sera koşullarında yetiştirilen tek göz çeliklerine farklı doz ve sürelerle yapılan kolhisin uygulamalarından tetraploid bitki elde edilmediğini, fakat analizde kontrol bitkisinin yaptığı pikler ile tetraploid olan asmanın pik seviyesinin aynı kanalda bulunmasından dolayı analiz sonuçlarında miksoploid bitki oranının belirlenemediğini bildirmişlerdir.

Tarafımızdan yapılan çalışmada FC analizi sonuçları, literatür çalışmalarını doğrular niteliktedir. FC analizi sonuçları kloroplast sayım sonuçlarına paralel değerler vermiştir.

4.6.8. Kromozom sayımı

Kromozom sayımı, poliploid genotipleri tespit etmek için en doğru yöntem olarak kabul edilmiştir (Ochatt ve ark., 2011). Ancak, asma kromozomlarının küçük yapılı olması nedeniyle kromozom morfolojisine yönelik oldukça az sayıda çalışma bulunmaktadır (Karataş ve Kunter, 2012). Kromozom sayımı ve FC analizlerinin ploidi düzeyini belirlemede doğruluk oranlarının yüksek olduğu ve sonuçlar arasında anlamlı bir korelasyon bulunduğu bildirilmiştir (Allum ve ark., 2007; Zhang ve ark., 2010).

Tarafımızca yapılan çalışmada birinci yıl kolhisin uygulamaları sonucunda kromozom sayımlarının, kloroplast sayımı ve FC analiz sonuçlarını doğruladığı tespit edilmiştir. 'Trakya İlkeren' çeşidinde birinci yıl 1 g L^{-1} kolhisin uygulaması yapılmış bitkide kromozom sayısı 2n=38 olarak kaydedilmiştir. Bu sonuç önceki çalışmaları doğrular niteliktedir (Xie ve ark., 2015).

Chen ve ark. (2009) tarafından, stoma bekçi hücrelerinin boyutu ve bu hücrelerdeki kloroplast sayılarının belirlenmesi için ölçüm ve sayımlar yapılmış aynı

zamanda kök ucu hücrelerinde kromozom sayımları ile yapılan gözlemler desteklenmiştir. Yeni genotipin kök ucu hücrelerindeki kromozom sayısının 2n=4x=76, ‘Red Globe’ üzüm çeşidinin 2n=2x=38 olduğu bildirilmiştir. Bu sonuca dayanarak ‘Red Globe’ üzüm çeşidi yeni genotipinin L_3 yapısında ploidi seviyesinin tetraploid olduğu belirtilmiştir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

Çalışma sonucunda yerli ve yöresel öneme sahip üzüm çeşitlerinin geliştirilmesinde *in vitro* yöntemlere başvurulabileceği anlaşılmıştır. Çeşitlerin *in vivo* uygulamalara tepkileri genotipe bağlı bulunmuştur. Tarafımızdan yapılan çalışmada genotipler bazında elde edilen protokoller bundan sonraki *in vivo* ve *in vitro* uygulamalar için baz alınabilir niteliktedir. Denemede antimitotik ajan olarak kolhisin uygulanılan her 3 çeşitle birlikte, kontrol olarak kullanılan tetraploid 'Kyoho' üzüm çeşidi için *in vitro* mikro çelik protokolleri oluşturulmuştur. Laboratuvar alt yapısının gelişme durumuna bağlı olarak *in vitro* uygulamalar ploidi uyarımı çalışmalarında kullanılabilir. Ancak laboratuvar alt yapısının gelişme aşamasında olan birimlerde de poliploidiye yönelik çalışmaların denenebileceği ve başarılı sonuçlara ulaşabileceği anlaşılmıştır.

Tüm uygulamalar göz önüne alındığında kolhisin uygulamaları sonucunda sürgün ucu canlılık oranlarında kontrole göre azalma gözlenmiştir. Stoma özelliklerinde yapılan değerlendirmeler sonucunda kolhisin uygulamalarının birim alandaki stoma sayıları ve stoma boyutları üzerine etkileri istatistiki olarak önemli bulunmuştur.

In vivo kotiledon uygulamalarının ikinci yıl verilerinde 'Ekşi Kara' ve 'Trakya İlkeren' fidelerinde kloroplast sayımları ve FC analizleri sonucunda sırasıyla 5 g L^{-1}, 2 g L^{-1} ve 6 g L^{-1} dozlarında ploidi seviyesi değişmiş bitkiler olduğu tespit edilmiştir. *In vitro* kolhisin uygulamalarında 'Ekşi Kara' ve 'Gök Üzüm' çeşitlerinde 10 mg L^{-1} ve 20 mg L^{-1} konsantrasyonlarının kloroplast sayılarını değiştirdiği tespit edilmiştir. Hem *in vivo* ve hem de *in vitro* çalışmalarda uygulama yapılan materyalin boyutunda azalmayla birlikte antimitotik ajan olan kolhisinin etkinliğinin arttığı gözlenmiştir. Başka bir ifadeyle *in vivo* uygulamalara göre *in vitro* eksplant uygulamalarında kolhisinin etkinliği daha yüksek bulunmuştur. *In vitro* ploidi çalışmalarında bitkicikleri alıştırma süresince zorluklarla karşılaşılmıştır. Diploid bitkicikler alıştırma sürecini başarıyla geçerken ploidi uyarımı sağlanan bitkiciklerde bu başarıya ulaşılamamıştır. Bununla birlikte *in vivo* çalışmalarda ise sürgün ucu uygulamaları yerine fide aşamasında kolhisin uygulamalarında kolhisinin etkinliği daha yüksek düzeyde ortaya çıkmıştır.

Çalışma sonucunda, uygulama yapılan bitkiler içinde ploidi seviyesi değişenleri belirlemek için FC ve stoma özelliklerinin kullanılabilir bulunmuş, stoma bekçi hücrelerinde kloroplast sayımının ploidi seviyesi değişimlerini belirlemek için etkili ve ekonomik bir yöntem olduğu kaydedilmiştir. Özellikle üzerinde çalışılan bitkisel

materyalin sayıca az olduğu durumlarda poliploid bitkileri diploidlerden ayırmada kloroplast sayımlarının FC yönteminden daha pratik bir yöntem olduğu düşünülmektedir.

5.2. Öneriler

Yaptığımız uygulamaların üzerinde çalıştığımız asma genotiplerinde *in vivo* ve *in vitro* kolhisin uygulamalarıyla poliploidinin uyarılmasında sınırlı düzeyde etkili olduğu anlaşılmıştır. Birçok çalışmada stoma sayı ve boyutlarının poliploid bitki formlarını ayırt etmede çok başarılı olduğu düşünülse de üzerinde çalıştığımız genotiplerde ancak belirli kolhisin dozları sonuçlarının bunu desteklediği belirlenmiştir.

Kolhisin uygulamaları kromozom katlama hususunda etkili olduğu bilinmekle birlikte yaptığımız uygulamalar kolhisin uygulama ve sürelerinin genotiplere göre etkinliğinin değiştiğini ortaya koymaktadır. Kolhisin uygulamalarının değişen doz ve sürelerle farklı bitki materyallerine uygulanmasının kromozom katlama konusunda faydalı olacağı ve ploidi seviyesinin değişebileceği düşünülmektedir.

Poliploid asma genotiplerinin tespitinde stoma bekçi hücrelerindeki kloroplast sayımı pratik bir yöntemdir. Poliploidi üzerinde yapılacak çalışmalarda mitotik ajan uygulanan genotiplerde ploidi seviyesi değişiminin belirlenmesinde kromozom sayımının vazgeçilmez olduğu ve elde edilen genotiplerde kromozom sayımıyla ploidi tespitinin yapılmasının daha uygun olduğu düşünülmektedir.

Bu çalışmada stoma özelliklerinde artış görülen bitkilerde stoma bekçi hücrelerindeki kloroplast sayılarının artış gösterdiği tespit edilmiştir. Ancak kimerik yapılarla anöploid bitki formlarının stoma gözlemleri ile tespiti pratik bulunmamıştır. Bu nedenle, ileride yapılacak çalışmalarda, stomatal gözlemler FC analizi ve kromozom sayımı ile desteklenilebilir.

KAYNAKLAR

Acanda, Y., Prado, M., González, M. ve 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 Cellular & Developmental Biology-Plant*, 49 (3), 276-284.

Acanda, Y., Martínez, Ó., González, M., Prado, M. ve 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*, 123 (3), 547-555.

Acquaah, G., 2007, Principles of plant genetics and breeding, *Oxford*, Blackwell, p. 740.

Adams, K. ve Wendel, J., 2005, Polyploidy and genome evolution in plants, *Current opinion in plant biology*, 8 (2), 135-141.

Aleza, P., Juárez, J., Ollitrault, P. ve Navarro, L., 2009, Production of tetraploid plants of non apomictic citrus genotypes, *Plant cell reports*, 28 (12), 1837-1846.

Allum, J., Bringloe, D. ve Roberts, A., 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 reports*, 26 (11), 1977-1984.

Alvarez, J., Martin, M., Caballero, L. ve Martin, L., 2010, The role of plant genetic resources in the sustainable agriculture, *Sustainable Agriculture: Technology, Planning and Management.*, 145-176.

Biasi, R. ve Brunori, E., 2015, The on-farm conservation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) landraces assures the habitat diversity in the viticultural agro-ecosystem, *Vitis-Journal of Grapevine Research*, 54, 265-269.

Boso, S., Gago, V., AlonsoVillaverde, V., Santiago, J. ve Rodriguez, M. M., 2016, Density and size of stomata in the leaves of different *Vitis* species and *Vitis vinifera* varieties, *Vitis - Journal of Grapevine Research*, 55 (1), 17-22.

Bozkurt, M., 2015, *Psephellus aucherianus* (DC.) boiss.(*asteraceae*) kompleksine ait tür populasyonlarında genetik çeşitliliğin belirlenmesi, *Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, 157.

Burge, G., Morgan, E. ve Seelye, J., 2002, Opportunities for synthetic plant chimeral breeding: Past and future, *Plant cell, tissue and organ culture*, 70 (1), 13-21.

Castro, C., Carvalho, A., Pavia, I., Leal, F., Moutinho-Pereira, J. ve Lima-Brito, J., 2018, Nucleolar activity and physical location of ribosomal DNA loci in *Vitis vinifera* L. by silver staining and sequential FISH, *Scientia horticulturae*, 232, 57-62.

Cattonaro, F., Testolin, R., Scalabrin, S., Morgante, M. ve Di Gaspero, G., 2014, Genetic diversity in the grapevine germplasm, In: Genomics of Plant Genetic Resources, Eds: Springer, p. 683-704.

Chang, Y., Ji, X., Zhu, J. ve Hao, Y., 2010, Polyploidy induction of mutation by using colchicine on tube seedlings of Victoria grape, *X International Conference on Grapevine Breeding and Genetics 1046*, 265-270.

Chen, J., Tang, X., Ma, X., Zhao, Q. ve Liang, F., 2009, Identification of the ploidy structure of bud sport of Red Globe grape cultivar, *Journal of Fruit Science*, 26 (5), 619-622.

Chen, J., Tang, X., Ma, X., Zhao, Q. ve Dong, Z., 2014, Generation of a new polyploid grape cultivar by using hybrid seeds induced with colchicine, *Acta horticulturae*, 1046, 251-258.

Chen, L. ve Gao, S., 2007, In vitro tetraploid induction and generation of tetraploids from mixoploids in *Astragalus membranaceus*, *Scientia horticulturae*, 112 (3), 339-344.

Chen, M., Wang, F., Zhang, Z., Fu, J. ve Ma, Y., 2017, Characterization of fungi resistance in two autotetraploid apple cultivars, *Scientia horticulturae*, 220, 27-35.

Cohen, H., Fait, A. ve Tel-Zur, N., 2013, Morphological, cytological and metabolic consequences of autopolyploidization in *Hylocereus* (Cactaceae) species, *BMC plant biology*, 13 (1), 173.

Comai, L., 2005, The advantages and disadvantages of being polyploid, *Nature reviews genetics*, 6 (11), 836.

Das, P. ve Mukherjee, S., 1967, Induction of autotetraploidy in grapes, *Indian Journal of Genetics and Plant Breeding (The)*, 27 (1), 107-116.

De Schepper, S., Leus, L., Eeckhaut, T., Van Bockstaele, E., Debergh, P. ve De Loose, M., 2004, Somatic polyploid petals: regeneration offers new roads for breeding Belgian pot azaleas, *Plant cell, tissue and organ culture*, 76 (2), 183-188.

Dermen, H., 1947, Histogenesis of some bud sports and variegations, *Proc Amer Soc Hort Sci*, 51-73.

Dermen, H., 1964, Cytogenetics in hybridization of bunch and muscadine-type grapes, *Economic Botany*, 18 (2), 137-148.

Dhooghe, E., Van Laere, K., Eeckhaut, T., Leus, L. ve Van Huylenbroeck, J., 2011, Mitotic chromosome doubling of plant tissues in vitro, *Plant cell, tissue and organ culture*, 104 (3), 359-373.

Di Genova, A., Almeida, A., Muñoz-Espinoza, C., Vizoso, P., Travisany, D., Moraga, C., Pinto, M., Hinrichsen, P., Orellana, A. ve Maass, A., 2014, Whole genome comparison between table and wine grapes reveals a comprehensive catalog of structural variants, *BMC plant biology*, 14 (1), 7.

Dutt, M., Li, Z., Dhekney, S. ve Gray, D., 2007, Transgenic plants from shoot apical meristems of *Vitis vinifera* L."Thompson Seedless" via Agrobacterium-mediated transformation, *Plant cell reports*, 26 (12), 2101-2110.

Ekbiç, H. ve Tangolar, S., 2016, Trakya İlkeren ve Flame Seedless üzüm çeşitlerinde farklı kolhisin dozları kullanılarak poliploidi oluşturma olanakları, *Akademik Ziraat Dergisi*, 5 (2), 69-76.

FAO, 2018, http://www.fao.org/faostat/en/: [08.09.2018].

Fawcett, J. ve Van de Peer, Y., 2010, Angiosperm polyploids and their road to evolutionary success, *Trends in Evolutionary Biology*, 2 (1), 16-21.

Głowacka, K., Jeżowski, S. ve Kaczmarek, Z., 2010, In vitro induction of polyploidy by colchicine treatment of shoots and preliminary characterisation of induced polyploids in two Miscanthus species, *Industrial Crops and Products*, 32 (2), 88-96.

Gray, D. ve Benton, C., 1991, In vitro micropropagation and plant establishment of muscadine grape cultivars (*Vitis rotundifolia*), *Plant cell, tissue and organ culture*, 27 (1), 7-14.

He, M., Gao, W., Gao, Y., Liu, Y., Yang, X., Jiao, H. ve Zhou, Y., 2016, Polyploidy induced by colchicine in *Dendranthema indicum* var. aromaticum, a scented chrysanthemum, *European Journal of Horticulture Science*, 81 (4), 219-226.

Jaillon, O., Aury, J., Noel, B., Policriti, A., Clepet, C., Casagrande, A., Choisne, N., Aubourg, S., Vitulo, N. ve Jubin, C., 2007, The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla, *Nature*, 449 (7161), 463.

Jaskani, M., Kwon, S. ve Kin, D., 2005, Flow cytometry of DNA contents of colchicine treated watermelon as a ploidy screening method at MI stage, *Pakistan Journal of Botany*, 37 (3), 685.

Jiao, Y., Wickett, N., Ayyampalayam, S., Chanderbali, A., Landherr, L., Ralph, P., Tomsho, L. P., Hu, Y., Liang, H. ve Soltis, P., 2011, Ancestral polyploidy in seed plants and angiosperms, *Nature*, 473 (7345), 97.

Jones, J., Ranney, T., Lynch, N. ve Krebs, S., 2007, Ploidy levels and relative genome sizes of diverse species, hybrids, and cultivars of Rhododendron, *J. Amer. Rhododendron Soc*, 61 (4), 220-227.

Kara, K., Sabir, A., Doğan, O. ve Ömer, E., 2016a, 'Gök Üzüm'(Vitis Vinifera L.) Çeşidinin Ticari Potansiyeli ve Ampelografik Özellikleri, *Nevşehir Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 395-410.

Kara, Z. ve Ecevit, F., 1998, Konya yöresinde üretici bağlarında yaygın olarak yetiştirilen bazı üzüm çeşitlerinde görülen farklı iriliklerde tane gelişmesine Giberellik asit uygulamalarının etkileri üzerinde bir araştırma, 4, *Bağcılık Sempozyumu 20-23 Ekim 1998, Yalova Bildiriler*, 401-408.

Kara, Z., Oğuz, C. ve Akın, A., 2002, Konya Aladağ Vadisi bağcılık işletmelerinin ekonomik faaliyet sonuçları ve sürdürülebilirliği, Türkiye 5, *Bağcılık ve Şarapçılık Sempozyumu 5-9 Ekim Cappadocia (Nevşehir)*, 395-402.

Kara, Z., Oğuz, C. ve Akın, A., 2003, Konya Aladağ Vadisi bağcılık işletmelerinin ekonomik faaliyet sonuçları ve sürdürülebilirliği. Türkiye 5. Bağcılık ve Şarapçılık Sempozyumu. Cappadocia (Nevşehir)**:** 395-402.

Kara, Z. ve Demirhan, Y., 2005, Bazı sofralık ve şaraplık üzüm çeşitlerinin Konya yöresindeki vegetatif gelişme ve verim değerleri, *Tekirdağ Bağcılık Araştırma Enstitüsü. Türkiye*, 6, 375-382.

Kara, Z., 2014, Konya'nın Üzümleri, *Merhaba Gazetesi Akademik Sayfalar*, 4 (18), 274-288.

Kara, Z., 2015, Üzümcülük. Konya ansiklopedisi. Orak, M. A., Konya Kültür AŞ. 9/Ek C**:** 429.

Kara, Z., Sabır, A., Doğan, O. ve Eker, Ö., 2016b, 'Gök Üzüm'(*Vitis vinifera* L.) Çeşidinin Ticari Potansiyeli ve Ampelografik Özellikleri, *Nevşehir Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 395-410.

Kara, Z., Sabır, A., Yazar, K., Doğan, O. ve Khaleel, A., 2017a, Fertilization Biology Of Ancient Grape 'Ekşi Kara'(Vitis Vinifera L.), *Selçuk Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, 31 (2), 92-97.

Kara, Z., Sabır, A., Yazar, K., Doğan, O. ve Omar, A., 2017b, Fruitfulness of Ancient Grapevine Varety 'Ekşi Kara'(*Vitis vinifera* L.), *Selçuk Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, 31 (3), 62-68.

Kara, Z., Doğan, O., Yazar, K. ve Sabır, A., 2018a, 41 B Asma Anacına In Vivo Kolhisin Uygulamalarının Morfolojik ve Sitolojik Etkileri, *Selçuk Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, 32 (1), 8-13.

Kara, Z., Sabır, A., Yazar, K., Doğan, O. ve Albanaa, A., 2018b, 'Narince'(*Vitis vinifera* L.) Üzüm Çeşidinde Kolhisin Uygulamalarının Morfolojik ve Sitolojik Etkileri, *Selçuk Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, 32 (1), 14-19.

Kara, Z., Sabır, A., Yazar, K., Doğan, O. ve Şit, M., 2018c, Effects of colchicine treatments on some grape rootstock and grape varieties at cotyledon stage, *Selcuk journal of agriculture and food sciences*.

Karataş, D. ve Kunter, B., 2012, Sultani Çekirdeksiz ve Kalecik Karası Üzüm Çeşitlerinde Uyarılmış Mutasyon Etkilerinin Sitolojik İncelenmesi, *Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 26 (2).

Keller, E., 2011, Genes, genomes, and genomics, *Biological Theory*, 6 (2), 132-140.

Kuksova, V., Piven, N. ve Gleba, Y., 1997, Somaclonal variation and in vitro induced mutagenesis in grapevine, *Plant cell, tissue and organ culture*, 49 (1), 17-27.

Kuliev, V., 2011, Induced autotetraploid grape mutants, *Cytology and Genetics*, 45 (3), 163.

Kunter, B. ve Karataş, D., 2011, Asmalarda Mutasyonlar ve Mutant *Vitis vinifera* L. Çeşitleri, *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi*, 21 (2), 146-151.

Kunter, B., Çakmak, G., Keskin, N., Karataş-Değirmenci, D. ve Kunter, B., 2015, İyonize radyasyon uygulamalariyla elde edilmiş üzüm genotiplerinde stoma özellİkleri üzerinde araştirmalar, *Selçuk Tarım Bilimleri Dergisi*, 27, 34-39.

Lee, M., Park, Y., Jeong, S. ve Park, S., 2017, Production of Hypo-and Hyper-tetraploid seedlings from open, Self, and cross pollinated hypo and hyper tetraploid grape, *한국원예학회 학술발표요지*, 152-153.

Liang, Z., Sang, M., Ma, A., Zhao, S., Zhong, G. ve Li, S., 2011, Inheritance of sugar and acid contents in the ripe berries of a tetraploid x diploid grape cross population, *Euphytica*, 182 (2), 251.

Lloyd, A. ve Bomblies, K., 2016, Meiosis in autopolyploid and allopolyploid Arabidopsis, *Current opinion in plant biology*, 30, 116-122.

Lönnig, W., 2005, Mutation breeding, evolution, and the law of recurrent variation, *Recent Res. Devel. Genet. Breeding*, 2, 45-70.

Ma, X., Dong, Z., Zhao, Q., Li, X., Tan, W., Tang, X. ve Chen, J., 2014, A series of Polyploid grape cultivars and their structural identification of ploidy character, *XI International Conference on Grapevine Breeding and Genetics 1082*, 63-68.

Masterson, J., 1994, Stomatal size in fossil plants: evidence for polyploidy in majority of angiosperms, *Science*, 264 (5157), 421-424.

Mbah, E. ve Wakil, S., 2012, Elimination of bacteria from in vitro yam tissue cultures using antibiotics, *Journal of Plant Pathology*, 94 (1), 53-58.

Moghbel, N., Borujeni, M. ve Bernard, F., 2015, Colchicine effect on the DNA content and stomata size of *Glycyrrhiza glabra* var. glandulifera and *Carthamus tinctorius* L. cultured in vitro, *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 13 (1), 1-6.

Motosugi, H., Okudo, K., Kataoka, D. ve Naruo, T., 2002a, Comparison of growth characteristics between diploid and colchicine-induced tetraploid grape rootstocks, *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 71 (3), 335-341.

Motosugi, H., Yamamoto, Y., Naruo, T., Kitabayashi, H. ve Ishii, T., 2002b, 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-Geilweilerhof*, 41 (1), 21-26.

Motosugi, H., Yamamoto, Y., Naruo, T. ve Yamaguchi, D., 2007, Growth and fruit quality of 'Kyoho'grapevines grafted on autotetraploid rootstocks, *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 76 (4), 271-278.

Murashige, T. ve Skoog, F., 1962, A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures, *Physiologia plantarum*, 15 (3), 473-497.

Negri, V., 2005, Agro-biodiversity conservation in Europe: ethical issues, *Journal of Agricultural and Environmental Ethics*, 18 (1), 3-25.

Noh, J., Park, K., Yun, H., Do, G., Hur, Y., Kim, S., Lee, H., Ryou, M., Park, S. ve Jung, S., 2010, Determination of chimera types and ploidy level of sports from'Campbell Early'grape (*Vitis labruscana*), *Korean Journal of Horticultural Science and Technology*, 28 (6), 996-1002.

Notsuka, K., Tsuru, T. ve Shiraishi, M., 2000, Induced polyploid grapes via in vitro chromosome doubling, *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 69 (5), 543-551.

Ochatt, S., Patat-Ochatt, E. ve Moessner, A., 2011, Ploidy level determination within the context of in vitro breeding, *Plant cell, tissue and organ culture*, 104 (3), 329-341.

OIV, 2017a, Distribution of the world's grapevine varieties, http://www.oiv.int/public/medias/5888/en-distribution-of-the-worlds-grapevine-varieties.pdf: [8.9.2018].

OIV, 2017b, 2017 World Vitiviniculture Situation, http://www.oiv.int/public/medias/5479/oiv-en-bilan-2017.pdf: [08.09.2018].

Oladosu, Y., Rafii, M., Abdullah, N., Hussin, G., Ramli, A., Rahim, H., Miah, G. ve Usman, M., 2016, Principle and application of plant mutagenesis in crop improvement: a review, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 30 (1), 1-16.

Oliveira, M., Costa, M., Silva, C. ve Otoni, W., 2010, Growth regulators, culture media and antibiotics in the in vitro shoot regeneration from mature tissue of citrus cultivars, *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 45 (7), 654-660.

Olmo, H., 1937, Chromosome numbers in the European grape (*Vitis vinifera*), *Cytologia* (1), 606-613.

Otto, S. ve Whitton, J., 2000, Polyploid incidence and evolution, *Annual review of genetics*, 34 (1), 401-437.

Özalp, Z., Ergönül, O., Uysal, T., Özer, C., Tuna, M. ve Yücel, G., 2018, Kotiledon aşamasındaki M. palieri üzüm çeşidinde kolhisin uygulamalarının morfoloji ve ploidi üzerine etkileri, *Bahçe (Özel sayı)*, 45 (1), 709–715

Pan-pan, H., Wei-xu, L. ve Hui-hui, L., 2018, In vitro induction and identification of autotetraploid of B*letilla striata* (Thunb.) Reichb. f. by colchicine treatment, *Plant cell, tissue and organ culture*, 132 (3), 425-432.

Parisod, C., Holderegger, R. ve Brochmann, C., 2010, Evolutionary consequences of autopolyploidy, *New phytologist*, 186 (1), 5-17.

Park, K., Yun, H., Seo, H., Jeong, S., Chung, K., Jun, J., Cho, H. ve Kang, S., 2004, Breeding of a Black Table Grape Cultivar'Heukgoosul'(*Vitis* sp.) with Large Berries and High Quality, *Korean Journal of Horticultural Science and Technology*, 22 (4), 462-466.

Parrotta, L., Cai, G. ve Cresti, M., 2010, Changes in the accumulation of α-and β-tubulin during bud development in *Vitis vinifera* L, *Planta*, 231 (2), 277.

Pierozzi, N. ve Moura, M., 2016, Karyotype analysis in grapevines, *Revista Brasileira de Fruticultura*, 38 (1), 213-221.

Planchais, S., Glab, N., Inzé, D. ve Bergounioux, C., 2000, Chemical inhibitors: a tool for plant cell cycle studies, *Febs Letters*, 476 (1-2), 78-83.

Prado, M., Rodriguez, E., Rey, L., González, M., Santos, C. ve Rey, M., 2010, Detection of somaclonal variants in somatic embryogenesis-regenerated plants of Vitis vinifera by flow cytometry and microsatellite markers, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 103 (1), 49-59.

Qiao, G., Liu, M., Song, K., Li, H., Yang, H., Yin, Y. ve Zhuo, R., 2017, Phenotypic and Comparative Transcriptome Analysis of Different Ploidy Plants in Dendrocalamus latiflorus Munro, *Frontiers in plant science*, 8, 1371.

Ramanna, M. ve Jacobsen, E., 2003, Relevance of sexual polyploidization for crop improvement–A review, *Euphytica*, 133 (1), 3-8.

Ramsey, J. ve Schemske, D., 1998, Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants, *Annual Review of Ecology and Systematics*, 29 (1), 467-501.

Ramsey, J. ve Schemske, D., 2002, Neopolyploidy in flowering plants, *Annual Review of Ecology and Systematics*, 33 (1), 589-639.

Ramsey, J. ve Ramsey, T., 2014, Ecological studies of polyploidy in the 100 years following its discovery, *Phil. Trans. R. Soc. B*, 369 (1648), 20130352.

Rasuli, V. ve Sotudeh, R., 2007, Autotetraploid Induction in Grape (*Vitis vinifera* var. Bidaneh) by using Colchicine, http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=IR2008001635: [19.09.2018].

Sabır, A. ve Kara, Z., 2011, Giberelik asit ve nanoteknolojik kalsit uygulamalarının asma tohumlarının çimlenmeleri üzerine etkileri. Türkiye VI. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi. Şanlıurfa**:** 135-139.

Sattler, M., Carvalho, C. ve Clarindo, W., 2016, The polyploidy and its key role in plant breeding, *Planta*, 243 (2), 281-296.

Schuettpelz, E., Grusz, A., Windham, M. ve Pryer, K., 2008, The utility of nuclear gapCp in resolving polyploid fern origins, *Systematic Botany*, 33 (4), 621-629.

Sekiguchi, F., Yamakawa, K. ve Yamaguchi, H., 1971, Radiation damage in shoot apical meristems of *Antirrhinum majus* and somatic mutations in regenerated buds, *Radiation Botany*, 11 (2), 157-169.

Sharma, A., Bansal, S., Sengar, R. ve Kumar, V., 2009, Mutations: In Crop Evolution, Improvement and Reverse Genetics, *Indian Journal of Plant Genetic Resources*, 22 (2), 117.

Shi, Q. H., Liu, P., Liu, M. J., Wang, J. R. ve Xu, J., 2015, A novel method for rapid in vivo induction of homogeneous polyploids via calluses in a woody fruit tree (*Ziziphus jujuba* Mill.), *Plant cell, tissue and organ culture*, 121 (2), 423-433.

Singh, S., Sharma, H., Goswami, A., Datta, S. ve Singh, S., 2000, In vitro growth and leaf composition of grapevine cultivars as affected by sodium chloride, *Biologia plantarum*, 43 (2), 283-286.

Sinski, I., Dal Bosco, D., Pierozzi, N., Maia, J., Ritschel, P. ve Quecini, V., 2014, Improving in vitro induction of autopolyploidy in grapevine seedless cultivars, *Euphytica*, 196 (2), 299-311.

Soltis, D. ve Soltis, P., 1999, Polyploidy: recurrent formation and genome evolution, *Trends in Ecology & Evolution*, 14 (9), 348-352.

Soltis, D., Soltis, P. ve Tate, J., 2004, Advances in the study of polyploidy since plant speciation, *New phytologist*, 161 (1), 173-191.

Soltis, D., Albert, V., Leebens-Mack, J., Bell, C., Paterson, A., Zheng, C., Sankoff, D., Pamphilis, C., Wall, P. ve Soltis, P., 2009, Polyploidy and angiosperm diversification, *American journal of botany*, 96 (1), 336-348.

Storchova, Z. ve Pellman, D., 2004, From polyploidy to aneuploidy, genome instability and cancer, *Nature reviews Molecular cell biology*, 5 (1), 45.

Suzue, H., Hosokawa, M. ve Yazawa, S., 2009, A convenient method for exposing shoot apical meristems using compressed air, *HortScience*, 44 (5), 1501-1503.

Szymkowiak, E. J. ve Sussex, I. M., 1996, What chimeras can tell us about plant development, *Annual review of plant biology*, 47 (1), 351-376.

Tepe, Ş., Ellialtıoğlu, Ş., Yenice, N. ve Tipirdamaz, R., 2002, *In vitro* kolhisin uygulaması ile poliploid nane (*Mentha longifolia* L.) bitkilerinin elde edilmesi, M*editerranean Agricultural Sciences*, 15 (2), 63-69.

Teshome, A., Baum, B., Fahrig, L., Torrance, J., Arnason, T. ve Lambert, J., 1997, Sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] landrace variation and classification in north Shewa and south Welo, Ethiopia, *Euphytica*, 97 (3), 255-263.

Thao, N., Ureshino, K., Miyajima, I., Ozaki, Y. ve Okubo, H., 2003, Induction of tetraploids in ornamental Alocasia through colchicine and oryzalin treatments, *Plant cell, tissue and organ culture*, 72 (1), 19-25.

Thomas, P. ve Prakash, G., 2004, Sanitizing long-term micropropagated grapes from covert and endophytic bacteria and preliminary field testing of plants after 8 years in vitro, *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 40 (6), 603-607.

Thompson, M. ve Olmo, H., 1963, Cytohistological studies of cytochimeric and tetraploid grapes, *American journal of botany*, 50 (9), 901-906.

Tuna, M., 2014, Flow sitometri ve tarımsal araştırmalarda kullanımı çalıştayı, *Namık Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü*, Tekirdağ.

TÜİK, 2018, http://www.tuik.gov.tr/Start.do: [08.09.2018].

Udall, J. ve Wendel, J., 2006, Polyploidy and crop improvement, *Crop Science*, 46 (Supplement_1), S-3-S-14.

Uysal, T., Ertuğrul, K., Susanna, A. ve Garcia-Jacas, N., 2009, New chromosome counts in the genus Centaurea (*Asteraceae*) from Turkey, *Botanical Journal of the Linnean Society*, 159 (2), 280-286.

Väinölä, A., 2000, Polyploidization and early screening of *Rhododendron* hybrids, *Euphytica*, 112 (3), 239-244.

Waite, H. ve Morton, L., 2007, Hot water treatment, trunk diseases and other critical factors in the production of high-quality grapevine planting material, *Phytopathologia Mediterranea*, 46 (1), 5-17.

Walker, A., Lee, E. ve Robinson, S., 2006, Two new grape cultivars, bud sports of Cabernet Sauvignon bearing pale-coloured berries, are the result of deletion of two regulatory genes of the berry colour locus, *Plant molecular biology*, 62 (4-5), 623-635.

Wolfe, K., 2001, Yesterday's polyploids and the mystery of diploidization, *Nature reviews genetics*, 2 (5), 333.

Xie, X., Agüero, C., Wang, Y. ve Walker, M., 2015, In vitro induction of tetraploids in *Vitis* x Muscadinia hybrids, *Plant cell, tissue and organ culture*, 122 (3), 675-683.

Yamada, M. ve Sato, A., 2016, Advances in table grape breeding in Japan, *Breeding science*, 66 (1), 34-45.

Yamane, H. ve 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.

Yamane, H., 1996, Grape variety developed in Japan, *In: Horiuchi, S. and H. Matsui (eds.) Nihon Budougaku*, 371-383.

Yang, J. ve Yang, X., 1990, Analysis of the relationship between the chloroplast number and the ploidy level in mulberry, *Journal of Zhejiang Agricultural Sciences*, 5, 238-240.

Yang, X., Cao, Z., An, L., Wang, Y. ve Fang, X., 2006, In vitro tetraploid induction via colchicine treatment from diploid somatic embryos in grapevine (*Vitis vinifera* L.), *Euphytica*, 152 (2), 217-224.

Yuan, S., Liu, Y.-M., Fang, Z.-Y., Yang, L.-M., Zhuang, M., Zhang, Y.-Y. ve 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, *Agricultural Sciences in China*, 8 (8), 939-946.

Yue, Y., Zhu, Y., Fan, X., Hou, X., Zhao, C., Zhang, S. ve Wu, J., 2017, Generation of octoploid switchgrass in three cultivars by colchicine treatment, *Industrial Crops and Products*, 107, 20-21.

Zeven, A., 1998, Landraces: a review of definitions and classifications, *Euphytica*, 104 (2), 127-139.

Zhang, J., Gong, Z., Liu, K., Huang, W., Li, D. ve Zhang, Z., 2007, Rapid determination of ploidy level of chromosome in pepper, *Journal of Northwest A&F University*, 35, 121-124.

Zhang, Q., Luo, F., Liu, L. ve Guo, F., 2010, In vitro induction of tetraploids in crape myrtle (Lagerstroemia indica L.), *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 101 (1), 41-47.

Zhang, Z., Dai, H., Xiao, M. ve Liu, X., 2008, In vitro induction of tetraploids in *Phlox subulata* L, *Euphytica*, 159 (1-2), 59-65.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı	**:**	Kevser YAZAR
Uyruğu	**:**	TC
Doğum Yeri ve Tarihi	**:**	Konya/ 1986
Telefon	**:**	03322232894
e-mail	**:**	kyazar@selcuk.edu.tr

EĞİTİM

Derece		**Adı, İlçe, İl**	**Bitirme Yılı**
Lise	:	Selçuklu Atatürk Lisesi, Selçuklu, Konya	**2003**
Üniversite	:	Selçuk Üniversitesi, Selçuklu, Konya	**2009**
Yüksek Lisans	:	Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Selçuklu, Konya	**2013**
Doktora	:	Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Selçuklu, Konya	**2018**

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	**Kurum**	**Görevi**
2011-	**Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi**	**Arş. Gör.**

UZMANLIK ALANI

Bağ Yetiştirme ve Islahı

YABANCI DİLLER

İngilizce

YAYINLAR

Sabır, A., Küçükbasmacı Sabır, F., Yazar, K., Kara, Z., 2011, Bazı derim sonrası uygulamaların Sultani Çekirdeksiz ve Antep Karası üzüm çeşitlerinin soğuk havada muhafazası üzerine etkileri, *Türkiye VI. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi,121-127.*

Sabır, A., Kara, Z., Yazar, K., 2012, Improvement of nursery cane quality, leaf chlorophyll content and cold hardiness of grapevines (*Vitis* Spp.) by nano-sıze calcite pulverization, *35 th World Congress Of Vine and Wine*, 18-22 June, İzmir, Turkey.

Kara, Z., Sabir, A., Küçükbasmaci Sabir, F., Yazar, K., 2012, maintaining postharvest quality of table grapes (*V. vinifera* L.) by pre-storage grape seed oil treatment, *35 th World Congress Of Vine and Wine*, 18-22 June, İzmir, Turkey.

Sabir, A., Yazar, K., Sabir, F., Kara, Z., Yazici, M. A., ve Goksu, N., 2014, Vine growth, yield, berry quality attributes and leaf nutrient content of grapevines as influenced

by seaweed extract (*Ascophyllum nodosum*) and nanosize fertilizer pulverizations, *Scientia Horticulturae*, 175, 1-8.

Sabir, A. ve Yazar, K., 2015, Diurnal dynamics of stomatal conductance and leaf temperature of grapevines (*Vitis vinifera* L.) in response to daily climatic variables, *Acta Sci. Pol. Hortorum Cultus*, 14, 3-15.

Sabır, A., Yazar, K., Kara, Z., 2016, Kış dinlenmesi döneminde uygulanan düşük sıcaklıkların bazı üzüm çeşitlerinin gelişimi üzerine etkileri**,** *Nevşehir Bilim ve Teknoloji Dergisi TARGİD Özel Sayı*, 208-213.

Yazar, K., Sabır, A., Kara, Z., 2016, Kısıntılı sulamanın asma anaçlarında stoma özellikleri üzerine etkileri, *Bahçe (Yalova Atatürk Bahçe Kültürleri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi)*, özel sayı, 829-832.

Sabır, A., Kara, Z., Yazar, K., Doğan, O., 2016, Sultani Çekirdeksiz üzüm çeşidinde mikronize kalsit ve deniz yosunu ekstraktı (*Ascophyllum nodosum*) uygulamalarının asma gelişimi ve verimi üzerine etkileri, *Bahçe (Yalova Atatürk Bahçe Kültürleri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi)*, özel sayı, 825-828.

Sabır, A., Küçükbasmacı Sabır, F., Yazar, K., Kara, Z., 2014, Hasat sonrası 1-Methylcyclopropene uygulamasının Gerberada vazo ömrü ve çiçek kalitesine etkileri, *VI. Bahçe Ürünlerinde Muhafaza ve Pazarlama Sempozyumu*, 257.

Sabir, A., Yazar, K., Küçükbasmaci Sabir, F., Kara, Z., 2014, 1-Methylcyclopropene ve modifiye atmosfer paketleme uygulamalarının sofralık üzümlerde (*Vitis vinifera* L. cv. Horoz Karası) muhafaza süresince kalite özellikleri üzerine etkileri, *VI. Bahçe Ürünlerinde Muhafaza ve Pazarlama Sempozyumu*, 317-323.

Kara, Z., Sabır, A., Yazar, K. ve Akçay, A., 2016, Klinoptilolitik mikronize zeolit uygulamalarının asma anacı fidanlarının vegetatif gelişme ve kalitesine etkileri. *Selçuk Tarım Bilimleri Dergisi*, *3*(2), 253-260.

Sabir, A., Karaca, U., Yazar, K., Sabir, F. K., Yazici, M. A., Dogan, O. ve Kara, Z. 2017, Vine growth and yield response of Alphonse Lavallée (*V. vinifera* L.) grapevines to plant growth promoting rhizobacteria under alkaline condition in soilless culture, *Acta scientiarum polonorum-hortorum cultus*, 16(4), 25-32.

Kara, Z., Doğan, O., Yazar, K. ve Sabır, A. 2018, 41 B Asma anacına in vivo kolhisin uygulamalarının morfolojik ve sitolojik etkileri. *Selçuk Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, *32*(1), 8-13.

Kara, Z., Sabır, A., Yazar, K., Doğan, O. ve Albanaa, A.S.S., 2018, 'Narince'(*Vitis vinifera* L.) üzüm çeşidinde kolhisin uygulamalarının morfolojik ve sitolojik etkileri. *Selçuk Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, *32*(1), 14-19.

Kara, Z., Sabır, F. K., Sabır, A., Yazar, K. ve Günal, E. 2018, Biopestisit *Bacilius Subtilis* Qst 713 ile Azotobacter uygulamalarının muhafaza sürecinde sofralık üzüm kalitesine etkileri. *Selçuk Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, *32*(2), 133-141.

Kara, Z., Yazar, K. ve Ekinci, H., 2018, Ekşi Kara ve Narince Üzüm (*Vitis vinifera* L.) çeşitlerinde anter kültürü, Bahçe, özel sayı, 45:1, 671-676.

Kara, Z., Özer, A., Sabır, A., Yazar, K. ve Doğan, O. 2018, Asmada poliploidi indüksiyonunda azot protoksitin (N_2O) uygulanabilirliği, Bahçe, özel sayı, 45:1, 659-670.

Kara, Z., Yazar, K., Doğan, O., Sabır, A., Özer, A. ve Koç F., 2018, İtalya (*Vitis vinifera* L.) Sofralık üzüm çeşidinde kısıtlı sulamanın yaprak ve stoma özelliklerine etkileri, Bahçe, özel sayı, 45:1, 677-682.

Kara, Z., Yazar, K., Doğan, O., Sabır, A., Özer, A. ve Çınar, S., 2018, Bitki büyümesini teşvik eden mikroorganizmaların 41B Asma anacı çeliklerinde köklenme ve sürgün gelişmesine etkileri, Bahçe, özel sayı, 45:1, 683-688.