



**T.C.  
HARRAN ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**PISTACIA ATLANTICA DESF. TOHUMLARINDA POLİPLOİDİ TEŞVİKİ  
ÜZERİNDE ARAŞTIRMALAR**

**YETER AYDINLIK**

**BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI**

**Şanlıurfa  
2026**



**T.C.  
HARRAN ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**PISTACIA ATLANTICA DESF. TOHUMLARINDA POLİPLOİDİ TEŞVİKİ  
ÜZERİNDE ARAŞTIRMALAR**

**YETER AYDINLIK**

**BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI  
Tez Danışmanı: Prof. Dr. BEKİR EROL AK  
İkinci Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi HEYDEM EKİNCİ**

**Şanlıurfa  
2026**

## TEŐEKKÜR

Tez çalıőmam sűresince bilgi, deneyim ve deęerli katkılarıyla bana rehberlik edip akademik geliőimime önemli katkılar saęlayan saygıdeęer danıőman hocam Prof. Dr. Bekir Erol AK'a en içten teőekkűrlerimi sunarım.

Tez çalıőmam sırasında bilgi ve tecrűbeleriyle desteęini esirgemeyen, Selçuk Ŭniversitesi Ziraat Fakűltesi Bahçe Bitkileri Blűmű Dr. Öęr. Ŭyesi Kevser YAZAR hocama içtenlikle teőekkűr ederim.

Lisansűstű eęitimim boyunca gerek akademik çalıőmalarımnda gerekse karőılaőtıęım zorluklarda her zaman yanımda olan, bilgi ve deneyimlerini benimle paylaőmaktan hiçbir zaman çekinmeyen, desteęi ve motivasyonuyla sűreci daha verimli ve anlamlı kılan ikinci danıőman hocam Dr. Öęr. Ŭyesi Heydem EKİNCİ'ye sonsuz teőekkűrlerimi sunarım.

Tez çalıőmam sűresince laboratuvar çalıőmalarımnda yardımlarını esirgemeyen arkadaőlarım Zir. Yűk. Műh. Birgűl DİKMETAŐ DOęAN, Arő. Gör. Necla ŐAŐKIN ve Zir. Műh. Zehra GŬNBEGİ'ne teőekkűr ederim.

Eęitim hayatım boyunca her zaman yanımda olan, maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, varlıklarıyla bana gű ve ilham veren canım anneme, babama, ablalarım ve kardeőlerime sonsuz teőekkűr ederim.

Tezimin flow sitometri analizlerinin gerçekleőtirilmesinde saęladıkları desteklerden dolayı Alata Bahçe Kűltűrleri Araőtırma Enstitűsű'ne teőekkűr ederim.

Bu tezin yűrűtűlmesinde Harran Ŭniversitesi Bilimsel Araőtırma Projeleri Birimi (Proje No: 25011)'ne tezime verdikleri destekten tűrű teőekkűr ederim.

## İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	i
ABSTRACT .....	ii
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	iii
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	iv
SİMGELER .....	v
1. GİRİŞ .....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR .....	5
2.1. Poliploidi .....	5
2.2. Orizalin ile Poliploidi Teşviki .....	7
3. GEREÇ VE YÖNTEM .....	15
3.1. Pistacia atlantica Desf. (Atlantik sakızı) .....	16
3.2. Orizalin .....	17
3.3. Yöntem .....	18
3.4. Ploidi Seviyesinin Belirlenmesi .....	20
3.4.1. Sürgün ucu canlılık oranı (%) .....	20
3.4.2. Sürgün uzunluğu (cm) .....	20
3.4.3. Sürgün çapı (mm) .....	21
3.4.4. Stoma yoğunluğu (adet mm <sup>-2</sup> ) ve stoma boyutları (µm) .....	22
3.4.5. Kloroplast sayımı (adet stoma <sup>-1</sup> ) .....	23
3.4.6. Flow sitometri (FC) analizi .....	23
3.4.7. İstatistiksel analiz .....	24
4. BULGULAR .....	25
4.1. Sürgün ucu canlılık oranı (%) .....	25
4.2. Sürgün uzunluğu (cm) .....	25
4.3. Sürgün çapı (mm) .....	25
4.4. Stoma Uzunluğu (µm), Genişliği (µm) ve Yoğunluğu (adet mm <sup>-2</sup> ) Ölçümleri .....	27
4.5. Kloroplast Sayısı (adet stoma <sup>-1</sup> ) .....	28
4.6. Flow Sitometri (FC) Analizi .....	29
5. TARTIŞMA .....	31
5.1. Sürgün ucu canlılık oranı (%) .....	31
5.2. Sürgün uzunluğu (cm) .....	31
5.3. Sürgün çapı (mm) .....	32
5.4. Stoma gözlemleri .....	32
5.5. Kloroplast sayısı (adet stoma <sup>-1</sup> ) .....	33
5.6. Flow sitometri analizi .....	34
6. SONUÇLAR .....	37
7. ÖNERİLER .....	39
KAYNAKLAR .....	41
ÖZGEÇMİŞ .....	50

## ÖZET

### YÜKSEK LİSANS TEZİ

#### PISTACIA ATLANTICA DESF. TOHUMLARINDA POLİPLOİDİ TEŞVİKİ ÜZERİNDE ARAŞTIRMALAR

YETER AYDINLIK

HARRAN ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ  
BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

Tez Danışman: Prof. Dr. BEKİR EROL AK  
İkinci Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi HEYDEM EKİNCİ  
Yıl: 2026, Sayfa : 50

Poliploidi, bitkilerde kromozom sayısının katlanmasıyla ortaya çıkan; hücre, doku ve organlarda önemli morfolojik ve fizyolojik değişimlere yol açan bir ıslah yöntemidir. Anaç ıslahında poliploidi, stres toleransının artırılması, büyüme karakterlerinin düzenlenmesi ve aşı uyumunun iyileştirilmesi açısından büyük önem taşımaktadır. Bu bağlamda antimitotik ajanlar kullanılarak poliploidi indüksiyonu, meyve türlerinde yeni ve üstün anaçların geliştirilmesine yönelik etkili bir yöntem olarak değerlendirilmektedir. Bu çalışma, *Pistacia atlantica* Desf. (Atlantik sakızı) tohumlarında orizalinin farklı doz ve uygulama sürelerinin poliploidi teşviki üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla yürütülmüştür. Küresel ölçekte artan antepfıstığı anacı gereksiniminin karşılanmasına katkı sağlamak hedefiyle, çimlenmiş Atlantik sakızı tohumlarına kotiledon döneminde 50, 100 ve 200 µM orizalin dozları 24, 48 ve 96 saat sürelerle uygulanmıştır. Orizalin uygulamalarının etkileri; sürgün ucu canlılık oranı, sürgün uzunluğu ve çapı gibi morfolojik özelliklerin yanı sıra stoma yoğunluğu, stoma boyutları ve stoma bekçi hücrelerindeki kloroplast sayıları gibi anatomik ve sitolojik parametreler üzerinden değerlendirilmiştir. Ayrıca, poliploidi indüksiyonunun doğrulanması amacıyla flow sitometri (FC) analizleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar, orizalin uygulamalarının tüm doz ve sürelerde sürgün ucu canlılık oranlarını kontrol grubuna kıyasla azalttığını, bu azalmanın özellikle yüksek doz ve uzun süreli uygulamalarda daha belirgin olduğunu göstermiştir. Orizalin uygulamaları sürgün uzunluğu ve sürgün çapında da azalmaya neden olmuş, vejetatif gelişimin baskılandığı belirlenmiştir. Stoma analizleri sonucunda, uygulamalarla birlikte stoma yoğunluğunun azaldığı, buna karşılık bazı uygulamalarda stoma uzunluğu ve genişliğinde artış meydana geldiği saptanmıştır. Stoma bekçi hücrelerindeki kloroplast sayıları ise kontrol grubuna kıyasla bazı uygulamalarda artış göstermiştir. Kloroplast sayımı ile poliploidiye işaret eden örneklerde yapılan flow sitometri analizleri sonucunda, 200 µM dozunda 96 saat süreyle uygulama yapılan bitkide bir adet miksploid birey tespit edilmiştir. FC analizlerinden elde edilen bulgular, kloroplast sayımı sonuçlarıyla paralellik göstermiştir. Sonuç olarak, *Pistacia atlantica* anaçlarında orizalin uygulamaları ile poliploidi indüksiyonunun mümkün olduğu, ancak başarı oranının düşük olduğu ve uygulama doz ile sürelerinin anaç canlılığı ile poliploidi oluşumu arasında hassas bir denge gerektirdiği anlaşılmıştır.

**ANAHTAR KELİMELER:** Pistacia, Poliploidi teşviki, Orizalin , Anaç ıslahı , Flow sitometri

## ABSTRACT

### MASTER THESIS

#### INVESTIATIONS ON POLYPLOIDY INDUCTION IN PISTACIA ATLANTICA DESF. SEEDS

YETER AYDINLIK

HARRAN UNIVERSITY  
INSTITUTE OF RADUATE EDUCATION  
DEPARTMENT OF HORTICULTURAL SCIENCES

Thesis Supervisor: Prof. Dr. BEKİR EROL AK  
Second Thesis Supervisor: Assist. Prof. Dr. HEYDEM EKİNCİ  
Year: 2026, Page : 50

Polyploidy is a breeding method that arises from the multiplication of chromosome numbers in plants and leads to significant morphological and physiological changes in cells, tissues, and organs. In rootstock breeding, polyploidy is of great importance in terms of enhancing stress tolerance, regulating growth characteristics, and improving graft compatibility. In this context, polyploidy induction using antimitotic agents is considered an effective approach for the development of new and superior rootstocks in fruit species. This study was conducted to determine the effects of different doses and application durations of oryzalin on polyploidy induction in the seeds of *Pistacia atlantica* Desf. (Atlantic pistachio). With the aim of contributing to the increasing global demand for pistachio rootstocks, germinated *P. atlantica* seeds at the cotyledon stage were treated with oryzalin at doses of 50, 100, and 200  $\mu\text{M}$  for 24, 48, and 96 hours. The effects of oryzalin applications were evaluated based on morphological characteristics such as shoot apex survival rate, shoot length, and shoot diameter, as well as anatomical and cytological parameters including stomatal density, stomatal dimensions, and chloroplast number in stomatal guard cells. In addition, flow cytometry (FC) analyses were performed to confirm polyploidy induction. The results indicated that oryzalin treatments reduced shoot apex survival rates at all doses and durations compared to the control, with more pronounced reductions observed at higher doses and longer application periods. Oryzalin applications also caused decreases in shoot length and shoot diameter, indicating suppression of vegetative growth. Stomatal analyses revealed a decrease in stomatal density following treatments, while increases in stomatal length and width were observed in some applications. The number of chloroplasts in stomatal guard cells increased in certain treatments compared to the control. As a result of flow cytometry analyses performed on samples showing indications of polyploidy based on chloroplast counts, one mixoploid individual was detected in the seedling treated with 200  $\mu\text{M}$  oryzalin for 96 hours. The findings obtained from FC analyses were consistent with the results of chloroplast counting. In conclusion, polyploidy induction in *Pistacia atlantica* rootstocks through oryzalin application is possible; however, the success rate was low, and it was determined that application dose and duration require a delicate balance between rootstock viability and polyploidy induction.

**KEYWORDS:** Pistacia, Polyploidy induction, Oryzalin , Rootstock breeding , Flow cytometry

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.29. Atlantik sakızı anacı (Orjinal) .....	15
Şekil 3.29. Denemede kullanılan atlantik sakızı anacı tohumları .....	17
Şekil 3.29. Denemede kullanılan orizalin ve uygulama yapılan atlantik sakızı bitkicikleri .....	18
Şekil 3.29. Büyüme ucunun kotiledon yaprakları arasında görüldüğü dönemde orizalin uygulamalarının yapılması .....	19
Şekil 3.29. Deneysel tasarımın şematik gösterimi .....	20
Şekil 3.29. Kotiledon aşamasında orizalin uygulaması yapılmış bitkilerde sürgün uzunluğunun ölçülmesi .....	21
Şekil 3.29. Sürgün çapı ölçümü .....	22
Şekil 3.29. Denemede kullanılan bitkilerin stoma özelliklerinin tespiti .....	23
Şekil 3.29. Denemede kullanılan bitkilerin kloroplast özelliklerinin tespiti .....	23
Şekil 3.30. Flow sitometri analizi için örneklerin hazırlama aşamaları (Orijinal) .....	24
Şekil 4.14. T9 (200 µM 96 saat) uygulamasına ait FC sonucu .....	30

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Atlantik sakızı anaçlarına farklı orizalin konsantrasyonları uygulama grupları .....	19
Çizelge 4.1. Orizalin uygulamalarının sürme oranı, sürgün ucu canlılığı ve vejetatif gelişim üzerine etkileri .....	26
Çizelge 4.1. Orizalin uygulamalarının stoma sayısı, stoma boyutları ve stoma yoğunluğu üzerine etkileri .....	28
Çizelge 4.1. Orizalin uygulamalarının stoma bekçi hücrelerindeki kloroplast üzerine etkileri .....	28

## SİMGELER

<b>%</b>	Yüzde
<b>C</b>	: Santigrat derece
<b>cm</b>	Santimetre
<b>mm</b>	Milimetre
<b>μM</b>	Mikro molar

## 1. GİRİŞ

*Pistacia* L. *Anacardiaceae* familyasına ait, dünyada yaklaşık 15 türü bulunan önemli bir cinistir. Bu bitkiler dünyada 29 ila 42 derece kuzey enleminde bulunur. *Pistacia* cinsine ait farklı türler; Akdeniz'in kuzey kuşağında yer alan Kıbrıs, Fransa, Yunanistan, İtalya, İspanya ve Türkiye'de; Kuzey Afrika'da Tunus, Fas ve Cezayir'de; Ortadoğu'da ise Afganistan, İran, Irak, Pakistan, Suriye ile Hindistan'ın kuzey kesimlerindeki bazı bölgelerde, Meksika'dan Kuzey Amerika'dan Teksas veya Kaliforniya gibi sıcak ve yarı çöl Amerika Birleşik Devletleri'ne kadar olan kısımlarda doğal yayılış göstermektedir. Afganistan, İran ve Türkiye tür çeşitliliği bakımından en zengin ülkeler arasında yer almaktadır (Ak, 2014).

*Pistacia* bitkileri, 5-20m boyunda büyüyen çalılar ve küçük ağaçlardır. *Pistacia* cinsi, az sayıda türe sahip olan ve çoğunlukla su kıtlığı olan ve alkali toprağa daha fazla adapte olmuşlardır. Birçok türü, Akdeniz ikliminin karakteristik özelliği olan çöl koşullarına ve yaz dönemindeki kuraklığa uyum sağlamıştır, bu sebeple tuzluluk oranı yüksek topraklara karşı büyük bir dayanıklılık göstermektedir (Cristiano vd., 2016). Ekolojik istekleri bakımından geniş bir tolerans aralığına sahip olup, kış döneminde -10 °C'ye kadar düşen ve yaz aylarında 45 °C'ye ulaşan sıcaklık koşullarında yaşamlarını sürdürebilmektedirler. Genellikle sıcak bölgelerde ve iyi drenajlı toprakları tercih etmelerine karşın, dağ geçitlerinin eteklerinde başarılı bir gelişim gösterirler. Kuraklık stresine dayanıklı olmalarına rağmen *pistacia* türleri yavaş gelişen bitkiler olup, dikimden sonra yaklaşık 7-10 yıl içinde meyve vermeye başlar ve tam gelişim düzeyine 15-20 yıl sonunda ulaşırlar. Ağaçlar genellikle (dioik) iki evcikliidir. Meyve Akdeniz'de ağustos ayından itibaren olgunlaşır ve yalnızca dişi ağaçlar meyve verir. Bazı türler orta düzeyde nemli koşulları tercih etmelerine rağmen, yüksek nem oranlarında gelişimleri olumsuz yönde etkilenmektedir. Doğru gelişme için her yıl bir kuraklık dönemi gerektirirler (Ak, 2014).

Türkiye, esas olarak *Pistacia vera* L., *Pistacia terebinthus* L., *Pistacia atlantica* Desf. ve *Pistacia eurycarpa* Yalt'tan oluşan büyük bir *Pistacia* germplazmasına sahiptir, *P. vera* cinsin yenilebilir meyvelere sahip olan tek türüdür ve ticari açıdan önemlidir. Diğer türler yabancı olarak yetişmekte ve yemişleri yerel tüketimin yanı sıra yağ ve sabun üretimi için kullanılmaktadır. Ancak bu türlerin asıl ekonomik önemi, *P. vera* için anaç üretmek amacıyla tohumlarını kullanmalarından kaynaklanmaktadır. Olgun yabancı *Pistacia* çeşitleri, çiftçiler için ek gelir kaynağı olarak yenilebilir *P. vera* ile üst kısımlarından aşılansarak da anaç olarak kullanılmaktadır (Kaska ve Bilgen, 1988). *P. vera*'nın cinsin en ata türü olduğu ve

diğerlerinin onun türevleri olduğuna inanılmaktadır (Zohary 1952; Parfitt ve Badenes, 1997; Kafkas ve Perl-Treves, 2001). *Pistacia* türlerine ait kromozomal veriler yetiştiriciler ve sitogenetikçiler için çok değerlidir.

*Pistacia*'da kromozom sayımı çalışmaları ve sonuçları çok az olmakla beraber biraz eskidir ve güncellenmesi gerekmektedir. İlk olarak Zohary (1952) *Pistacia* üzerine yaptığı monografik çalışmada *Pistacia vera*, *Pistacia atlantica* ve *Pistacia lentiscus* türlerinde kromozom sayılarının birbirinden farklı olduğunu ve bu sayıların sırasıyla 30, 28 ve 24 olduğunu rapor etmiştir. Yapılan önceki çalışmalar, tüm *Pistacia* türlerinin kromozom sayılarının  $2n = 24, 28$  ve  $30$  olarak diploid olduğunu göstermiştir (Zohary, 1952; Mehra ve Sareen, 1969; Nilsson ve Lassen, 1971; Bochantseva, 1972; Mehra, 1976; Natarajan, 1977, 1978; Gill vd., 1984; Huang vd., 1986, 1989; Sandhu ve Mann, 1988; Ghaffari ve Fasihi Harandi, 1999; Fasihi Harandi ve Ghaffari, 2001). Antepfıstığının ıslahı, dioik çiçek yapısı, gençlik döneminin oldukça uzun olması ve periyodisite göstermesi gibi birçok sınırlayıcı faktörden dolayı oldukça uzun sürmektedir. Bu süreyi kısaltmak ve istenilen özelliklerin daha etkili bir şekilde aktarılabilmesi için anaçlar kullanılmaktadır.

Meyvecilikte anaçlar, farklı amaçlarla kullanılmakta olup üzerlerine aşılanan çeşitlerin birçok özelliğini belirgin biçimde etkilemektedir. Anaç seçimi; çeşidin büyüme gücü, gelişim hızı ve verim performansı üzerinde önemli rol oynamaktadır. Bunun yanı sıra anaçlar, özellikle elverişsiz toprak koşullarına karşı bitkiye kazandırdığı dayanıklılık nedeniyle büyük önem taşımaktadır. Meyvecilik uygulamalarında anaç kullanımı sayesinde, dünya genelinde karşılaşılan pek çok abiyotik stres etmeninin neden olduğu olumsuzluklar azaltılabilmekte ya da tamamen ortadan kaldırılabilmektedir. Ayrıca anaçlar, meyve kalitesini doğrudan etkileyen irilik, renk, sertlik, besin elementi içeriği, kuru madde ve asit oranları ile meyvenin depolama süresince dayanıklılığı üzerinde de belirleyici etkilere sahiptir (Bolat ve İkinci, 2019). Anaç kullanımının günden güne öneminin artmasıyla beraber değişen iklim istekleri ve stres koşulları karşısında yeni genotiplere ihtiyaç duyulmaktadır. Bitki ıslahında temel yaklaşımlar arasında genetik çeşitliliğin oluşturulması ve bu çeşitlilik içerisinde hedeflenen özellikleri taşıyan bireylerin seçilmesi bulunmaktadır. Genetik farklılıklar; melezleme, mutasyon ve poliploidi gibi klasik ve modern ıslah yöntemleri aracılığıyla meydana getirilebilmektedir (Sharma vd., 2009). *Pistacia* türlerinin tohumları kullanılarak yeni plantasyon kaynakları artırılmalı, orta ve uzun vade de tekrarlanan ve ayrıntılı çalışılan ıslah programları sonuçlarına göre tespit edilecek üstün özellikli anaç genotipler, vegetatif yöntemlerle çoğaltılarak yeni plantasyonlarda kullanılması önemli rol oynamaktadır. Poliploidi,

hücre çekirdeğinin ikiden fazla tam kromozom takımına sahip olması olarak tanımlanır, bu durum bitkilerin çevresel koşullara uyum sağlamasında önemli rol oynamaktadır (Ramsey ve Schemske, 1998). Ayrıca poliploidi, yeni türlerin ortaya çıkmasına katkı sunmaktadır (Soltis vd., 2009; Jiao vd., 2011). Poliploidleşme, uzun süredir farklı bitki familyalarına ait çok sayıda türde uygulanan bir yöntem olup (Soltis vd., 2004), pek çok bitkide yeni genetik kaynakların geliştirilmesi ve ıslah çalışmalarının ilerletilmesi açısından önemli bir araç olarak değerlendirilmektedir (Yue vd., 2017). Hücre çekirdeğinde iki ya da daha fazla kromozom seti bulunduran bitkiler poliploid olarak tanımlanmakta Ramsey ve Schemske (1998) ile Comai (2005) ve bu durum; morfolojik, fizyolojik, sitolojik ve fitokimyasal özellikler dahil olmak üzere çeşitli yapısal ve işlevsel değişimlere yol açarak bitkilerin çevresel koşullara uyum yeteneğini artırabilmektedir (Notsuka vd., 2000; Motosugi vd., 2002b; Ramanna ve Jacobsen, 2003; Thao vd., 2003; Sattler vd., 2016; Chen vd., 2017).

Poliploid organizmalar genellikle daha güçlü bir büyüme gösterir ve bazı durumlarda diploid akrabalarına göre çeşitli özellikler bakımından daha üstün performans sergilerler (Sattler vd., 2016). Bunun nedeni, poliploidleşmenin hücre boyutunu artırmasıdır. Hücrelerin büyümesiyle birlikte poliploid bireylerde kök, yaprak ve meyve gibi organlar da diploid bireylere kıyasla daha büyük olur. Ancak, artan hücre büyüklüğü her zaman bitki büyüklüğünde genel bir artışa yol açmaz. Örneğin, tetraploid anaçlar diploid akrabalarından daha kalın ve daha kısa köklere sahiptir; kök emiciliğini etkileyen temel faktör olan köklerin yüzey alanı tetraploidlerde diploid orijinlerine kıyasla daha küçüktür, bu nedenle tetraploidler bodur anaç olarak kullanılabilirler.

Bitkilerde poliploidi teşviki için kolhisin ve orizalin gibi antimitotik bileşiklerin yanı sıra trifluralin ve amipropos-metil gibi çeşitli kimyasallar da kullanılmaktadır (Blakeslee ve Every, 1937; Bouvier vd., 1994; Dewitte vd., 2010; Podwyszyńska vd., 2011). Bu kimyasallar arasında en yaygın kullanılan madde kolhisindir (Rogalska vd., 2007; Dhooghe vd., 2011). Ancak orizalin gibi herbisitler, düşük konsantrasyonlarda etkili olabilmeleri ve insan sağlığı açısından kolhisine kıyasla daha az toksik olmaları nedeniyle dikkat çekmektedir (Dhooghe vd., 2011). Ayrıca orizalinin, NaOH veya etanol içinde çözünmesi önemli bir avantaj sağlarken; kolhisin genellikle bitki dokusunda daha fazla hasara yol açabilen DMSO içinde çözünmektedir (Hamill vd., 1992). Orizalin, kolhisinle benzer bir etki mekanizmasına sahip olup, uygun konsantrasyonlarda mitotik mili depolimerize etmekte ve bu sayede daha fazla poliploid hücrenin oluşmasına olanak tanıyarak

daha yüksek bir verimlilik sağlamaktadır (Morejohn & Bureau, 1993).

Bu çalışmada, küresel düzeyde fıstık anacı gereksiniminin karşılanmasına yönelik olarak orizalinin farklı doz ve sürelerle Atlantik sakızı anacının çimlenmiş tohumlarına yapılan uygulamalarla poliploid fıstık anaçları eldesi amaçlanmıştır. Kimyasal mutajen uygulamalarının morfolojik ve sitolojik etkileri; makroskobik, mikroskobik ve sitolojik analiz yöntemleri kullanılarak değerlendirilmiştir.

## 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

### 2.1. Poliploidi

Bitki ıslahı, uzun vadeli ve kapsamlı bir süreç olup; insan ve hayvan beslenmesinde ihtiyaç duyulan gıda ve yem talebini karşılamak amacıyla, yüksek verim kapasitesi gösteren, kalite özellikleri gelişmiş ve hastalık ile zararlılara karşı dayanıklılığı artırılmış yeni bitki çeşitlerinin geliştirilmesini hedeflemektedir (Acquaah, G. 2012).

Islah uygulamaları içinde yer alan ve “poliploidi ıslahı” olarak tanımlanan bu yaklaşımda, canlıların kromozom sayısı; doku kültürü ve melezleme gibi tekniklerden yararlanılarak kolhisin, orizalin, trifluralin ve amipropos-metil gibi antimitotik maddeler ile temel kromozom setinin katları hâlinde artırılmaktadır (Ramsey & Schemske, 1998; Dhooghe vd., 2011).

Poliploidi'nin, son 350 milyon yıldır bitkilerin evrimsel sürecine eşlik ettiği bilinmektedir (Vision vd., 2000; Bowers vd., 2003). Poliploid türlerin, yeni oluşan habitatlarda başarılı bir şekilde yayılım gösteren istilacı organizmalar olarak tanınması nedeniyle, mesozoik dönemin sonuna doğru (yaklaşık 65 milyon yıl önce) açık tohumluların önemli ölçüde azalış ve yok oluş sürecine girmesiyle birlikte, ekolojik boşlukların odunsu kapalı tohumluların yeni oluşmuş poliploid formları tarafından doldurulduğu varsayılmaktadır (Stebbins, 1950).

Bitkilerde, doğal yolla poliploidi oluşumunu sağlayan çeşitli mekanizmalar bulunmaktadır. Bu mekanizmalar, mitoz sırasında somatik dokunun kromozom sayısının ikiye katlanması, gametik indirgenmenin gerçekleşmemesi ve polispermidir. Somatik kromozom katlanması, tamamen poliploid bireylerin elde edilmesinde veya bazı apikal meristem bölgelerinde lokal poliploid kimeraların oluşmasında etkili olup, genellikle zigot ya da genç embriyo evresinde meydana gelir (Ahloowalia ve Garber, 1961; Hiesey vd., 1971). Mitotik veya mayotik düzensizlikler sonucu birden fazla kromozom setine sahip gametlerin oluşması, poliploid bitkilerin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Nadir olarak meydana gelen diploit gametler, haploid gametlerle birleşerek triploid zigotların oluşumuna yol açar. Bu triploid bireyler genellikle kararsızdır; steril olabilmekte veya poliploid gametler üretebilmektedir. Ayrıca poliploidinin, poliembriyonik tohumlardan da kaynaklandığı bilinmektedir (Webber, 1940). Poliploidi oluşumunun ikinci ana mekanizması ise mikrosporogenez ve megasporogenez sırasındaki gametik azalmadır.

Poliploidi, yüksek bitkilerin evrimsel süreçlerinde kritik bir rol oynamıştır (Leitch ve Bennett, 1997). İlk başlarda, poliploid türlerin tek bir kökenden türediği ve tür içerisindeki tüm bireyler arasında genetik olarak homojen bir yapı bulunduğu varsayılmaktaydı. Ancak, özellikle DNA markörlerinin kullanıldığı modern moleküler biyoloji teknikleri, tek bir poliploid türünün birden fazla bağımsız kökene sahip olabileceğini ortaya koymuştur. Bu durum, poliploidlerde tek kökenli oluşuma kıyasla daha yüksek düzeyde genetik varyasyonun oluştuğunu göstermektedir (Soltis ve Soltis, 1993; Soltis vd., 1993; Leitch ve Bennett, 1997; Soltis ve Soltis, 1999; Doyle vd., 2004; Soltis vd., 2004; Martelotto vd., 2007).

Poliploidizasyonun fenotip üzerinde doğrudan etkileri bulunmaktadır. Kromozom sayısının ikiye katlanması, zaman içerisinde popülasyonlarda ani, belirgin ve aşırı değişimlere yol açabilmektedir (Levin, 1983). Genom duplikasyonunun (ikiye katlama) en yaygın sonucu hücre hacmindeki artıştır. Bu durum, çevresel koşullara bağlı olarak da farklılık gösterebilmektedir. Genel olarak, stoma boyutu ploidi düzeyinin dolaylı bir göstergesi olarak kullanılmaktadır. Polen çapı da ploidi tespitinde başvurulan bir diğer morfolojik ölçüt olarak değerlendirilmektedir. Hücre hacmindeki değişimlerin, özellikle hücre zarındaki metabolik süreçleri etkileyebileceği de bildirilmektedir (Cavalier-Smith, 1978).

Poliploid bitkiler, gövde, yaprak ve çiçek gibi organlarının diploid akrabalarına kıyasla genellikle daha büyük olması ve yüzey alanlarının daha geniş olmasıyla dikkat çeker. Daha büyük hücre yapısına ve daha yüksek klorofil içeriğine sahip olmaları, bu bitkilere karakteristik olarak daha koyu yeşil bir renk kazandırır. Bu özellik, fotosentetik kapasitenin diploidlere göre artmasına da katkı sağlamaktadır (Molin vd., 1982; Đlarıslan, 1990). Poliploid bitkilerde, çiçeklerin yanı sıra meyveler de daha büyük boyutlara ulaşmakta ve bu durum, onların ticari değerini önemli ölçüde artırmaktadır. Söz konusu özellik, yalnızca vejetatif organları değerlendirilen bitkiler için değil, aynı zamanda süs bitkileri ıslahında çalışan araştırmacılar açısından da büyük ilgi uyandırmıştır (Rose ve Tobutt, 2000; Vainöle ve Repo, 2000). Hücre büyüklüğündeki artış, örneğin yapraklarından uçucu yağ elde edilen nane gibi bitkilerde, sekonder metabolit sentezinde belirgin bir yükselme ile sonuçlanabilmektedir (Tyagii ve Navgi, 1987; Greisbach, 1990). Ayrıca poliploidler, diploidlere kıyasla genellikle çevresel stres koşullarına karşı daha dayanıklı olup, genetik adaptasyon yetenekleri de daha yüksektir (Estilai ve Shannon, 1993). Süs bitkileri yetiştiriciliğinde, daha büyük çiçeklere sahip ve soğuk toleransı yüksek çeşitlerin geliştirilmesinde poliploid bitki üretimi yaygın olarak kullanılmaktadır. Tıbbi amaçlı bitkiler açısından da poliploidi büyük önem taşımaktadır; çünkü bu

türlerde hem bitki biyokütlesi hem de etken bileşenlerin içerikleri artış göstermektedir (Gao vd., 1996).

Poliploidi ıslahında kromozomları katlamak amacıyla orizalin kullanılmaktadır. Orizalin, uygulandığı dokularda hücre bölünmesi sırasında iğ iplikçiklerinin oluşumunu engeller. Bu nedenle çoğalmış kromozomlar hücrenin kutuplarına ayrılamaz ve sonuçta kromozom sayısı iki katına çıkar (Andreu vd., 1982).

## 2.2. Orizalin ile Poliploidi Teşviki

Vainola (1999), in vitro koşullarda yetiştirilen üç farklı *Rhododendron* (ormangülü) çeşidinde, kolşisin ve orizalin uygulamalarının etkilerini incelemiştir. Her iki kimyasal da 24 ve 48 saatlik sürelerle uygulanmış, yüksek konsantrasyonlarda her iki uygulamanın da bitkilerde ölümle sonuçlandığı bildirilmiştir. Çalışmada orizalin uygulanan bitkilerin tamamının öldüğü, kolşisinin ise 48 saatlik uygulamasında belirgin derecede tahrip edici etkiler gözlemlendiği belirtilmiştir. Ploidi düzeylerinin belirlenmesi flow sitometri ile yapılmış; orizalinin ploidi düzeyini kolşisine kıyasla daha fazla değiştirdiği, ancak kullanılan konsantrasyonların genel olarak deney süresi boyunca anlamlı bir farklılık yaratmadığı ifade edilmiştir. Yaşamını sürdüren %18,2'lik bitki grubunda, 24 saat boyunca %0,005 orizalin uygulanan örneklerden yüksek oranda tetraploid bitki elde edilmiştir.

Sakhanokho vd. (2009), bodur bir süs zencefili türü olan *Hedychium muluense* üzerinde yürüttükleri çalışmada, in vitro koşullarda poliploidi oluşturmak amacıyla 30, 60 ve 120  $\mu$ M orizalin ile 2,5 - 5 ve 10 mM kolhisini 24, 48 ve 72 saat süreyle uygulamışlardır. Araştırma sonucunda her iki kimyasalın triploit ve tetraploit bireylerin oluşumunu teşvik edebildiği; ancak orizalinin poliploidi indüksiyonunda kolhisinden daha yüksek etkinlik gösterdiğini bildirmişlerdir. Ploidi düzeyinin belirlenmesinde FC analizinin, stoma sıklığı ve kloroplast sayımının ploidi değerlendirme yöntemleri olarak stoma uzunluğuna kıyasla daha güvenilir ve etkili olduğu ifade edilmiş; ayrıca embriyojenik kalluslara 72 saat süreyle uygulanan 60  $\mu$ M orizalinin tetraploidi oluşturma açısından en başarılı uygulama olduğu ve bu koşulda %15 oranında tetraploid bitki elde edildiği belirlenmiştir.

Ming vd. (2012), üç *Lilium* türünde (*L. pumilum*, *L. sargentiae*, *L. tsingtauense*) tetraploit zambak elde etmeyi amaçlayarak kolhisin (%0 - 0,02 ve 0,04) ve orizalin (%0 - 0,006 ve 0,01) uygulamalarını 24 ve 48 saat süreyle

gerçekleştirmişlerdir. Kolhisin muamelelerinde en yüksek tetraploit oranı, *L. pumilum* için %0,04 dozunun 24 saatlik uygulamasıyla, *L. sargentiae* ve *L. tsingtauense* için ise %0,02 ve %0,04 dozlarının 48 saatlik uygulamalarıyla elde edilmiştir. Orizalin ile tetraploit teşvikinde optimal süre ve doz, *L. tsingtauense* ve *L. sargentiae* için 24 veya 48 saat %0,01, *L. pumilum* için ise 24 saat %0,01 ve 48 saat %0,006 olarak belirlenmiştir. Çalışmada orizalin, zambak türlerinde tetraploit oluşumunu teşvik etmede kolhisinden daha etkin bulunmuştur. Ayrıca mutajen uygulamalarının süresi ve dozu, bitkilerin hayatta kalma oranı, soğan gelişimi ve kromozom çoğalması üzerinde önemli etkiler göstermiştir. Bitkilerin stoma özellikleri ile yapraklarının morfolojik ve anatomik yapısının ploidi seviyesiyle ilişkili olduğu, kromozom sayımı ve FC analizleri ile doğrulanmıştır.

Chung vd. (2014), *Calanthe discolor* ve *C. sieboldii* türlerinin melezlerinden elde edilen tohumlarda tetraploit ve miksploit bitkilerin oluşumunu incelemişlerdir. Çalışmada, tohumlara %0,05 ve 0,1 kolhisin dozları 3 ve 7 gün, %0,003 orizalin dozu ise 1, 2, 4 ve 7 gün süreyle uygulanmıştır. FC analizleriyle en yüksek etkinliğin, tohumlara %0,003 orizalin dozunun 1 gün (%86 tetraploit, %14 miksploit) ve 2 gün (%85 tetraploit, %15 miksploit) uygulanmasıyla sağlandığı belirlenmiştir. Ayrıca sitolojik ve morfolojik incelemeler FC analizleriyle doğrulanmış; tetraploit bitkilerin stoma yoğunluğunun diploidlere göre daha düşük, stoma boyutlarının ise belirgin şekilde daha büyük olduğu, yapraklarının ise daha kısa ve yuvarlak olduğu bildirilmiştir.

Aleza vd. (2009), triploit çekirdeksiz narenciye genotipleri geliştirmek amacıyla diploit çeşitlerden elde edilen polenleri tetraploit ve apomiktik olmayan çeşitlerle melezlemişlerdir. Araştırmada %0,1'lik kolhisin ve orizalin uygulamalarının etkisi değerlendirilmiş; toplam 60 bitki içerisinde kolhisin uygulamasından 9, orizalin uygulamasından ise 20 canlı bitki elde edilmiştir. FC analizine göre her iki uygulamada da üçer bitkinin tetraploit olduğu belirlenmiş; buna ek olarak kolhisin uygulamasıyla iki, orizalin uygulamasıyla ise bir adet miksploit birey tespit edilmiştir.

Sinski vd. (2014), iki çekirdeksiz üzüm çeşidinde kromozom katlamayı sağlamak amacıyla kolhisin ve orizalini sürgün uçları ve somatik embriyolar üzerinde uygulamışlardır. Araştırmada, organogenez ve somatik embriyojenez yoluyla bitki rejenerasyonunda, orizalin konsantrasyon ve uygulama süresinin artırılmasının canlı bitki geri kazanım oranlarında doğrusal bir azalmaya yol açtığı gözlemlenmiştir. Crimson Seedless ve BRS Clara çeşitlerinin sürgün uçları ve

somatik embriyoları için daha yüksek bitki geri kazanımı sağlayan koşullar, kromozom katlama denemelerinde kullanılmıştır. Oluşturulan protokoller, her iki çeşitte de %30'un üzerinde kimerik olmayan ototetraploit bitki elde edilmesine olanak sağlamış; ayrıca stoma boyutları, rejenerantların ploidi seviyesiyle istatistiksel olarak ilişkili bulunmuş ve ön poliploidi taraması için etkili bir yöntem oluşturmuştur. Elde edilen ototetraploit üzümler, ileri agronomik değerlendirmeler için Vitis genetik kaynaklarına dahil edilmiştir. Çalışma, asmalarda in vitro orizalin kaynaklı poliploidizasyon ve kromozom katlanmasını optimize etmek amacıyla matematiksel modellemenin kullanıldığı ilk rapor olarak dikkat çekmektedir.

Tomé vd. (2016), *Solanum commersonii* ssp.'nin iki diploit klonunda tetraploit bitki oluşumunu ve yaprak anatomisini incelemek amacıyla boğum kültürü sisteminde kolhisin (3,5 - 5 ve 6, 5 mM, 72 saat) ve orizalin (10, 30 ve 50 µM, 24 saat) uygulamışlardır. Uygulamalardan sonra bitkiler MS ortamında 60 gün boyunca geliştirilmiştir. Bulgulara göre, 6.5 mM kolhisin ve 50 µM orizalin uygulamalarında canlı bitki elde edilemezken, 10–50 µM orizalin dozlarının 24 saat uygulanması tetraploit bitki oluşumunu teşvik etmiştir.

Pliankong vd. (2017), *Capsicum frutescens* L.'de poliploit fidelerin teşvikini araştırmak amacıyla, çimlenmeden önce karanlık ve oda sıcaklığı koşullarında tohumları 6 saat boyunca kolhisin (0, 100, 200 ve 300 mg L<sup>-1</sup>) ve orizalin (0, 10, 20 ve 30 mg L<sup>-1</sup>) çözeltilerine daldırmışlardır. Sonuçlar, 300 mg L<sup>-1</sup> kolhisin uygulamasının %70 oranında en yüksek poliploidi teşvik ettiğini, 20 ve 30 mg L<sup>-1</sup> orizalin uygulamalarının ise %40'lık dozunun eşit miktarda poliploidi sağladığını göstermiştir. Poliploit bitkilerde stoma bekçi hücreleri ve meyve boyutlarının kontrol gruplarına göre daha büyük olması, poliploitlerin hızlı taranmasını kolaylaştırmıştır. Ayrıca, poliploit bitkiler kontrollerden daha fazla kapsaisin üretmiş; 300 mg L<sup>-1</sup> kolhisin ile muamele edilen tohumlardan elde edilen meyvelerde kuru ağırlıkta kapsaisin miktarı 4,55 mg g<sup>-1</sup>, kontrolde 3,32 mg g<sup>-1</sup>, 30 mg L<sup>-1</sup> orizalin uygulamasıyla elde edilen meyvelerde ise 4,44 mg g<sup>-1</sup> olarak belirlenmiştir.

Menezes-Sá vd. (2019), diploit orkidelerde yapay poliploidizasyonun teşviki ve doğrulamasını incelemek amacıyla eksplantları kolhisin ve orizalin uygulamalarına tabi tutmuşlardır. Kolhisin uygulamaları 0 - 2,5 - 7,5 ve 12,5 mM konsantrasyonlarda 24 ve 48 saat, orizalin uygulamaları ise 0, 10, 30 ve 50 µM konsantrasyonlarda 3 ve 6 gün süreyle gerçekleştirilmiştir. FC analizleri için her bitkiden bir yaprak örneği alınarak çekirdekler serbest bırakılmış ve propidyum iyodür ile boyanmıştır. FC analizine ek olarak, antimitotik işleme tabi tutulan

bitkilerin ploidi seviyesi stoma gözlemleri ile değerlendirilmiştir. Stoma yoğunluğu, işlevsellik ve stomatal indeksin belirlenmesinde genç yapraklar kullanılmıştır. C. tigrina üzerinde yapılan kolhisin uygulamaları, özellikle 48 saat 12,5 mM dozunda tatmin edici düzeyde poliploid bireylerin oluşumunu sağlamıştır; buna karşılık orizalin uygulanan bitkilerde kromozom katlanması gözlenmemiştir.

Bae vd. (2020), karpuz (*Citrullus lanatus*) bitkilerinde orizalin farklı konsantrasyon ve uygulama yöntemlerinin poliploidizasyon üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. İlk yöntemde sürgün uçlarına 0, 5, 10, 15, 20 ve 25 mg L<sup>-1</sup> konsantrasyonlarında orizalin uygulanmış; 10 mg L<sup>-1</sup> ve daha düşük dozlarda poliploidi teşvik edilmiş, 15 ve 20 mg L<sup>-1</sup> uygulamalarında miksploid bitkiler gözlenmiş ve tetraploid bitkilerin %84'ü 25 mg L<sup>-1</sup> uygulamasından elde edilmiştir. Orizaline, tween 20 yüzey aktif maddesinin eklenmesi, tek başına orizalin kadar tetraploid teşvik edici etki göstermemiştir. İkinci denemede tohumlar 0, 30 ve 35 mg L<sup>-1</sup> orizalin çözeltilerine maruz bırakılmış; 30 mg L<sup>-1</sup> poliploidiyi teşvik etmezken, 35 mg L<sup>-1</sup> uygulaması bitkilerin %25'inde poliploidi sağlamıştır. Tetraploid bitkilerin ikinci gerçek yaprakları, diploidlere kıyasla küçük, kalın ve buruşuk yapıda olup, birim alandaki stoma sayısı azalmış ve stoma boyutu iki katına çıkmıştır. Kromozom sayımıyla, bu bitkilerin tetraploid ( $2n = 4x = 44$ ) olduğu doğrulanmıştır. Sürgün uçlarına 25 mg L<sup>-1</sup> orizalin uygulanmasının, tetraploid karpuz elde etmede en etkili yöntem olduğu belirlenmiştir.

Lan vd. (2020), *Rhododendron fortunei* tohumlarını farklı orizalin dozlarına 16 saat süreyle maruz bırakmış ve FC analizleri ile ploidi düzeylerini belirlemişlerdir. Çalışma sonucunda, 27 tetraploid ve 7 oktoploid hat olmak üzere toplam 34 poliploid R. fortunei hattı tespit edilmiş ve 7,5 mg L<sup>-1</sup> orizalin, optimal poliploid dozu olarak belirlenmiştir. Tetraploid ve oktoploid bitkiler, diploidlerle karşılaştırıldığında daha yavaş büyüme göstermiş; yaprakları daha kalın, yuvarlak ve kıvrık biçimde olup, epidermal tüy sayısı daha fazladır. Ayrıca, poliploid bitkilerin yapraklarındaki stoma sayısı azalırken stoma boyutu artmış ve klorofil içeriği yükselmiş, bu durum yaprakların daha koyu yeşil renk almasına neden olmuştur.

Cho vd. (2021), *Cucumis melo* 'Chammel' çeşidinde orizalin poliploidizasyon üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Çalışmada, orizalinle muamele edilen 58 diploid Chammel fidesinden 12 tetraploid bitki elde edilmiş ve FC analizleri ile doğrulanmıştır. Tetraploid bitkiler kendileştirilmiş ve tohumları hasat edilerek fideler, diploidlerle morfolojik ve sitogenetik olarak karşılaştırılmıştır. Sonuçlar, tetraploidlerin yaprak kalınlığının diploidlere göre belirgin şekilde arttığını, yaprak

sapının uzunluğunun ise daha kısa olduğunu göstermiştir. Ayrıca, tetraploidlerde stoma uzunluğu ve genişliği diploidlerden daha fazla olmasına rağmen birim alandaki stoma sayısı azalmış; kromozom sayımıyla diploid ve tetraploidlerin sırasıyla  $2n = 24$  ve  $2n = 48$  olduğu doğrulanmıştır.

Asmada kolşisin ve orizalin kullanılarak gerçekleştirilen kromozom katlama çalışmalarının sonuçları değerlendirildiğinde, orizalinin daha düşük dozlarda dahi yüksek düzeyde ototetraploid bitki oluşturabildiği ve uygulama sonrasında eksplantların canlılık oranlarının kolşisine kıyasla daha yüksek kaldığı bildirilmiştir (Sinski vd., 2014; Xie vd., 2015).

Aversano vd. (2013), diploid ( $2n = 2x = 24$ ) iki patates türü olan *Solanum commersonii* Dunal ve *S. bulbocastanum* Dunal'a orizalin uygulanması sonrasında ortaya çıkan bitkilerdeki anatomik değişimleri ile genetik ve epigenetik düzeydeki farklılıkları incelemiştir. Mikrosatellit markırları kullanılarak yapılan değerlendirmelerde, oluşturulan sentetik tetraploidler ile diploid ebeveynleri arasında polimorfizm belirlenmemiştir. Buna karşın, DNA metilasyon düzeylerinin analiz edilmesi sonucunda her iki türün tetraploidlerinde CG ve CHG bölgelerinde farklılaşmalar meydana geldiği, ancak bu değişikliklerin tüm tetraploidlerde aynı şekilde ortaya çıkmadığı ve dolayısıyla rastlantısal bir nitelik taşıdığı bildirilmiştir. Poliploidleşmenin yaprak ana damarları ve stomaya ilişkin morfo-anatomik etkileri değerlendirilmiştir. Bazı istisnalar dışında, tetraploid bitkilerin yaprak kalınlığı ve yüzey alanı, iletim demeti sayısı, lümen büyüklüğü ve damar duvar kalınlığı ile stoma açıklığı uzunluğu ve genişliği, bekçi hücresi genişliği ve stoma yoğunluğu bakımından diploid atalarına göre belirgin bir üstünlük göstermediği sonucuna varılmıştır.

Şimşek vd. (2013), sera koşullarında viyollerde yetiştirilen karpuz fidelerinin kotiledon dönemindeki sürgün ucu meristem bölgesini kolhisin (%0,2; %0,3; %0,4; %0,5) ve orizalin (20  $\mu$ M, 35  $\mu$ M ve 50  $\mu$ M) uygulamalarına tabi tutarak tetraploid hatların elde edilmesini amaçlamışlardır. Çalışmada kolhisin uygulamalarının üç gün boyunca günde iki kez (07.00 ve 16.00 saatlerinde) birer damla şeklinde, orizalin uygulamalarının ise günde bir kez (07.00) bir damla (50  $\mu$ l) olarak gerçekleştirildiği belirtilmiştir. Kimyasal uygulamalar sonrasında oluşan populasyonda tetraploid bireylerin belirlenmesi için morfolojik özellikler, sitolojik analizler, izoenzim profilleri ve DNA belirteçleri kullanılmıştır. Kromozom sayımı ve flow sitometri analizleri ile tetraploid bireylerin kesin olarak ayırt edilmesini sağladığı bildirilmiştir. Tetraploid bitkilerin diploidlere kıyasla daha iri yaprak ve çiçeklere sahip olduğu,

kloroplast sayısının arttığı, buna karşılık stoma yoğunluğunun azaldığı tespit edilmiştir. Elde edilen morfolojik ve sitolojik bulgular birlikte değerlendirildiğinde, tetraploid bireylerin pratik ve ekonomik olarak seçilebildiği sonucuna varılmıştır.

Thao vd. (2003), kromozom sayısı  $2n = 28$  olan *Alocasia* bitkisinde in vitro sürgün ucu eksplantlarına kolhisin ve orizalin uygulamışlardır. Her iki mutajen, %1 DMSO içinde çözülerek uygulanmıştır. Uygulamalar 24, 48 ve 72 saat süreleri boyunca gerçekleştirilmiş ve kolhisin için %0,01; %0,05 ve %0,1 orizalin için ise %0,005; %0,01 ve %0,05 konsantrasyonları kullanılmıştır. Analizler sonucunda, poliploidi indüksiyonu açısından en etkili mutajen olarak orizalin belirlenmiş ve optimum protokolün 24 saatlik uygulama süresi ile %0,01 dozunda orizalin kullanımı olduğu tespit edilmiştir.

Ermayanti vd. (2019) tarafından yapılan bir çalışmada, in vitro yetiştirilen *Colocasia esculenta* (L.) Schott (talas Bentul) bitkisinde orizalin uygulamasının poliploidi indüksiyonu üzerindeki etkileri incelenmiştir. Çalışmada iki farklı orizalin konsantrasyonu kullanılmıştır: 30  $\mu$ M ve 60  $\mu$ M, ve uygulama süresi her iki konsantrasyon için 3 gün olarak belirlenmiştir. Orizalin uygulamaları, bitkilerin meristem dokularına in vitro koşullarda uygulanmış ve ardından alınan yapraklar ile kültür köklerinden kromozom analizi yapılmıştır. Ploidi tayini için flowsitometri analizi yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar, 30  $\mu$ M orizalin uygulamasının çoğunlukla tetraploid (4x) ve az sayıda heksaploid (6x) bitki oluşturduğunu, 60  $\mu$ M uygulamanın ise 50% tetraploid ve 9,09% oktaploid üretim sağladığını göstermiştir. Bazı bitkilerde diploid (2x) olarak kalmış ve tüm klonlarda aneuploid hücreler düşük oranda gözlenmiştir.

Fong (2008), *Nepenthes gracilis* bitkisinde in vitro boğum eksplantlarını kullanarak kolhisin ve orizalin uygulamalarının DNA içerik miktarına etkilerini incelemiştir. Kolhisin uygulamaları 0; 1,25; 2,5; 5 ve 10 mM dozlarında; orizalin uygulamaları ise 0, 20, 40, 60 ve 80  $\mu$ M dozlarında, 24, 48, 72 ve 96 saat süreleri boyunca gerçekleştirilmiştir. Uygulamalar sonucunda en belirgin etkilerin, sürgün tomurcuklarının gelişiminde gecikme ve anormal vegetatif morfolojik oluşumlar olduğu bildirilmiştir. Çekirdek DNA analizi flow sitometri ile yapılmış ve tetraploidi, kolhisin ile 72 saat boyunca 10 mM dozunda, orizalin ile ise 24 saat boyunca 40  $\mu$ M dozunda oluşmuştur. Bu uygulamalar sonucunda tetraploit oranı sırasıyla %1,39 ve %0,70 olarak rapor edilmiştir.

Carvalho vd. (2005), annatto bitkisinin in vitro yetiştirilen fidelerinden elde

ettikleri hipokotil ve kotiledon boğum eksplantlarını poliploidi indüksiyonu amacıyla kullanmışlardır. Çalışmada, 100 mg/L myo-inositol + 2,28 veya 4,56  $\mu\text{M}$  ZEA + 0,3  $\mu\text{M}$  IAA içeren katı MS (Murashige ve Skoog, 1962) besin ortamı kullanılmıştır. Bu ortama kolhisin (0, 25, 250 ve 1250  $\mu\text{M}$ ) ve orizalin (0, 5, 15 ve 30  $\mu\text{M}$ ) mutajenleri eklenmiş ve eksplantlar 15 veya 30 gün süreyle muamele edilmiştir. En yüksek rejenerasyon oranı, kotiledon boğumlarında 15  $\mu\text{M}$  orizalin uygulamasının 15 gün sürdürülmesi ile elde edilmiştir. Ploidi düzeyleri flow sitometri ile belirlenmiş ve morfo-anatomik karakterizasyon ise özellikle stoma boyutlarının ölçülmesi ile yapılmıştır.

Rego vd. (2011), *Passiflora edulis* Sims'in in vitro hipokotil eksplantlarına kolhisin (0, 25, 250 ve 1250  $\mu\text{M}$ ) ve orizalin (0, 5, 15 ve 30  $\mu\text{M}$ ) uygulayarak poliploidi indüksiyonunu incelemişlerdir. Uygulamalar MS besin ortamına eklenerek gerçekleştirilmiş ve yüksek kolhisin dozları (250 ve 1250  $\mu\text{M}$ ) hipokotil eksplantlarında nekroz ve ölüme yol açmıştır. Benzer şekilde, yüksek orizalin dozları da olumsuz etkiler göstermiştir. Çalışma sonucunda, 25  $\mu\text{M}$  kolhisin ve 15  $\mu\text{M}$  orizalin uygulamalarının ototetraploid oluşumunu etkili bir şekilde teşvik ettiği belirlenmiştir.

Doğan (2022) tarafından yapılan çalışmada, 41 B ve Fercal asma anaçlarının poliploid uyarımı kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. Bitkisel materyal olarak, soğukta katlanmış tohumlar (+4 °C, nemli perlit içerisinde 90 gün) ve dinlenme döneminde alınmış en az üç göz içeren çelikler kullanılmıştır. Tohum ve çelikler basınca dayanıklı tanklara yerleştirilmiş ve N<sub>2</sub>O tüplerinden gaz akışı sağlanmıştır. Çelikler, fenolojik gelişme safhalarına göre 3–5 aralığında aktif mitoz gösteren bölgelere sahip olup, farklı doz (0; 2,5; 5 ve 10 bar) ve sürelerde (48–96 saat) N<sub>2</sub>O uygulamalarına tabi tutulmuştur. N<sub>2</sub>O gazı, basınçlı çelik tüplerden plastik kaplı bakır borular aracılığıyla muamele tankına verilmiş ve basınç regülatörleri ile kontrol edilmiştir. Soğuk etkisini kırmak amacıyla borular sıcak su içeren kovaya yerleştirilmiştir. Çelik ve tohumlara uygulanan N<sub>2</sub>O muamelelerinden sonra, bazı gruplara farklı dozlarda orizalin (0, 25 ve 100  $\mu\text{M}$ ) 48 ve 96 saat süreyle, günde iki defa (08:30 ve 18:00) uygulanmıştır. Muamelelerden sonra hayatta kalan bitkilerde, stoma yoğunluğu (adet mm<sup>-2</sup>), stoma boyutları ( $\mu\text{m}$ ), stoma bekçi hücrelerindeki kloroplast sayıları (adet stoma<sup>-1</sup>), yaprak kalınlığı, klorofil miktarı, FC analizleri ve kromozom sayımları değerlendirilmiştir. Sonuçlar, hem orizalin hem de N<sub>2</sub>O uygulamalarının poliploit bireylerin elde edilmesinde etkili olduğunu göstermiştir. Poliploit bireylerde yaprak kalınlığı, klorofil içeriği ve kloroplast sayısı diploidlere göre artarken, stoma boyutları büyümüş ve stoma yoğunluğu azalmıştır. Flow

sitometri ve kromozom sayımlarıyla poliploit ve miksoploit bireyler doğrulanmış; özellikle 41 B ve Fercal genotiplerinde 100 µM-96 saat orizalin ve 10 bar-96 saat N<sub>2</sub>O uygulamalarının etkili olduğu belirlenmiştir.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümüne ait laboratuvarında yürütülmüştür. Çalışmada bitkisel materyal olarak Atlantik sakızı (*Pistacia atlantica*) kullanılmıştır (Şekil 3.1).

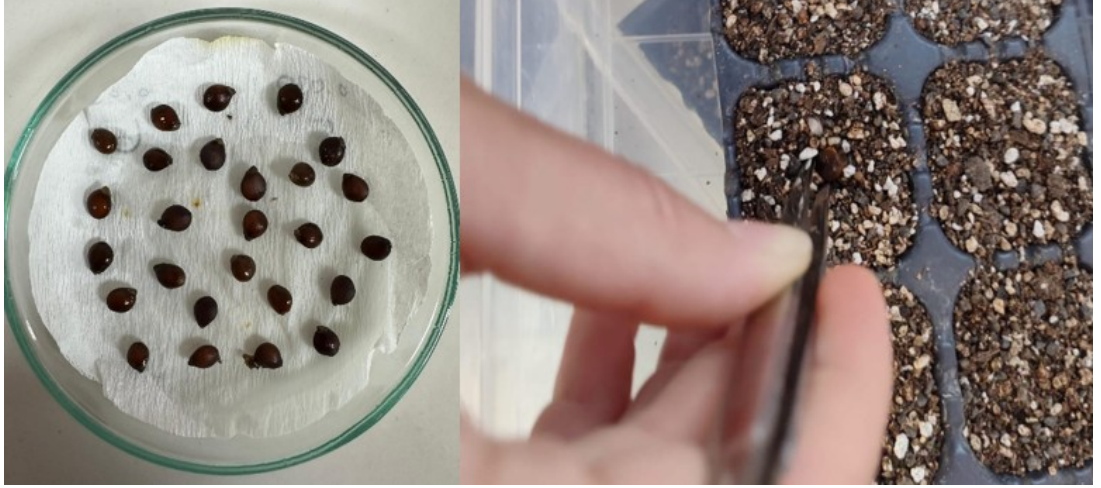


Şekil 3.29. Atlantik sakızı anacı (Orjinal)

### 3.1. *Pistacia atlantica* Desf. (Atlantik sakızı)

Atlantik sakızı (*Pistacia atlantica*) Menengiçgiller (*Anacardiaceae*) familyasından bir türdür. Akdeniz iklim koşullarının görüldüğü alanlarda yaygın bir yayılış göstermektedir. Taç yüksekliği 15–20 m'ye kadar ulaşabilen ağaçları ile Türkiye'de bilinen antepfıstığı türleri arasında en büyük ağaç formuna sahiptir. Bu özellikleri nedeniyle park ve bahçe düzenlemelerinde süs bitkisi olarak tercih edilmektedir. Yapraklar, karşılıklı yerleşmiş 2–5 çift yaprakçık ile uç kısmında tek bir yaprakçıktan oluşan tek tüysü birleşik yapıdadır. Yaprakçıkların boyutları 2,5–8 × 0,8–2,2 cm arasında değişmekte olup, şekilleri yumurtamsı-dikdörtgenimsi ya da mızraksı formda; yuvarlak olup, diğer *pistacia* türlerinden farklı olarak kirpiksi çıkıntılar içermemektedir. Yaprakların üst yüzeyi koyu yeşil renkte, alt yüzeyi ise daha açık tonlardadır. Mart ve Nisan aylarında çiçeklenmektedir. Çiçek kurulları birleşik salkım şeklinde, çiçekler kırmızımsı mor renktedir. Meyve 5-8 x 5-6 mm boyutlarda, yaklaşık küre biçiminde, başlangıçta yeşil, olgunlukta koyu mavi renktedir. Tohumlar Eylül-Ekim aylarında olgunlaşır. Toprak isteği bakımından diğer anaçlara göre daha seçicidir. Derin ve süzek topraklarda iyi taç oluştururlar. Ağaç, farklı çiçek türleri üreten erkek ve dişi ağaçlarla dioik'tir. Her iki tip çiçek de küçük ve yeşilimsidir ve hızla düşer. Aşısı uyuşması iyidir (Yılmaz vd., 2023). Tohumları %60 oranında yağ içermektedir. Avrasya'nın Kuzey Afrika'dan bir zamanlar yaygın olduğu İran plato'suna kadar bir bölümüne özgüdür. Ülkemizde Çatalca–Kocaeli, Orta Karadeniz, Asıl Ege, Orta Kızılırmak ve Antalya alt bölgelerinde doğal olarak bulunmaktadır. Deniz seviyesinden yaklaşık 1–1500 m yükseltiler arasında; kurak yamaçlar ile yol ve tarla kenarları gibi alanlarda gelişim göstermektedir. (Davis, 1982; Zohary, 1952).

Çalışmada, Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümüne ait deneme arazisinden hasat edilen *Pistacia atlantica* (atlantik sakızı) anaçlarından elde edilen tohumlar kullanılmıştır.



Şekil 3.29. Denemede kullanılan atlantik sakızı anacı tohumları

### 3.2. Orizalin

Orizalin, dinitroanilin grubuna dahil olan sentetik bir herbisit olup yabancı ot mücadelesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Hücre bölünmesi sırasında mikrotübül organizasyonunu bozarak etki gösterir. Bitkisel tubulinlere kolhisine kıyasla daha yüksek bağlanma eğilimi göstermesi nedeniyle çoğu durumda kolhisinden daha etkili olduğu bildirilmektedir (Doležel vd., 1994). Son yıllarda yayımlanan çeşitli çalışmalarda, orizalinin kolhisine güçlü bir alternatif oluşturduğu vurgulanmıştır. Ayrıca, kolhisinle karşılaştırıldığında kullanım ve çalışma açısından daha güvenli olması, onu potansiyel bir ikame haline getirmektedir (Ascough vd., 2008). Orizalin uygulamasıyla çok sayıda bitki türünde kromozom katlanmasının başarıyla gerçekleştirildiği rapor edilmiştir. Bunlardan bazıları; Vitis (Sinski vd., 2014; Xie vd., 2015), Alocasia (Thao vd., 2003), Bixa orellana (de Carvalho vd., 2005), Buddleja (Dunn ve Lindstrom, 2007), Buddleja davidii (Eeckhaut, 2003), Buddleja globosa (Van Laere vd., 2009), Chaenomeles japonica (Stanys vd., 2006), Citrus (Wu ve Mooney, 2002; Aleza vd., 2009), Dracaena deremensis (Teng ve Leonhardt, 2007), Hypericum (Meyer vd., 2009), Liliun longiflorum (Takamura vd., 2001), Malus (Bartish ve Weeden, 1996), Musa spp. (Ganga ve Chezhiyan, 2002), Paspalum notatum (Quesenberry vd., 2010), Rhododendron (Väinölä, 2000), Rosa (Kermani vd., 2003), Smallanthus songifolius (Viehmánová vd., 2009), Solanum (Greplova vd., 2009), Tulipa gesneriana (Chauvin vd., 2005) ve Watsonia lepidota (Ascough vd., 2008) olarak sıralanabilir.

Denemede kullanılan 19044-88-3 CAS numaralı orizalin ( $C_{12}H_{18}N_4O_6S$ , moleküler ağırlık:346.4), Duchefa Biochemie firmasından temin edilmiştir.



**Şekil 3.29.** Denemede kullanılan orizalin ve uygulama yapılan atlantik sakızı bitkicikleri

### 3.3. Yöntem

Poliploidi teşviki için Atlantik sakızı anaçlarından elde edilen tohumlar çimlenmeyi hızlandırmak için +4 °C'de 30 gün süreyle soğuk katlama işlemine alınmıştır. Katlama sürecinin ardından tohumlar çeşme suyu ile yıkanmış ve sera koşullarında, 2:1 oranında torf-perlit karışımı içeren viyollere ekilmiştir. Çimlenen bitkilerin kotiledon yapraklarını oluşturup iki kotiledon yaprağı arasında büyüme noktası görünür hale geldiğinde sürgün ucu meristem bölgesine çeşitli dozlarda (50, 100 ve 200 µM) günde iki kez (08:30 ve 18:30 saatlerinde) uygulanmış ve uygulama süreleri 24, 48 ve 96 saat olarak belirlenmiştir. Denemeler, tesadüf parselleri deneme desenine göre üç tekerrürlü olarak planlanmış ve her tekerrürde 20 bitkicik kullanılmıştır.



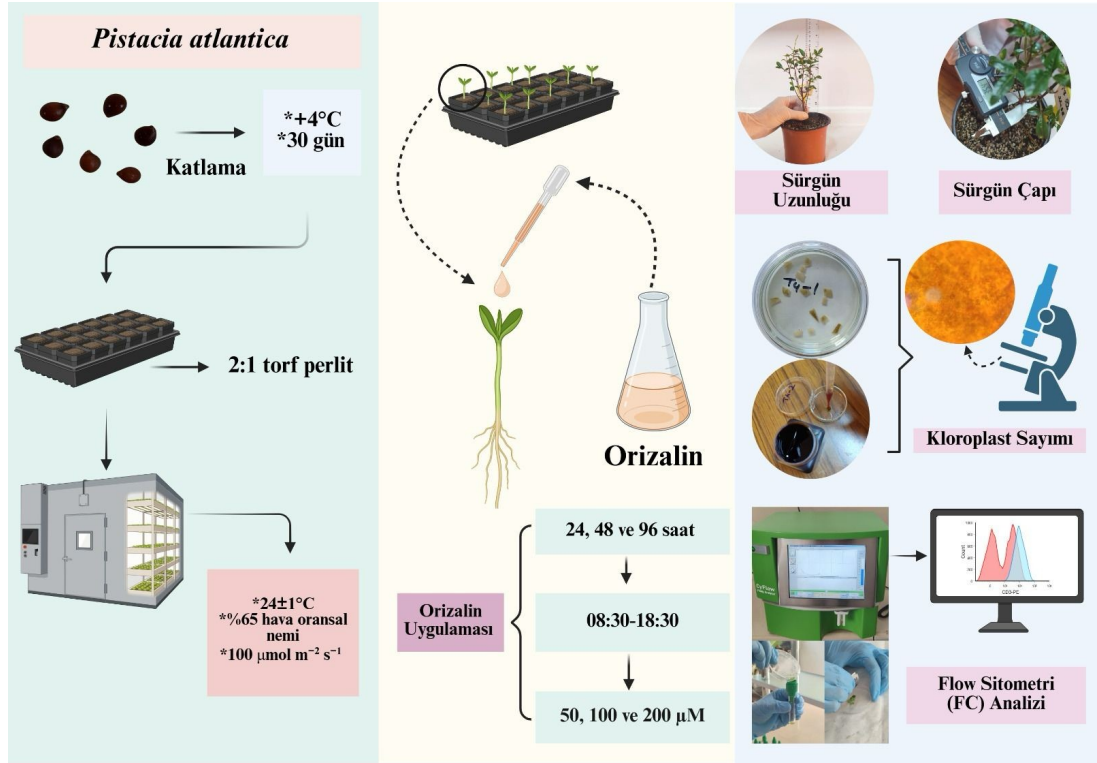
**Şekil 3.29.** Büyüme ucunun kotiledon yaprakları arasında görüldüğü dönemde orizalin uygulamalarının yapılması

Dikimi yapılan tüm Atlantik sakızı bitkiciklerinin gelişmelerini iyi sürdürebilmeleri için rutin bakımları yapılmıştır. Deneme planı Çizelge 3.1’de verilmiştir. Hayatta kalan bitkilerde; birim alandaki stoma yoğunluğu (adet  $\text{mm}^{-2}$ ) (Kara vd., 2018a), stoma boyutları ( $\mu\text{m}$ ) (Kara vd., 2018b) ve stoma bekçi hücrelerindeki kloroplast sayıları (adet  $\text{stoma}^{-1}$ ) (Kara ve Yazar, 2021) gibi stoma özelliklerine ilişkin ölçüm ve sayımlar gerçekleştirilmiştir. Ayrıca sürgün uzunluğu (Kara vd., 2018b), sürgün çapı (Sabır ve Kara, 2011; Kara vd., 2018b) ile FC analizleri (Yazar, 2018) yapılmıştır. Elde edilen tüm bu veriler doğrultusunda, orizalin uygulamasının Atlantik sakızı anacında kromozom katlanması üzerine etkileri değerlendirilmiştir.

**Çizelge 3.1.** Atlantik sakızı anaçlarına farklı orizalin konsantrasyonları uygulama grupları

Uygulamalar
T0: Kontrol
T1: 50 $\mu\text{M}$ 24 saat
T2: 50 $\mu\text{M}$ 48 saat
T3: 50 $\mu\text{M}$ 96 saat
T4: 100 $\mu\text{M}$ 24 saat

T5: 100 $\mu\text{M}$ 48 saat
T6: 100 $\mu\text{M}$ 96 saat
T7: 200 $\mu\text{M}$ 24 saat
T8: 200 $\mu\text{M}$ 48 saat
T9: 200 $\mu\text{M}$ 96 saat



Şekil 3.29. Deneysel tasarımın şematik gösterimi

### 3.4. Ploidi Seviyesinin Belirlenmesi

#### 3.4.1. Sürgün ucu canlılık oranı (%)

Orizalin uygulanan bitkilerde sürgün ucu canlılığı, canlı kalan sürgün ucu sayısının uygulamaya tabi tutulan tüm bitkilerdeki toplam sürgün ucu sayısına oranlanmasıyla belirlenmiştir (Kara vd., 2018b).

#### 3.4.2. Sürgün uzunluğu (cm)

Orizalin uygulanan bitkilerde sürgün uzunluğu, vejetasyon dönemi sonunda uygulama noktasından itibaren cetvel kullanılarak 'cm' cinsinden ölçülerek tespit edilmiştir (Kara vd., 2018b).



**Şekil 3.29.** Kotiledon aşamasında orizalin uygulaması yapılmış bitkilerde sürgün uzunluğunun ölçülmesi

### 3.4.3. Sürgün çapı (mm)

Orizalin uygulanan bitkilerde, vejetasyon dönemi sonunda sürgün çapı dijital kumpas yardımıyla sürgün üzerindeki üçüncü ve dördüncü boğum arasından milimetre (mm) cinsinden ölçülerek belirlenmiştir (Sabır ve Kara, 2011; Kara vd., 2018b).



**Şekil 3.29.** Sürgün çapı ölçümü

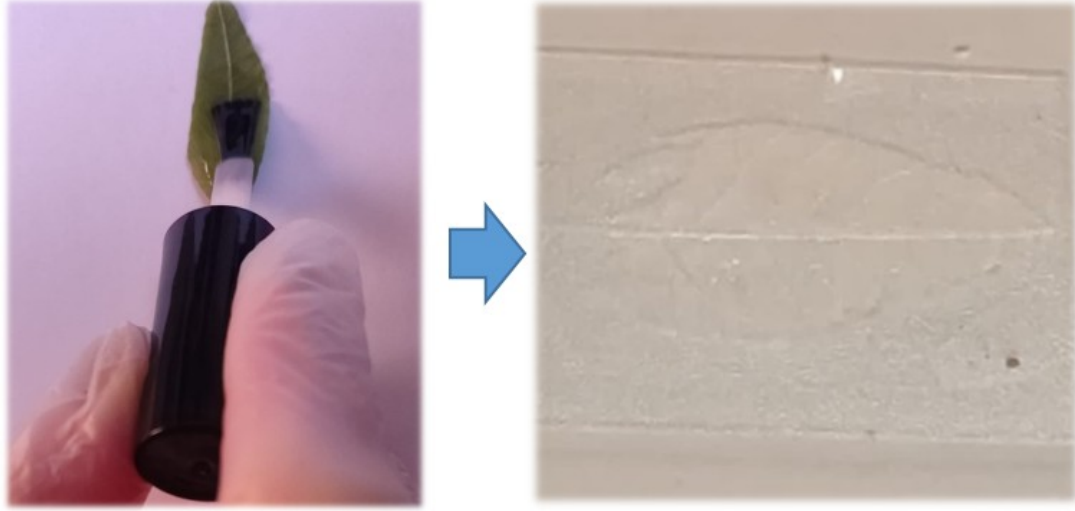
#### **3.4.4. Stoma yoğunluğu (adet $\text{mm}^{-2}$ ) ve stoma boyutları ( $\mu\text{m}$ )**

Bitkilerde uç kısmından itibaren 4–6. yaprakların alt yüzeyine, üç farklı noktadan şeffaf oje uygulanarak yaprak epidermisine ait izler elde edilmiştir. Alt epidermis sıyrılıp lam üzerine aktarılmış; stoma genişliği ve uzunluğu ölçümleri  $\times 40$  büyütmeli objektif ve  $\times 10$  büyütmeli oküler mikrometre kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Moghbel vd., 2015). Ayrıca, işlem kolaylığı ve uygulanabilirliği nedeniyle, kloroplast sayımında da tercih edilen bir diğer yöntem temel alınarak Yuan vd. (2009) doğrultusunda stoma sayımları yapılmıştır.

Kromozom katlanmasını ortaya koyan morfolojik ve anatomik değerlendirmeler her ne kadar kolay uygulanan yöntemler olsa da, çoğu zaman yanlış yorumlara yol açabilmektedir. Bu amaçla en sık başvurulan özellikler stomayla ilişkili özelliklerdir. Stoma boyutlarının ölçümü hem basit bir işlem olması hem de özel ve maliyetli ekipman gerektirmemesi nedeniyle avantaj sağlar. Bunun yanında, stoma yoğunluğu ile stoma bekçi hücresi başına düşen kloroplast sayısı da poliploid bitkilerde değişiklik gösterebilen diğer önemli parametrelerdir (Dhooghe vd., 2011).

Poliploidleri belirlemek için öncelikle morfolojik özellikler kullanılabilse de, bu değerlendirmelerin mutlaka kesin yöntemlerle doğrulanması gerekir. Çünkü morfolojik olarak poliploid olduğu düşünülen bazı bitkiler aslında miksoploid olabilir (Dhooghe vd., 2011). Bu nedenle stoma ölçümleri ve gözlemleri, flow sitometri (FC) analizleri ve kromozom sayımlarına geçilmeden önce ön

değerlendirme niteliğinde kullanılmıştır.



Şekil 3.29. Denemede kullanılan bitkilerin stoma özelliklerinin tespiti

### 3.4.5. Kloroplast sayımı (adet stoma<sup>-1</sup>)

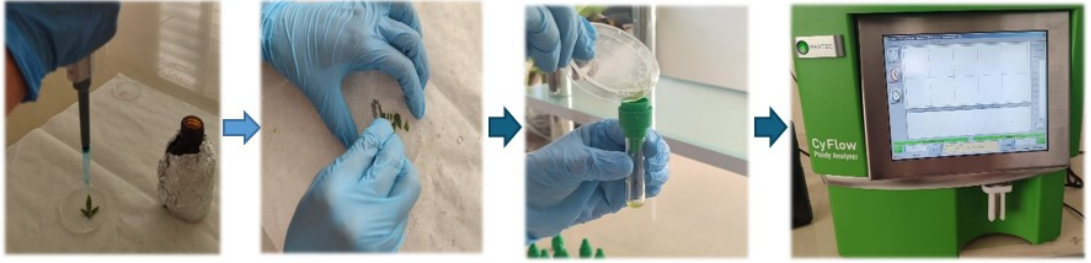
Orizalin uygulanmış Atlantik sakızı anaçlarında kloroplast sayımları gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, uçtan 4–6. yapraklardan alınan yaprak kesitlerinde stoma bekçi hücrelerindeki kloroplast sayıları tespit edilmiştir. Öncelikle taze yapraklar Carnoy solüsyonunda (3 kısım etil alkol: 1 kısım glasiyal asetik asit) renk açma işlemine tabi tutulmuş, ardından çözüldüden çıkarılan yaprak kesitleri 2–5 dakika steril suda bekletilmiş ve son olarak %1'lik I-KI solüsyonunda 30 saniye süreyle boyanmıştır. Kloroplast sayıları,  $\times 400$  büyütme mikroskop kullanılarak belirlenmiştir (Yuan vd., 2009). Elde edilen kloroplast sayımları, flow sitometri (FC) analizleri için ön veri olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 3.29. Denemede kullanılan bitkilerin kloroplast özelliklerinin tespiti

### 3.4.6. Flow sitometri (FC) analizi

Orizalin uygulanan bitkilerden, flow sitometri (FC) analizi için 3–4 haftalık taze yaprak örnekleri alınmıştır. Her yapraktan 0,5 cm<sup>2</sup> büyüklüğünde kesitler hazırlanarak petri kabına yerleştirilmiş ve 500 µL Partec-Nuclei Extraction Buffer (izolasyon tamponu) eklenmiştir. Yaprak dokusu, hücre çekirdeklerinin serbest kalması ve çekirdek zarı üzerinde açıklıklar oluşana kadar jilette küçük parçalara ayrılmıştır. İşlem sırasında izolasyon tamponu eklenmeye devam edilmiş ve parçalanmış örnekler 10–15 saniye çalkalandıktan sonra PartecCellTrics 30 µm green filtre ile süzülerek 3,5 ml kapasiteli Partec-Sample Tubes (55×12 mm) tüplerine aktarılmıştır. Tüplere 1600 µL Partec-DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) boyama solüsyonu eklenmiş ve ışık izolasyonu sağlanmış ortamda 5 dakika bekletilmiştir. Hazırlanan örnekler FC cihazında analiz edilmiştir (Yazar, 2018).



**Şekil 3.30.** Flow sitometri analizi için örneklerin hazırlama aşamaları (Orijinal)

### 3.4.7. İstatistiksel analiz

Atlantik sakızı anacına orizalin uygulamaları sonucunda elde edilen veriler JMP Pro 13 istatistik programında varyans analizi tekniği uygulanarak istatistiksel olarak analiz edilmiştir. Ortalama değerlerin istatistiksel farkı TUKEY ( $p < 0.05$ ) testi kullanılarak tespit edilmiştir (Gomez ve Gomez, 1984).

#### 4. BULGULAR

Bu çalışma anaç ıslahında kimyasal mutajen ile ploidi teşvikini belirlemek amacıyla gerçekleştirilmiştir. Çalışmada farklı süreler (24, 48 ve 96 sa) ile birlikte 50, 100 ve 200  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarında orizalin uygulanarak, orizalinin ploidi teşviki üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Toplamda 10 farklı uygulama grubunun oluşturulduğu çalışmada, orizalinin farklı dozları kullanılarak ploidi belirleme yöntemleri ile analizler yapılmıştır.

##### 4.1. Sürgün ucu canlılık oranı (%)

Atlantik sakızı tohumlarına yapılan orizalin uygulamalarının sürgün ucu canlılık oranına etkileri önemlidir (Çizelge 4.1).

Atlantik sakızı anacı tohumlarından elde edilen bitkilere kotiledon yapraklarının oluştuğu dönemde orizalin uygulamaları sonucunda elde edilen sürgün ucu canlılık oranları kontrol, 50  $\mu\text{M}$  24 saat, 50  $\mu\text{M}$  48 saat ve 50  $\mu\text{M}$  96 saat, 100  $\mu\text{M}$  24saat, 100  $\mu\text{M}$  48 saat, 100  $\mu\text{M}$  96 saat, 200  $\mu\text{M}$  24 saat, 200  $\mu\text{M}$  48 saat ve 200  $\mu\text{M}$  96 saat uygulamaları için sırasıyla %94,33 $\pm$ 4,04 - %66,66 $\pm$ 0,00 - %66,66 $\pm$ 0,00 - %66,66 $\pm$ 0,00 - %51,67 $\pm$ 5,77 - %25,00 $\pm$ 5,00 - %25,00 $\pm$ 5,00 - %25,00 $\pm$ 5,00 - %25,00 $\pm$ 5,00 ve %25,00 $\pm$ 5,00 olarak tespit edilmiştir. Yapılan uygulamalar sonucunda, sürgün ucu canlılık oranı en yüksek kontrol grubunda gözlemlenirken, en düşük oran 200  $\mu\text{M}$  orizalin ile 96 saat uygulanan grupta kaydedilmiştir.

##### 4.2. Sürgün uzunluğu (cm)

Orizalin uygulamalarının sürgün uzunluğu üzerindeki etkileri, sürgün gelişiminin durduğu dönemde sürgün boylarının ölçülmesiyle belirlenmiştir. Elde edilen sürgün uzunluğu verileri incelendiğinde istatistiksel açıdan anlamlı olduğu görülmüştür ( $p < 0.05$ ) (Çizelge 4.1). Atlantik sakızı anaçlarına farklı sürelerle orizalin uygulamaları sürgün uzunluğunu değişen oranlarda etkilemiştir. Kontroldeki sürgün uzunluğu 20,67 cm olarak belirlenirken 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  ve 200  $\mu\text{M}$  orizalin dozlarının 24, 48 ve 96 saat sürelerle sürgün ucuna uygulanmaları sonucunda sürgün gelişiminin yavaşladığı gözlemlenmiştir. 50  $\mu\text{M}$  24 saat, 50  $\mu\text{M}$  48 saat, 50  $\mu\text{M}$  96 saat, 100  $\mu\text{M}$  24saat, 100  $\mu\text{M}$  48 saat, 100  $\mu\text{M}$  96 saat, 200  $\mu\text{M}$  24 saat, 200  $\mu\text{M}$  48 saat ve 200  $\mu\text{M}$  96 saat uygulamalarında sürgün boyları sırasıyla 11,57 – 11,00 – 12,40 – 8,25 – 7,25 – 8,25 – 5,17 – 4,40 – 6,57 cm'dir.

##### 4.3. Sürgün çapı (mm)

Orizalin uygulamalarının sürgün çapı üzerindeki etkileri, vejetasyon dönemi sonunda gelişen sürgünlerin üçüncü ve dördüncü boğumları arasındaki çap ölçümleri ile değerlendirilmiştir. Elde edilen sürgün çapı değerleri istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p<0.05$ ) (Çizelge 4.1). Atlantik sakızı anaçlarında sürgün çapının orizalin uygulamalarından etkilendiği görülmüştür. Sürgün çapı değerleri artan orizalin dozları ile birlikte doğrusal olarak azalma göstermiştir. Kontrol grubunda sürgün çapı 3,03 mm olarak belirlenirken, en düşük değerler 50  $\mu\text{M}$  ve 100  $\mu\text{M}$  orizalin uygulamalarının 48 saatlik sürelerinde (her iki durumda da 0,88 mm) kaydedilmiştir.

**Çizelge 4.1.** Orizalin uygulamalarının sürme oranı, sürgün ucu canlılığı ve vejetatif gelişim üzerine etkileri

Uygulamalar	Sürme oranı (%)	Sürgün ucu canlılık oranı (%)	Sürgün uzunluğu (cm)	Sürgün çapı (mm)
T0: Kontrol	80,00±8,66a	94,33±4,04a	20,67±1,53a	3,03±1,50a
T1: 50 $\mu\text{M}$ 24 saat	80,00±8,66a	66,66±0,00b	11,57±0,51b	2,91±0,67ab
T2: 50 $\mu\text{M}$ 48 saat	80,00±8,66a	66,66±0,00b	11,00±1,00b	0,88±0,20c
T3: 50 $\mu\text{M}$ 96 saat	78,33±5,77a	66,66±0,00b	12,40±0,40b	1,61±0,47abc
T4: 100 $\mu\text{M}$ 24 saat	72,22±4,82a	51,67±5,77c	8,25±0,25c	0,98±0,03c
T5: 100 $\mu\text{M}$ 48 saat	80,00±8,66a	25,00±5,00d	7,25±0,25cd	0,88±0,08c
T6: 100 $\mu\text{M}$ 96 saat	77,78±4,81a	25,00±5,00d	8,25±0,25c	0,98±0,03c
T7: 200 $\mu\text{M}$ 24 saat	72,22±4,82a	25,00±5,00d	5,17±0,76de	1,31±0,06bc
T8: 200 $\mu\text{M}$ 48 saat	75,00±0,00a	25,00±5,00d	4,40±0,79e	1,16±0,23c
T9: 200 $\mu\text{M}$ 96 saat	75,00±0,00a	25,00±5,00d	6,57±0,12cde	1,02±0,18c

#### 4.4. Stoma Uzunluğu ( $\mu\text{m}$ ), Genişliği ( $\mu\text{m}$ ) ve Yoğunluğu (adet $\text{mm}^{-2}$ ) Ölçümleri

Orizalin uygulamaları sonucunda Atlantik sakızı anacı tohumlarının stoma uzunluğu ( $\mu\text{m}$ ) değerlerine etkileri önemlidir (Çizelge 4.2). Atlantik sakızı anacı tohumlarından elde edilen bitkilere kotiledon yaprakları arasındaki sürgün uçlarına yapılan orizalin uygulamalarının stoma uzunluğuna etkisi kontrol, 50  $\mu\text{M}$  24 saat, 50  $\mu\text{M}$  48 saat, 50  $\mu\text{M}$  96 saat, 100  $\mu\text{M}$  24saat, 100  $\mu\text{M}$  48 saat, 100  $\mu\text{M}$  96 saat, 200  $\mu\text{M}$  24 saat, 200  $\mu\text{M}$  48 saat ve 200  $\mu\text{M}$  96 saat için sırasıyla 14,81 $\pm$ 0,67  $\mu\text{m}$  - 14,59 $\pm$ 0,44  $\mu\text{m}$  - 13,36 $\pm$ 1,13  $\mu\text{m}$  - 13,57 $\pm$ 0,55  $\mu\text{m}$  - 13,45 $\pm$ 1,24  $\mu\text{m}$  - 11,81 $\pm$ 0,17  $\mu\text{m}$  - 13,45 $\pm$ 1,24  $\mu\text{m}$  - 15,89 $\pm$ 0,53  $\mu\text{m}$  - 14,38 $\pm$ 0,44  $\mu\text{m}$  ve 14,77 $\pm$ 0,67  $\mu\text{m}$  olarak tespit edilmiştir. Atlantik sakızı anacında en uzun stomalar 200  $\mu\text{M}$  24 saat uygulamasında belirlenirken en düşük stoma uzunluğu 100  $\mu\text{M}$  48 saat uygulamasında kayıt altına alınmıştır.

Atlantik sakızı anacı tohumlarına orizalin uygulamaları sonucunda elde edilen stoma genişliği verileri önemli bulunmuştur (Çizelge 4.2). Atlantik sakızı anacı tohumları çimlendikten sonra kotiledon yaprakların olduğu dönemdeki bitkilere orizalin uygulamaları sonucunda elde edilen stoma genişliği verileri kontrol, 50  $\mu\text{M}$  24 saat, 50  $\mu\text{M}$  48 saat, 50  $\mu\text{M}$  96 saat, 100  $\mu\text{M}$  24saat, 100  $\mu\text{M}$  48 saat, 100  $\mu\text{M}$  96 saat, 200  $\mu\text{M}$  24 saat, 200  $\mu\text{M}$  48 saat ve 200  $\mu\text{M}$  96 saat için sırasıyla 6,84 $\pm$ 0,75  $\mu\text{m}$  - 8,52 $\pm$ 0,83  $\mu\text{m}$  - 7,17 $\pm$ 1,13  $\mu\text{m}$  - 6,53 $\pm$ 0,46  $\mu\text{m}$  - 8,32 $\pm$ 2,13  $\mu\text{m}$  - 8,73 $\pm$ 1,69  $\mu\text{m}$  - 6,94 $\pm$ 0,70  $\mu\text{m}$  - 7,31 $\pm$ 1,37  $\mu\text{m}$  - 8,41 $\pm$ 1,02  $\mu\text{m}$  ve 7,93 $\pm$ 0,54  $\mu\text{m}$ 'dir. Yapılan orizalin uygulamalarının stoma genişliğine etkileri incelendiğinde en geniş stomalar 100  $\mu\text{M}$  48 saat uygulamasında belirlenirken en düşük stomalar ise kontrol ve 50  $\mu\text{M}$  96 saat grubunda kaydedilmiştir.

Atlantik sakızı anacı tohumlarına farklı doz ve sürelerde orizalin uygulanması sonucunda elde edilen stoma sayısı verileri önemli bulunmuştur (Çizelge 4.2). Atlantik sakızı anacı tohumlarından elde edilen bitkilere yapılan orizalin uygulamaları sonucunda kontrol, 50  $\mu\text{M}$  24 saat, 50  $\mu\text{M}$  48 saat, 50  $\mu\text{M}$  96 saat, 100  $\mu\text{M}$  24saat, 100  $\mu\text{M}$  48 saat, 100  $\mu\text{M}$  96 saat, 200  $\mu\text{M}$  24 saat, 200  $\mu\text{M}$  48 saat ve 200  $\mu\text{M}$  96 saat uygulamalarının stoma yoğunlukları (adet  $\text{mm}^{-2}$ ) sırasıyla 309,10 $\pm$ 71,00 - 214,30 $\pm$ 23,80 - 205,60 $\pm$ 13,13 - 142,87 $\pm$ 47,65 190,50 $\pm$ 0,00 - 190,50 $\pm$ 0,00 - 190,50 $\pm$ 0,00 - 198,45 $\pm$ 27,50 - 254,00 $\pm$ 13,73 ve 190,50 $\pm$ 0,00 adettir. Yapılan uygulamalar sonucunda, en yüksek stoma yoğunluğu kontrol grubunda gözlemlenirken, en düşük yoğunluk 50  $\mu\text{M}$  orizalin ile 96 saat uygulanan grupta kaydedilmiştir.

**Çizelge 4.1.** Orizalin uygulamalarının stoma sayısı, stoma boyutları ve stoma yoğunluğu üzerine etkileri

Uygulamalar	Stoma sayısı (adet)	Stoma eni ( $\mu\text{M}$ )	Stoma boyu ( $\mu\text{M}$ )	Stoma yoğunluğu
T0: Kontrol	31,17 $\pm$ 2,02a	6,84 $\pm$ 0,75a	14,81 $\pm$ 0,67ab	309,10 $\pm$ 71,00a
T1: 50 $\mu\text{M}$ 24 saat	30,83 $\pm$ 1,61a	8,52 $\pm$ 0,83a	14,59 $\pm$ 0,44ab	214,30 $\pm$ 23,80bc
T2: 50 $\mu\text{M}$ 48 saat	24,50 $\pm$ 1,32b	7,17 $\pm$ 1,13a	13,36 $\pm$ 1,13bc	205,60 $\pm$ 13,13bc
T3: 50 $\mu\text{M}$ 96 saat	12,50 $\pm$ 0,50d	6,53 $\pm$ 0,46a	13,57 $\pm$ 0,55ab	142,87 $\pm$ 47,65c
T4: 100 $\mu\text{M}$ 24 saat	21,83 $\pm$ 1,76bc	8,32 $\pm$ 2,13a	13,45 $\pm$ 1,24bc	190,50 $\pm$ 0,00bc
T5: 100 $\mu\text{M}$ 48 saat	21,00 $\pm$ 1,00c	8,73 $\pm$ 1,69a	11,81 $\pm$ 0,17c	190,50 $\pm$ 0,00bc
T6: 100 $\mu\text{M}$ 96 saat	21,83 $\pm$ 1,76bc	6,94 $\pm$ 0,70a	13,45 $\pm$ 1,24bc	190,50 $\pm$ 0,00bc
T7: 200 $\mu\text{M}$ 24 saat	30,11 $\pm$ 2,41a	7,31 $\pm$ 1,37a	15,89 $\pm$ 0,53a	198,45 $\pm$ 27,50bc
T8: 200 $\mu\text{M}$ 48 saat	31,00 $\pm$ 0,66a	8,41 $\pm$ 1,02a	14,38 $\pm$ 0,44ab	254,00 $\pm$ 13,73ab
T9: 200 $\mu\text{M}$ 96 saat	29,40 $\pm$ 0,72a	7,93 $\pm$ 0,54a	14,77 $\pm$ 0,67ab	190,50 $\pm$ 0,00bc

#### 4.5. Kloroplast Sayısı (adet stoma<sup>-1</sup>)

Her yaprak kesitinde rastgele seçilen 30 stomada kloroplast sayımı yapılmıştır. Atlantik sakızı anaçlarına yapılan orizalin uygulamalarının kloroplast sayıları üzerine etkileri önemli bulunmuştur (Çizelge 4.3). Atlantik sakızı anacına ait tohumların çimlenmesinin ardından, kotiledon yaprakları arasındaki büyüme bölgesine uygulanan orizalinin, kloroplast sayıları üzerindeki etkileri incelendiğinde kontrolde 16,67 $\pm$ 1,15 adet olarak belirlenirken, en yüksek kloroplast sayıları 100  $\mu\text{M}$  96 saat ve 200  $\mu\text{M}$  24 saat uygulamalarında 21,33 $\pm$ 1,53 adet olarak bulunmuştur.

**Çizelge 4.1.** Orizalin uygulamalarının stoma bekçi hücrelerindeki kloroplast üzerine etkileri

Uygulamalar	İncelenen Stoma sayısı (adet)	Kloroplast sayısı aralığı	Ortalama kloroplast sayısı
T0: Kontrol	30	16-18	16,67±1,15c
T1: 50 µM 24 saat	30	16-19	17,33±1,53bc
T2: 50 µM 48 saat	30	16-19	17,33±1,53bc
T3: 50 µM 96 saat	30	18-20	18,67±1,15abc
T4: 100 µM 24 saat	30	20-23	20,33±0,58ab
T5: 100 µM 48 saat	30	20-23	20,33±0,58ab
T6: 100 µM 96 saat	30	20-23	21,33±1,53a
T7: 200 µM 24 saat	30	20-23	21,33±1,53a
T8: 200 µM 48 saat	30	17-21	18,33±1,53abc
T9: 200 µM 96 saat	30	18-20	19,33±1,15abc

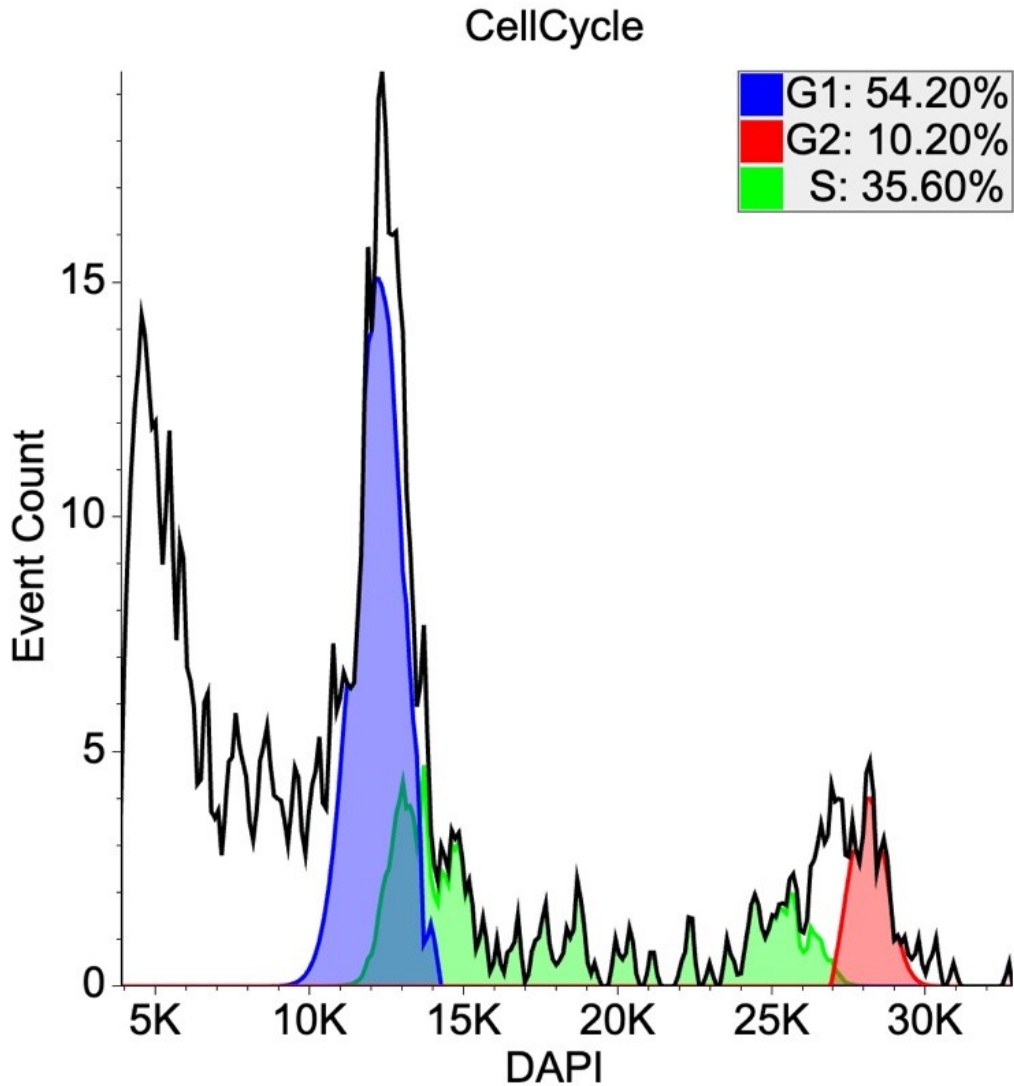
#### 4.6. Flow Sitometri (FC) Analizi

Flow sitometri (FC), bitkilerde ploidi düzeyinin belirlenmesi ve poliploidi indüksiyonunun doğrulanmasında yaygın olarak kullanılan, hızlı, güvenilir ve pratik bir yöntemdir. Bu teknik, kısa süre içerisinde çok sayıda örneğin değerlendirilmesine olanak sağlaması nedeniyle önemli avantajlar sunmaktadır (Roy vd., 2001). Ayrıca FC, uyarılan poliploidizasyonun başarı oranını belirlemede en etkin yaklaşımlardan biri olarak kabul edilmektedir (Dhooghe vd., 2011).

FC analizinde ploidi düzeyi, DNA içeriğinin mutlak ya da nisbi miktarı ile kromozom sayısı arasındaki ilişkiye dayanılarak yorumlanmaktadır. DNA miktarındaki artışın kromozom sayısındaki yükselişi yansıttığı varsayımıyla, ploidi seviyesi bilinen bir referans örneğin DNA içeriği, ploidi düzeyi bilinmeyen diğer örneklerin karşılaştırılmasında standart olarak kullanılabilir (Dolezel vd.,

2007). Yaptığımız kloroplast sayımları sonucunda bazı uygulamalarda poliploidiye işaret eden bulgular elde edilmiş olup, bu örneklerin ploidi durumunu değerlendirmek amacıyla flow sitometri analizi yapılmıştır. FC analizi sonucunda bir adet miksploid bitki tespit edilmiştir. Elde edilen miksploid Atlantik sakızı bitkisinin, 200  $\mu$ M dozunda 96 saat süreyle uygulama yapılan bitkiye ait olduğu FC analizi ile doğrulanmıştır (Şekil 4.1).

Flow sitometri histogramlarında G1 fazına ait ana pik ile birlikte DNA içerik dağılımının homojen olmadığı, özellikle S ve G2/M fazlarına doğru genişleyen sinyal dağılımı gözlenmiş olup, bu durum örnekte farklı nükleer DNA içeriklerine sahip hücre popülasyonlarının bulunabileceğine işaret etmektedir.



**Şekil 4.14.** T9 (200  $\mu$ M 96 saat) uygulamasına ait FC sonucu

## 5. TARTIŞMA

### 5.1. Sürgün ucu canlılık oranı (%)

Atlantik sakızı anacı çimlenmiş tohumlarına orizalin uygulamaları sürgün ucu canlılık oranlarını tüm uygulamalarda azaltmıştır. Gözlenen bu azalma, özellikle meristematik dokunun antimitotik ajanlara karşı duyarlılığını ortaya koymuştur. Atlantik sakızı anacı bitkilerine yapılan orizalin uygulamaları sonucunda en düşük sürgün ucu canlılık oranı T5, T6, T7, T8 ve T9 uygulamalarında tespit edilmiştir. Bu durum, orizalinin yüksek konsantrasyon ve uzun maruz kalma süresiyle birlikte toksik etkisinin arttığını göstermektedir. Antimitotik ajanların özellikle yüksek dozlarda uygulanması, çoğunlukla bitkilerin sürgün ucu canlılığını önemli ölçüde azaltmaktadır (Zakizadeh vd., 2020). Daha önce yapılan çalışmalarda da orizalin (Xie vd., 2015) uygulamalarının sürgün ucu canlılık oranını azalttığı bildirilmiştir. Literatürde, orizalinin yüksek dozlarda ve uzun süreli uygulamalarda bitkiler üzerinde belirgin toksik etkilere yol açtığı çeşitli araştırmacılar tarafından ortaya konmuştur (Dunn ve Lindstrom, 2007; Dhooghe vd., 2009). Genel olarak, daha düşük dozların ve kısa süreli uygulamaların bitkilerin hayatta kalma oranlarını artırdığı, ancak bu koşulların tetraploit bitki elde edilme olasılığını azalttığı belirtilmiştir (Chakraborti vd., 1998; Väinölä, 2000; Zhang vd., 2008).

Poliploidi çalışmalarında kullanılan mutajenlerin, sürgün ucu canlılık oranında azalmaya neden olduğu bilinmektedir. Ancak uygulamanın poliploidi indüksiyonunu başarıyla tetiklediği durumlarda, sürgün ucu canlılığındaki bu düşüşün —bitkide tamamen ölüm oluşturmadığı sürece— önemli bir dezavantaj olarak değerlendirilmediği belirtilmiştir (Väinölä, 2000).

Çalışmamızda, farklı orizalin dozlarının sürgün ucu canlılık oranlarını azalttığı görülmüştür. Bu durum, literatürde bildirilen önceki çalışmalarla benzerlik göstermektedir.

### 5.2. Sürgün uzunluğu (cm)

Sürgün uzunluğu, orizalin uygulamalarına bağlı olarak çeşitli düzeylerde etkilenmiştir. Literatürde de tetraploid bireylerin diploid formlara kıyasla daha kısa boğum arası mesafeye sahip olduğu ve bunun sonucunda toplam sürgün boyunun da azaldığı belirtilmektedir (Motosugi vd., 2002a). Çalışmamızdan elde edilen veriler de bu literatür bilgilerini destekler niteliktedir.

Sürgün uzunluğunun orizalin uygulamalarından etkilenme düzeyine bağlı

olarak azaldığı görülmüştür. Kotiledon aşamasında uygulanan farklı orizalin dozlarından alınan dağerler karşılaştırıldığında, 200 µM konsatrasyonlarında orizalin uygulamalarında elde edilen sürgün uzunluğu ölçümleri, diğere uygulamalara kıyasla sürgün büyümesini önemli ölçüde azalttığını göstermektedir.

### 5.3. Sürgün çapı (mm)

Ploidi seviyesinin artışı, bitkilerde gövde ve sürgün çapı ile yaprak ağırlığı gibi morfolojik özellikler üzerinde, tür ve çeşitlerin genetik yapısına bağılı olarak değışen etkiler gösterebilmektedir (Głowacka vd., 2010; Qiao vd., 2017).

Motosugi vd. (2007), tetraploid asma anaçlarının sürgünlerinin diploid bireylere kıyasla daha zayıf bir vejetatif gelişim sergilediğini, buna karşın, yaprak ve gövde kalınlığında artış gözlendiğini rapor etmiştir. Ayrıca tetraploid anaçlar üzerine aşılama 'Kyoho' çeşidinde, köklendirme ve şaşırtma aşamalarında sürgün ve boğum aralarının, diploid anaçlara uygulanan aşılamalara göre daha kısa olduğıu saptanmıştır. Bizim çalışmamızdan elde edilen sonuçların da, literatürde daha önce bildirilen verilerle örtüştüğü belirlenmiştir. Atlantik sakızı anacına kotiledon aşamasında yapılan orizalin uygulamaları verilerinde orizalin dozlarındaki artışa bağılı olarak sürgün çapı değıerlerinde azalmalar olduğıu tespit edilmiştir (Çizelge 4.1). Vejetasyon sonunda tüm uygulamalarda kontrole göre en düşük sürgün çapı değıerleri T2 ve T5 uygulamalarında kaydedilmiştir. Atlantik sakızı anaçlarında sürgün çapı orizalin uygulamalarından etkilenmiş ve azalış göstermiştir (Çizelge 4.1).

### 5.4. Stoma gözlemleri

Atlantik sakızı anaçlarına yapılan tüm uygulamalar kontrole göre stoma sayısında azalmaya neden olmuştur. Stoma boyutlarında ise bazı uygulamalarda farklı olmakla birlikte genel olarak artışa neden olmuştur. Anaçlara yapılan orizalin uygulamalarında en düşük stoma yoğunluğu T3 (50 µM 96 saat) uygulamasında belirlenirken en yüksek stoma uzunluğu T7 (200 µM 24 saat) uygulamasında tespit edilmiştir. Stoma genişliği verileri de stoma uzunluğu verileri ile benzerlik göstermiş ve en geniş stomalar T5 (100 µM 48 saat) uygulamasında belirlenmiştir (Çizelge 4.2).

Poliploidilerin belirlenmesinde stoma boyutlarının kullanımı, dolaylı fakat yaygın bir yöntem olarak kabul edilmektedir (Moghbel vd., 2015). Stoma karakterleri genellikle poliploidlerin hızlı ve erken tanımlanması amacıyla tercih edilmektedir (Cohen ve Yao, 1996; Gu vd., 2005; Tang vd., 2010). Bu yöntemin

uygulanması basit olup, pahalı ekipman gerektirmemesi de önemli bir avantajdır. Xie vd. (2015), ploidi düzeyinin saptanmasında stoma boyutları ve kloroplast sayımının en ekonomik ve etkili yaklaşımlar arasında yer aldığını belirtirken, Huy vd. (2019) ise daha kesin sonuçlar için bu yöntemin modern tekniklerle birlikte kullanılmasının gerektiğini vurgulamıştır. Çalışmamızda stoma ve kloroplast analizleri ile birlikte FC analizi yapılarak bitkilerin ploidi düzeyi tespit edilmiştir. Bae vd. (2020) orizalin uygulamaları ile stoma yoğunluğunun azaldığını tespit etmiştir. Çalışmamızda mutajen uygulamalarının stoma sayısını azalttığı, bu sonuçların da literatürle benzerlik gösterdiği belirlenmiştir.

Omezzine vd. (2012), yaptıkları çalışmada miksploit bitkilerde stoma uzunluğunun diploit bitkilere kıyasla belirgin biçimde arttığını rapor etmiştir. Benzer şekilde, Zeng vd. (2019) da orizalin uygulamasıyla elde edilen poliploit bitkilerin, orijinallerine göre stoma boyutlarında kayda değer bir artış gösterdiğini belirtmiştir. Cimen (2020), diploit, miksploit ve tetraploit bitkiler arasında stoma genişliği bakımından belirgin farklılıklar bulunduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca, daha önceki araştırmalarda orizalin uygulamalarının stoma genişliğini artırdığı da bildirilmiştir (Pliankong vd., 2017; Bae vd., 2020).

Kosonoy-González vd. (2019), tetraploit bitkilerde öne çıkan agronomik özelliklerden birinin stoma boyutundaki değişim olduğunu belirtmiştir. Genel olarak poliploit bitkilerde stoma uzunluklarının diploitle kıyasla daha büyük, buna karşılık birim alandaki stoma yoğunluğunun daha düşük olduğu bildirilmektedir (Yang vd., 2006; Lu vd., 2014; Kara vd., 2018c; Bae vd., 2020). Bu farklılığın, poliploit bireylerde hücre boyutunun artmasından (Marinho vd., 2014) ve/veya yaprak mezofil boşluklarının azalmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (Lundgren vd., 2019). Bizim çalışmamızda da bitkilerimizin stoma özellikleri önceki çalışmalarla benzerlik göstermektedir.

### 5.5. Kloroplast sayısı (adet stoma<sup>-1</sup>)

Yaptığımız uygulamalarda kloroplast sayıları kontrole göre artmış ve en fazla kloroplast sayıları 100 µM 96 saat ve 200 µM 24 saat uygulamalarında tespit edilmiştir.

Bitkilerde ploidi düzeyinin artmasıyla hücre boyutunda meydana gelen büyümeye paralel olarak yaprakların anatomik yapısında da çeşitli değişimler oluşmaktadır (Dwivedi vd., 1986). Bu anatomik farklılıklar, poliploidinin uyarılmasını değerlendirmek ve izlemek amacıyla yaygın biçimde kullanılmaktadır

(Zhang vd., 2010). Bazı çalışmalarda ploidi düzeyinin belirlenmesinde stomanın uzunluğu, genişliği, yüzey alanı ve birim alandaki yoğunluğu gibi özellikler dikkate alınmıştır (Dwivedi vd., 1986; de Carvalho vd., 2005; Yang vd., 2006). Birçok çalışmada stoma bekçi hücresi başına düşen kloroplast sayısının ploidi seviyesinin saptanmasında daha güvenilir bir ölçüt olduğu rapor edilmekle beraber (Compton vd., 1996; Chakraborti vd., 1998; Zhang vd., 2005), diploit ve tetraploit bitkilerde stoma bekçi hücrelerindeki kloroplast sayılarının benzer olduğu da belirlenmiştir (de Carvalho vd., 2005). Bu sonuçlardaki farklılıkların, çalışmalarda kullanılan bitki türlerinin farklı olmasından kaynaklanabileceği ifade edilmektedir (Zhang vd., 2010).

Stoma bekçi hücrelerinde bulunan kloroplast sayısının, ploidi düzeyinin belirlenmesinde etkili bir kriter olduğu bildirilmektedir (Zhang vd., 2005). Tetraploit bitkilerde kloroplast sayısının, diploit bireylere kıyasla yaklaşık iki kat fazla olduğu çeşitli araştırmalarla ortaya konmuştur (Rêgo vd., 2011; Rao vd., 2019). Bunun yanı sıra, stoma bekçi hücrelerindeki kloroplast sayılarının ploidi seviyesiyle ilişkili olduğu belirtilmektedir (Zhang vd., 2010). Sinski vd. (2014) ise stoma bekçi hücrelerindeki kloroplast yoğunluğunun kromozom sayısı ile doğru orantılı olduğunu rapor etmişlerdir. Bizim çalışmamızda uygulamalarımız kloroplast sayılarını arttırmış olup sonuçlarımız önceki çalışmalarla da (Ewald vd., 2009; Rêgo vd., 2011; Rao vd., 2019) benzerlik göstermiştir.

### 5.6. Flow sitometri analizi

FC analizi, bitkilerde ploidi düzeyinin belirlenmesi ve poliploidi indüksiyonunun başarı durumunun doğrulanması için kullanılan hızlı, güvenilir ve pratik bir tekniktir. Bu yöntem, kısa sürede çok sayıda örneğin değerlendirilmesine olanak tanır (Roy vd., 2001). Ayrıca, poliploidizasyonun gerçekleşip gerçekleşmediğini ortaya koymada en sık başvurulan yöntemlerden biri olarak kabul edilmektedir (Dhooghe vd., 2011). Pek çok araştırmacı, poliploidi analizinde kullanılan yöntemler içinde ploidi düzeyindeki değişimleri en hassas ve en kesin şekilde ortaya koyan tekniğin FC analizi olduğunu vurgulamıştır (Dolezel, 1997; Loureiro vd., 2005; Sakhanokho vd., 2009).

FC analizi, biyomedikal alanda hücrel müdahalelerin değerlendirilmesi amacıyla ilk kez Gucker Jr vd. (1947) tarafından geliştirilmiştir. Bitkilerde FC analizinin kullanımına yönelik ilk çalışma ise Heller tarafından 1973 yılında yayımlanan makalede yer almıştır (Heller, 1973). Günümüzde FC analizi, standartlaştırılmış protokolü ve daha düşük maliyetli oluşu sayesinde oldukça yaygın bir şekilde uygulanmakta ve poliploidi araştırmalarında temel bir yöntem olarak

kabul edilmektedir (Eng ve Ho, 2019). FC analizi yapılmadan, bir numunedeki tüm hücre çekirdeklerinde genomun homojen olup olmadığı belirlenmemektedir (Bohanec, 2003; Doležel vd., 2012). Bu nedenle flow sitometri, poliploidizasyon çalışmalarında miksploid bireylerin homojen poliploid bireylerden ayırt edilmesinde sıklıkla tercih edilen bir yöntemdir (Chen vd., 2011; Carmona-Martin vd., 2015; Rameshsing vd., 2015; Tavan vd., 2015; Zhou vd., 2017).

Flow sitometri analizlerinde ploidi düzeyinin belirlenmesi, hücre çekirdeğindeki DNA miktarının ploidi seviyesiyle olan ilişkisine dayanmaktadır. Nükleer DNA içeriğinde meydana gelen artışların kromozom sayısındaki artışları yansıttığı kabul edildiğinde, ploidi düzeyi bilinen bir örneğin DNA içeriği, ploidi durumu bilinmeyen örneklerin DNA ploidi seviyelerinin saptanmasında referans olarak kullanılabilir (Doležel vd., 2007).

Kloroplast sayımları sonucunda tüm uygulamalar değerlendirildiğinde bazı fiderde poliploidiye işaret eden bulgular elde edilmiş olup, bu örneklerin ploidi durumunu doğrulamak amacıyla flow sitometri analizi yapılmıştır. Flow sitometri analizi sonucunda bir adet miksploid Atlantik sakızı (*Pistacia atlantica* Desf.) bitkisi tespit edilmiştir. Miksploid yapının, 200 µM dozunda 96 saat süreyle uygulama yapılan bitkide bulunduğu FC analizi ile doğrulanmıştır (Şekil 4.1).

Çok sayıda araştırmacı, gerçekleştirdikleri FC analizleri ile bitkilerdeki ploidi düzeylerindeki değişimleri belirlemeye çalışmıştır (Yang vd., 2006; Dhooche vd., 2011; Acanda vd., 2013; Acanda vd., 2015). Acanda vd. (2013), 'Mencia' üzüm çeşidinde embriyogenik süspansiyon kültürü yöntemiyle somatik embriyogenez üzerine bir çalışma yürütmüşlerdir. FC yöntemiyle yapılan analizler sonucunda, bitkiye dönüşen somatik embriyoların %5,6'sının tetraploid olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, diploid somatik embriyolardan yetiştirilen bitkilerin çekirdek DNA içeriğinin, arazide yetişen diploid bitkilere göre (%6,7) daha düşük olduğu bildirilmiştir. Araştırmacılar, uygulanan protokolün düşük seviyede somaklonal varyasyona yol açtığını da rapor etmişlerdir.

Noh vd. (2010), otokton İspanyol üzüm (*Vitis vinifera* L.) çeşidinden elde edilen bitkilerin ismine doğruluğunu somatik embriyogenesis yöntemi ile gerçekleştirmiş ve bu amaçla FC ile mikrosatellit analizlerini birlikte kullanmışlardır. Ayrıca, FC analizini 'Campbell Early' (*Vitis labrusca*) üzüm çeşidinin sürgün uçlarından gelişen üç farklı genç bitkinin ploidi düzeyini belirlemek için uygulamışlardır. Araştırma sonucunda, incelenen genç bitkilerin birbirinden farklı

ploidi seviyelerine sahip olduğu ortaya konmuştur.

Bizim alıŐmamızda flow sitometri analizi sonuçları, literatürde bildirilen çalışmalarla uyum göstermektedir. Flow sitometri analizinden elde edilen sonuçlar kloroplast sayımı sonuçlarıyla da paralellik göstermiştir.

## 6. SONUÇLAR

Bu çalışma, *Pistacia atlantica* Desf. tohumlarında orizalinin farklı doz ve uygulama sürelerinin poliploidi teşviki üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla yürütülmüştür. Bu kapsamda, çimlenmiş Atlantik sakızı tohumu anaçlarına kotiledon döneminde 50, 100 ve 200  $\mu\text{M}$  orizalin dozları, 24, 48 ve 96 saat sürelerle uygulanmış; elde edilen bitkilerde morfolojik, anatomik ve sitolojik özellikler incelenmiştir.

Elde edilen sonuçlar, orizalin uygulamalarının anaç gelişimi, stoma özellikleri, kloroplast sayıları ve ploidi düzeyi üzerinde belirgin fizyolojik ve morfolojik etkiler oluşturduğunu göstermiştir.

Orizalin uygulamaları tüm doz ve sürelerde sürgün ucu canlılık oranlarını kontrol grubuna kıyasla düşürmüştür. Canlılık oranlarındaki azalmanın, orizalin dozunun artması ve uygulama süresinin uzamasıyla birlikte daha belirgin hale geldiği belirlenmiştir. En yüksek sürgün ucu canlılık oranı kontrol grubunda tespit edilirken, en düşük canlılık oranı 200  $\mu\text{M}$  96 saat uygulamasında kaydedilmiştir. Bu durum, orizalinin yüksek konsantrasyonlarda ve uzun süreli uygulamalarında antimitotik etkisine bağlı olarak meristematik dokularda toksisite oluşturduğunu ve hücre bölünmesini baskıladığını ortaya koymaktadır.

Sürgün uzunluğu ve sürgün çapı bakımından değerlendirildiğinde, orizalin uygulamalarının anaçların vejetatif gelişimini baskıladığı belirlenmiştir. Kontrol grubuna kıyasla tüm uygulamalarda sürgün boylarının ve çaplarının azaldığı, bu azalmanın özellikle yüksek dozlarda daha belirgin olduğu saptanmıştır. Elde edilen bu sonuçlar, poliploidizasyon çalışmalarında sıklıkla rapor edilen büyüme yavaşlaması ve morfolojik değişimlerle uyum göstermektedir.

Stoma gözlemleri, orizalin uygulamalarının stoma yoğunluğunu azalttığını, buna karşılık stoma uzunluğu ve genişliğinde bazı uygulamalarda artış meydana geldiğini ortaya koymuştur. En düşük stoma yoğunluğu 50  $\mu\text{M}$  96 saat uygulamasında belirlenirken, en uzun stomalar 200  $\mu\text{M}$  24 saat uygulamasında tespit edilmiştir. Bu durum, ploidi artışına bağlı olarak hücre boyutlarının büyümesi ve birim alandaki hücre sayısının azalması ile ilişkilendirilmektedir.

Stoma bekçi hücrelerindeki kloroplast sayıları, kontrol grubuna kıyasla bazı uygulamalarda artış göstermiştir. En yüksek ortalama kloroplast sayıları 100  $\mu\text{M}$  96 saat ve 200  $\mu\text{M}$  24 saat uygulamalarında belirlenmiş olup, bu sonuçlar poliploidiye

işaret eden dolaylı morfolojik göstergeler olarak değerlendirilmiştir.

Kloroplast sayımı ile poliploidiye işaret eden bireylerde gerçekleştirilen flow sitometri analizleri sonucunda, 200  $\mu$ M dozunda 96 saat süreyle uygulama yapılan anaçta bir adet miksoptoid birey tespit edilmiştir. FC analizlerinden elde edilen sonuçlar, kloroplast sayımı verileriyle paralellik göstermiş ve uygulamaların sınırlı düzeyde de olsa kromozom katlanmasını tetikleyebildiğini ortaya koymuştur.

Sonuç olarak *Pistacia atlantica* anaçlarında orizalin uygulamaları ile poliploidi indüksiyonunun mümkün olduğu ancak başarı oranının düşük olduğu, uygulama doz ve sürelerinin anaç canlılığı ile poliploidi oluşumu arasında hassas bir denge gerektirdiği sonucuna varılmıştır. Bu çalışma, *Pistacia* türlerinde poliploidi teşviki çalışmalarına temel veri sağlamak ve gelecekte yürütülecek araştırmalar için önemli bir referans niteliği taşımaktadır.

## 7. ÖNERİLER

Bu çalışma, *Pistacia atlantica* Desf. anaçlarında orizalin kullanılarak poliploidi teşvikinin mümkün olduğunu, ancak uygulama başarısının doz, süre ve bitkinin fizyolojik durumu ile yakından ilişkili olduğunu ortaya koymuştur. Bu nedenle, ileride yapılacak çalışmalarda orizalin uygulama protokollerinin daha ayrıntılı biçimde optimize edilmesi önerilmektedir. Özellikle yüksek doz ve uzun süreli uygulamaların sürgün ucu canlılığını ciddi düzeyde düşürdüğü göz önünde bulundurulduğunda, daha düşük dozların kısa süreli veya kademeli uygulamalar şeklinde denemesi, poliploid birey elde etme olasılığını artırabileceği düşünülmektedir.

Poliploidi teşviki çalışmalarında, uygulamanın yapıldığı gelişim döneminin büyük önem taşıdığı bilinmektedir. Bu nedenle, gelecekteki araştırmalarda orizalinin yalnızca kotiledon aşamasında değil, farklı gelişim evrelerinde bulunan meristematik dokulara uygulanması önerilmektedir. Özellikle hipokotil, epikotil veya farklılaşma aşamasındaki apikal meristemlerin hedef alınması, kromozom katlanmasının daha etkin şekilde gerçekleşmesine katkı sağlayabilir.

Bu çalışmada *in vivo* koşullarda yapılan uygulamaların yanı sıra, ilerleyen çalışmalarda *in vitro* kültür tekniklerinin kullanılması önerilmektedir. *In vitro* koşullar, uygulama süresi ve dozunun daha hassas şekilde kontrol edilmesine olanak sağlamakta ve kimyasal mutajenlerin homojen bir biçimde bitki dokularına etki etmesini mümkün kılmaktadır. Bu yaklaşımın, özellikle miksploit bireylerin ayıklanması ve stabil poliploidlerin elde edilmesi açısından avantaj sağlayacağı düşünülmektedir.

Poliploidi indüksiyonunun başarısını artırmak amacıyla, orizaline ek olarak kolhisin, trifluralin veya amiprofos-metil (APM) gibi farklı antimitotik ajanların karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesi önerilmektedir. Ayrıca bu maddelerin kombinasyon halinde veya farklı uygulama zamanlarında kullanılması, poliploid birey elde etme olasılığını artırabilir.

Poliploidi teşvikine yönelik çalışmalarda, morfolojik ve anatomik gözlemlerin tek başına yeterli olmadığı; bu parametrelerin mutlaka flow sitometri ve gerekirse moleküler analizlerle desteklenmesi gerektiği bilinmektedir. Bu nedenle, ileride yapılacak çalışmalarda ploidi düzeyinin doğrulanmasına yönelik analizlerin daha geniş örnek sayıları ile desteklenmesi ve mümkünse kromozom sayımı gibi sitogenetik yöntemlerle doğrulanması önerilmektedir. Böylece miksploid ve

homojen poliploid bireylerin daha net şekilde ayrımı sağlanabilir.

Elde edilen miksploid bireylerin ileri gelişim dönemlerinde stabilite açısından izlenmesi büyük önem taşımaktadır. Miksploid bireylerin zaman içerisinde homojen poliploid bireylere dönüşüp dönüşmediğinin takip edilmesi, poliploidi çalışmalarının sürdürülebilirliği açısından gereklidir. Bu bireylerin vejetatif çoğaltma yoluyla sabitlenmesi ve uzun dönemli gözlemlerle değerlendirilmesi önerilmektedir.

Poliploid *Pistacia atlantica* anaçlarının fizyolojik, morfolojik ve agronomik özelliklerinin detaylı biçimde incelenmesi, elde edilen bireylerin pratik kullanım potansiyelini ortaya koyacaktır. Özellikle kuraklık, tuzluluk ve biyotik streslere tolerans düzeyleri ile aşı uyumu, aşı tutma oranı ve aşı sonrası gelişim performanslarının değerlendirilmesi, bu anaçların fıstık yetiştiriciliğinde kullanılabilirliğini belirlemede kritik rol oynayacaktır.

Sonuç olarak, bu çalışma *Pistacia atlantica* anaçlarında poliploidi teşviki konusunda temel bir altyapı sunmakta olup, önerilen geliştirmelerle birlikte ileride yapılacak çalışmaların fıstık anaç ıslahına önemli katkılar sağlayacağı düşünülmektedir.

## KAYNAKLAR

- Acanda, Y., Martínez, Ó., González, M., Prado, M., & 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.
- Acanda, Y., Prado, M., González, M., & 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.
- Acquaah, G. (2012). *Principles of plant genetics and breeding* (2nd ed.). Wiley-Blackwell.
- Ahloowalia, B., & Garber, E. (1961). The genus *Collinsia*. XIII. Cytogenetic studies of interspecific hybrids involving species with pediceled flowers. *Botanical Gazette*, 122(3), 219–228.
- Ak, B. E. (2014). Plant genetic resources of *Pistacia* spp. and pistachio cultivars in the world. In F. Dicenta, P. Martínez-Gómez, & E. Ortega (Eds.), *VI International Symposium on Almonds and Pistachios* (Acta Horticulturae, Vol. 1028, Article 43). International Society for Horticultural Science.
- Aleza, P., Juárez, J., Ollitrault, P., & Navarro, L. (2009). Production of tetraploid plants of non-apomictic *Citrus* genotypes. *Plant Cell Reports*, 28(12), 1837–1846.
- Andreu, J. M., & Timasheff, S. N. (1982). Tubulin bound to colchicine forms polymers different from microtubules. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 79(22), 6753–6756.
- Aversano, R., Caruso, I., Aronne, G., De Micco, V., Scognamiglio, N., & Carputo, D. (2013). Stochastic changes affect *Solanum* wild species following autopolyploidization. *Journal of Experimental Botany*, 64, 625–635.
- Bae, S.-J., Islam, M. M., Kim, H.-Y., & Lim, K.-B. (2020). Induction of tetraploidy in watermelon with oryzalin treatments. *Horticultural Science & Technology*, 38(3), 385–393.
- Bochantseva, Z. P. (1972). Ochislakh chromosom. *Introduktsiya i Akklimatizatsiya Rastanii Akademii Nauk Uzbekskoi SSR*, 44, 53.
- Bohanec, B. (2003). Ploidy determination using flow cytometry. In *Doubled haploid production in crop plants* (pp. 397–403). Springer.
- Bowers, J. E., Chapman, B. A., Rong, J., & Paterson, A. H. (2003). Unravelling angiosperm genome evolution by phylogenetic analysis of chromosomal duplication events. *Nature*, 422(6930), 433–438.
- Carmona-Martin, E., Regalado, J., Raghavan, L., & Encina, C. (2015). In vitro induction of autooctoploid asparagus genotypes. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 121(1), 249–254.

- Carvalho, J. F., Carvalho, C. R., & Otoni, W. C. (2005). In vitro induction of polyploidy in annatto (*Bixa orellana*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 80, 69–75.
- Cavalier-Smith, T. (1978). Nuclear volume control by nucleoskeletal DNA, selection for cell volume and cell growth rate, and the solution of the DNA C-value paradox. *Journal of Cell Science*, 34, 247–278.
- Chakraborti, S., Vijayan, K., Roy, B., & Qadri, S. (1998). In vitro induction of tetraploidy in mulberry (*Morus alba* L.). *Plant Cell Reports*, 17(10), 799–803.
- Chen, C., Hou, X., Zhang, H., Wang, G., & Tian, L. (2011). Induction of *Anthurium andraeanum* ‘Arizona’ tetraploid by colchicine in vitro. *Euphytica*, 181(2), 137–145.
- Cho, W.-Y., Deepo, D. M., Islam, M. M., Nam, S.-C., Kim, H.-Y., Han, J.-S., Kim, C.-K., Chung, M.-Y., & Lim, K.-B. (2021). Induction of polyploidy in *Cucumis melo* ‘Chammel’ and evaluation of morphological and cytogenetic changes. *Horticultural Science & Technology*, 39(5), 625–636.
- Chung, M. Y., Kim, C. Y., Min, J. S., Lee, D.-J., Naing, A. H., Chung, J. D., & Kim, C. K. (2014). In vitro induction of tetraploids in an interspecific hybrid of *Calanthe* (*C. discolor* × *C. sieboldii*) through colchicine and oryzalin treatments. *Plant Biotechnology Reports*, 8(3), 251–257.
- Cohen, D., & Yao, J.-L. (1996). In vitro chromosome doubling of nine *Zantedeschia* cultivars. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 47(1), 43–49.
- Compton, M. E., Gray, D., & Elmstrom, G. (1996). Identification of tetraploid regenerants from cotyledons of diploid watermelon cultured in vitro. *Euphytica*, 87(3), 165–172.
- Cristiano, G., Camposeo, S., Fracchiolla, M., Vivaldi, G. A., De Lucia, B., & Cazzato, E. (2016). Salinity differentially affects growth and ecophysiology of two mastic tree (*Pistacia lentiscus* L.) accessions. *FAO AGRIS Database*.
- Davis, P. H. (Ed.). (1982). *Flora of Turkey and the East Aegean Islands* (Vol. 7). Edinburgh University Press.
- de Carvalho, J. F. R. P., de Carvalho, C. R. P., & Otoni, W. C. (2005). In vitro induction of polyploidy in annatto (*Bixa orellana*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 80(1), 69–75.
- Dhooghe, E., Denis, S., Eeckhaut, T., Reheul, D., & Van Labeke, M.-C. (2009). In vitro induction of tetraploids in ornamental *Ranunculus*. *Euphytica*, 168(1), 33–40.
- Dhooghe, E., Van Laere, K., Eeckhaut, T., Leus, L., & Van Huylenbroeck, J. (2011). Mitotic chromosome doubling of plant tissues in vitro. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 104(3), 359–373.
- Doğan, O. (2022). *Azot protoksit ve orizalinin ‘41 B’ ile ‘Fercal’ asma anaçlarında mutajenik etkileri* (Doktora tezi, Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü).

Selçuk Üniversitesi.

- Doležel, J. (1997). Application of flow cytometry for the study of plant genomes. *Journal of Applied Genetics*, 38(3), 285–302.
- Doležel, J., Greilhuber, J., & Suda, J. (2007). Flow cytometry with plant cells: Analysis of genes, chromosomes and genomes. In *Flow cytometry with plants: An overview* (pp. 41–65).
- Doležel, J., Vrána, J., Šafář, J., Bartoš, J., Kubaláková, M., & Šimková, H. (2012). Chromosomes in the flow to simplify genome analysis. *Functional & Integrative Genomics*, 12(3), 397–416.
- Doyle, J. J., Doyle, J. L., Rauscher, J. T., & Brown, A. H. D. (2004). Evolution of the perennial soybean polyploid complex (*Glycine* subgenus *Glycine*): A study of contrasts. *Biological Journal of the Linnean Society*, 82(4), 583–597.
- Dunn, B. L., & Lindstrom, J. T. (2007). Oryzalin-induced chromosome doubling in *Buddleja* to facilitate interspecific hybridization. *HortScience*, 42(6), 1326–1328.
- Dwivedi, N., Sikdar, A. K., Dandin, S. B., Sastry, C. R., & Jolly, M. S. (1986). Induced tetraploidy in mulberry I: Morphological, anatomical and cytological investigations in cultivar RFS-135. *Cytologia*, 51(2), 393–401.
- Eng, W.-H., & Ho, W.-S. (2019). Polyploidization using colchicine in horticultural plants: A review. *Scientia Horticulturae*, 246, 604–617.
- Ermayanti, T. M., Rantau, D. E., Wulansari, A., Martin, A. F., & Al Hafiizh, E. (2019). Variasi jumlah kromosom talas Bentul (*Colocasia esculenta* (L.) Schott) in vitro hasil perlakuan orizalin [Variation in chromosome number of in vitro taro Bentul after oryzalin treatment]. Pusat Penelitian Bioteknologi–LIPI.
- Estilai, A., & Shannon, M. C. (1993). Salt tolerance in relation to ploidy level in guayule. In J. Janick & J. E. Simon (Eds.), *New crops* (pp. 349–351). Wiley.
- Ewald, D., Ulrich, K., Naujoks, G., & Schröder, M.-B. (2009). Induction of tetraploid poplar and black locust plants using colchicine: Chloroplast number as an early marker for selecting polyploids in vitro. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 99(3), 353–357.
- Fasihi Harandi, O., & Ghaffari, S. M. (2001). Chromosome studies on pistachio (*Pistacia vera* L.) from Iran. *Cahiers Options Méditerranéennes*, 56, 35–40.
- Fong, S. W. (2008). *In vitro induction of polyploidy in Nepenthes gracilis* (Master's thesis). University of Malaya, Faculty of Science, Kuala Lumpur.
- Gao, S. L., Zhu, D. N., Cai, Z. H., & Xu, D. R. (1996). Autotetraploid plants from colchicine-treated bud culture of *Salvia miltiorrhiza*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 47, 73–77.
- Głowacka, K., Jeżowski, S., & 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.
- Ghaffari, S. M., & Fasihi Harandi, O. (1999). Behavior of meiotic chromosomes in *Pistacia vera* L. (Anacardiaceae). *Nucis Newsletter*, 8, 28–29.
- Gill, B. S., Bir, S. S., & Singhal, V. K. (1984). Cytological studies in some western Himalayan wood species II. Polypetalae. In G. S. Paliwal (Ed.), *The vegetational wealth of the Himalayas* (pp. 497–515). Puja Publication.
- Gomez, K. A., & Gomez, A. A. (1984). *Statistical procedures for agricultural research* (2nd ed.). John Wiley & Sons.
- Greisbach, R. J. (1990). A fertile tetraploid *Anigozanthos* hybrid produced by in vitro colchicine treatment. *HortScience*, 25(7), 802–803.
- Gu, X., Yang, A., Meng, H., & Zhang, J. (2005). In vitro induction of tetraploid plants from diploid *Zizyphus jujuba* Mill. cv. Zhanhua. *Plant Cell Reports*, 24(11), 671–676.
- Gucker, F. T., Jr., O’Konski, C. T., Pickard, H. B., & Pitts, J. N., Jr. (1947). A photoelectronic counter for colloidal particles. *Journal of the American Chemical Society*, 69(10), 2422–2431.
- Heller, F. O. (1973). DNS-Bestimmung an Keimwurzeln von *Vicia faba* L. mit Hilfe der Impuls-Cytophotometrie. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft*, 86(5–9), 437–441.
- Hiesey, W. M., Nobs, M. A., & Björkman, O. (1971). *Experimental studies on the nature of species. V. Biosystematics, genetics, and physiological ecology of the Erythranthe section of Mimulus* (Publication No. 628). Carnegie Institution of Washington.
- Huang, S.-F., Chen, Z.-Y., Chen, S.-J., Huang, X.-X., Qi, Q.-Y., & Shi, X.-H. (1986). Plants chromosome count (3). *Subtropical Forest Science & Technology*, 4, 50–56.
- Huang, S.-F., Zhao, Z.-F., Chen, Z.-Y., Chen, S.-J., & Huang, X.-X. (1989). Chromosome counts on hundred species and infraspecific taxa. *Acta Botanica Austro-Sinica*, 5, 161–176.
- Huy, N. P., Luan, V. Q., Tung, H. T., Hien, V. T., Ngan, H. T. M., Duy, P. N., & Nhut, D. T. (2019). In vitro polyploid induction of *Paphiopedilum villosum* using colchicine. *Scientia Horticulturae*, 252, 283–290.
- Kafkas, S., & Perl-Treves, R. (2001). Morphological and molecular phylogeny of *Pistacia* species in Turkey. *Theoretical and Applied Genetics*, 102, 908–915.
- Kara, Z., & Yazar, K. (2021). Effects of shoot tip colchicine applications on some grape cultivars. *Journal of Agricultural and Environmental Food Sciences*, 5 (1), 78–84.
- Kara, Z., Doğan, O., Yazar, K., & Sabır, A. (2018b). 41 B asma anacına in vivo kolhisin uygulamalarının morfolojik ve sitolojik etkileri. *Selçuk Journal of*

*Agriculture and Food Sciences*, 32(1), 8–13.

- Kara, Z., Yazar, K., Doğan, O., Sabır, A., & Özer, A. (2018a). Induction of ploidy in some grapevine genotypes by N<sub>2</sub>O treatments. In *Proceedings of the XXX International Horticultural Congress: International Symposium on Viticulture: Primary Production and Processing* (Acta Horticulturae No. 1276, pp. 239–246).
- Kaska, N., & Bilgen, A. (1988). Top-working of wild *Pistacia* species in Turkey. In C. Grassely (Ed.), *Programme de recherche Agrimed: 7e Colloque du GREMPA* (Rapport EUR 11557, pp. 229–316).
- Kosonoy-González, R., Tapia-Campos, E., & Barba-González, R. (2019). The importance of mitotic spindle inhibitors in plant breeding. In *Proceedings of the IX International Symposium on New Ornamental Crops* (Acta Horticulturae No. 1288, pp. 175–184).
- Lan, M., Chen, J.-H., Fei, C., Xu, Q.-W., Tong, Z.-K., Huang, H.-H., Dong, R.-H., Lou, X.-Z., & Lin, E.-P. (2020). Induction and characterization of polyploids from seeds of *Rhododendron fortunei* Lindl. *Journal of Integrative Agriculture*, 19(8), 2016–2026.
- Leitch, I. J., & Bennett, M. D. (1997). Polyploidy in angiosperms. *Trends in Plant Science*, 2(12), 470–476.
- Levin, D. A. (1983). Polyploidy and novelty in flowering plants. *The American Naturalist*, 122(1), 1–25.
- Loureiro, J., Pinto, G., Lopes, T., Doležel, J., & Santos, C. (2005). Assessment of ploidy stability of the somatic embryogenesis process in *Quercus suber* L. using flow cytometry. *Planta*, 221(6), 815–822.
- Lu, M., Zhang, P., Wang, J., Kang, X., Wu, J., Wang, X., & Chen, Y. (2014). Induction of tetraploidy using high temperature exposure during the first zygote division in *Populus adenopoda* Maxim. *Plant Growth Regulation*, 72(3), 279–287.
- Lundgren, M. R., Mathers, A., Baillie, A. L., Dunn, J., Wilson, M. J., Hunt, L., Pajor, R., Fradera-Soler, M., Rolfe, S., & Osborne, C. P. (2019). Mesophyll porosity is modulated by the presence of functional stomata. *Nature Communications*, 10(1), 1–10.
- Marinho, R., Mendes-Rodrigues, C., Bonetti, A., & Oliveira, P. (2014). Pollen and stomata morphometrics and polyploidy in *Eriotheca* (Malvaceae-Bombacoideae). *Plant Biology*, 16(2), 508–511.
- Martelotto, L. G., Ortiz, J. P. A., Stein, J., Espinoza, F., Quarin, C. L., & Pessino, S. C. (2007). Genome rearrangements derived from autopolyploidization in *Paspalum* sp. *Plant Science*, 172(5), 970–977.
- Mehra, P. N. (1976). *Cytology of Himalayan hardwoods*. Sree Saraswati Press.
- Mehra, P. N., & Sareen, E. T. S. (1969). IOPB chromosome number reports XXII.

*Taxon*, 18, 433–442.

- Menezes-Sá, T. S. A., Arrigoni-Blank, M. F., Costa, A. S., Santos-Serejo, J. A., Blank, A. F., Soares, C. A., & Moura, G. M. S. (2019). Chromosome doubling in *Cattleya tigrina* A. Rich. *Scientia Plena*, 15(11), 1–10.
- Ming, S., Xiao-fan, L., Ying, K., Jin-fang, S., & Qi-xiang, Z. (2012). Polyploidy induction of three *Lilium* species endemic to China (*Lilium pumilum*, *L. sargentiae*, *L. tsingtauense*). *Acta Horticulturae*, 935, 82–83.
- Moghbel, N., Borujeni, M. K., & Bernard, F. (2015). Colchicine effect on the DNA content and stomata size of *Glycyrrhiza glabra* var. *glandulifera* and *Carthamus tinctorius* L. cultured in vitro. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 13(1), 1–6.
- Molin, W. T., Mayers, S. P., Baer, G. R., & Schrader, L. E. (1982). Ploidy effects in isogenic populations of alfalfa. II. Photosynthesis, chloroplast number, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase, chlorophyll, and DNA in protoplasts. *Plant Physiology*, 70, 1710–1714.
- Morejohn, L. P., & Bureau, T. E. (1993). Studies on the mechanism of oryzalin and APM: Binding to tubulin, inhibition of microtubule polymerization and use in plant polyploidy induction. *Plant Physiology*, 101(2), 469–477.
- Motosugi, H., Okudo, K., Kataoka, D., & Naruo, T. (2002). 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., & 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.
- Natarajan, G. (1977). *Contribution à l'étude caryosystématique des espèces de la garrigue languedocienne* (Doctoral thesis). Académie de Montpellier, France.
- Nilsson, Q., & Lassen, P. (1971). Chromosome numbers of vascular plants from Austria, Mallorca and Yugoslavia. *Botaniska Notiser*, 124, 270–276.
- Noh, J., Park, K., Yun, H., Do, G., Hur, Y., Kim, S., Lee, H., Ryou, M., Park, S., & 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.
- Omezzine, F., Ladhari, A., Nefzi, F., Harrath, R., Aouni, M., & Haouala, R. (2012). Induction and flow cytometry identification of mixoploidy through colchicine treatment of *Trigonella foenum-graecum* L. *African Journal of Biotechnology*, 11(98), 16434–16442.
- Parfitt, D. E., & Badenes, M. L. (1997). Phylogeny of the genus *Pistacia* as determined from analysis of the chloroplast genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, 7987–7992.

- Pliankong, P., Suksa-Ard, P., & Wannakrairoj, S. (2017). Effects of colchicine and oryzalin on polyploidy induction and production of capsaicin in *Capsicum frutescens* L. 'Pawnpirun'. *Thai Journal of Agricultural Science*, 50(2), 108–120.
- Qiao, G., Liu, M., Song, K., Li, H., Yang, H., Yin, Y., & Zhuo, R. (2017). Phenotypic and comparative transcriptome analysis of different ploidy plants in *Dendrocalamus latiflorus* Munro. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1371.  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01371>
- Rameshsing, C. N., Hegde, S. N., Wallalwar, M., & Vasundhara, M. (2015). Crop improvement in stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) through colchicine. *Research on Environment and Life Sciences*, 8(2), 393–396.
- Ramsey, J., & Schemske, D. W. (1998). Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 29, 467–501.
- Rao, S., Kang, X., Li, J., & Chen, J. (2019). Induction, identification and characterization of tetraploidy in *Lycium ruthenicum*. *Breeding Science*, 69(1), 1–9.
- Rêgo, M. M., Rêgo, E. R., Bruckner, C. H., Finger, F. L., & Otoni, W. C. (2011). In vitro induction of autotetraploids from diploid yellow passion fruit mediated by colchicine and oryzalin. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 107(3), 451–459.
- Rose, J. B., & Tobutt, K. R. (2000). Induction of tetraploids for breeding hardy ornamentals. In *Proceedings of the 4th International Symposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding* (p. 12). Tampere, Finland.
- Roy, A., Leggett, G., & Koutoulis, A. (2001). In vitro tetraploid induction and generation of tetraploids from mixoploids in hop (*Humulus lupulus* L.). *Plant Cell Reports*, 20(6), 489–495.
- Sabır, A., & Kara, Z. (2011). Gibberelik asit ve nanoteknolojik kalsit uygulamalarının asma tohumlarının çimlenmeleri üzerine etkileri. *Türkiye VI. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi Bildirileri* (ss. 135–139). Şanlıurfa.
- Sakhanokho, H. F., Rajasekaran, K., Kelley, R. Y., & Islam-Faridi, N. (2009). Induced polyploidy in diploid ornamental ginger (*Hedychium muluense* R. M. Smith) using colchicine and oryzalin. *HortScience*, 44(7), 1809–1814.
- Sinski, I., Dal Bosco, D., Pierozzi, N. I., Maia, J. D. G., Ritschel, P. S., & Quecini, V. (2014). Improving in vitro induction of autopolyploidy in grapevine seedless cultivars. *Euphytica*, 196(2), 299–311.
- Soltis, D. E., & Soltis, P. S. (1993). Molecular data facilitate a reevaluation of traditional tenets of polyploid evolution. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 12, 243–273.
- Soltis, D. E., & Soltis, P. S. (1999). Polyploidy: Origins of species and genome evolution. *Trends in Ecology & Evolution*, 14, 348–352.

- Soltis, D. E., Soltis, P. S., & Rieseberg, L. H. (1993). Molecular data and the dynamic nature of polyploidy. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 12(3), 243–273.
- Soltis, D. E., Soltis, P. S., & Tate, J. A. (2004). Advances in the study of polyploidy since plant speciation. *New Phytologist*, 161(1), 173–191.
- Stebbins, G. L. (1950). *Variation and evolution in plants*. Columbia University Press.
- Şimşek, İ., Göçmen, M., & Sarı, N. (2013). Diploid ve tetraploid karpuz bitkilerinde morfolojik ve sitolojik farklılıkların belirlenmesi. *Derim Dergisi*, 30(1), 1–14.
- Tang, Z.-Q., Chen, D.-L., Song, Z.-J., He, Y.-C., & Cai, D.-T. (2010). In vitro induction and identification of tetraploid plants of *Paulownia tomentosa*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 102(2), 213–220.
- Tavan, M., Mirjalili, M. H., & Karimzadeh, G. (2015). In vitro polyploidy induction: Changes in morphological, anatomical and phytochemical characteristics of *Thymus persicus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 122(3), 573–583.
- Thao, N. T. P., Ureshino, K., Miyajima, I., Ozaki, Y., & Okubo, H. (2003). Induction of tetraploids in ornamental *Alocasia* through colchicine and oryzalin treatments. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 72, 19–25.
- Tomé, L. G. O., Silva, A. B., Pinto, C. A. B. P., Davide, L. C., Pereira, D. S., & Carvalho, C. R. (2016). Colchicine and oryzalin effects on tetraploid induction and leaf anatomy of *Solanum commersonii*. *Ciência Rural*, 46, 1973–1979.
- Tyagi, B. R., & Naqvi, A. A. (1987). Relevance of chromosome number variation to yield and quality of essential oil in *Mentha arvensis* L. *Cytologia*, 52(2), 377–385.
- Väinölä, A. (2000). Polyploidization and early screening of *Rhododendron* hybrids. *Euphytica*, 112(3), 239–244.
- Väinölä, A., & Repo, T. (2000). Polyploidisation of *Rhododendron* cultivars in vitro and its effect on cold hardiness. In *Proceedings of the 4th International Symposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding* (p. 99). Tampere, Finland.
- Vision, T. J., Brown, D. G., & Tanksley, S. D. (2000). The origins of genomic duplications in *Arabidopsis*. *Science*, 290(5499), 2114–2117.
- Webber, J. M. (1940). Polyembryony. *The Botanical Review*, 6, 575–598.
- Xie, X., Agüero, C. B., Wang, Y., & Walker, M. A. (2015). In vitro induction of tetraploids in *Vitis* × *Muscadinia* hybrids. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 122(3), 675–683.
- Yang, X., Cao, Z., An, L., Wang, Y., & Fang, X. (2006). In vitro tetraploid induction via colchicine treatment from diploid somatic embryos in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Euphytica*, 152(2), 217–224.
- Yazar, K. (2018). *Kolhisin uygulamalarının “Trakya İlkeren”, “Ekşi Kara” ve “Gök*

Üzüm” (*Vitis vinifera* L.) çeşitlerinde morfolojik ve sitolojik etkileri (Doktora tezi). Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.

- Yılmaz, A., Özuslu, E., & Sarpkaya, K. (2023). *Pistacia atlantica* Desf. türünün Marmara, Ege ve Akdeniz bölgelerinde yayılış alanları ve taksonomik özelliklerinin belirlenmesi. *KSÜ Tarım ve Doğa Dergisi*, 26(6), 1259–1267.
- Yuan, S.-X., Liu, Y.-M., Fang, Z.-Y., Yang, L.-M., Zhuang, M., Zhang, Y.-Y., & Sun, P.-T. (2009). Study on the relationship between the ploidy level of microspore-derived plants and the number of chloroplasts in stomatal guard cells in *Brassica oleracea*. *Agricultural Sciences in China*, 8(8), 939–946.
- Zakizadeh, S., Kaviani, B., & Hashemabadi, D. (2020). In vivo-induced polyploidy in *Dendrobium* ‘Sonia’ in a bubble bioreactor system using colchicine and oryzalin. *Brazilian Journal of Botany*, 43(4), 921–932.
- Zeng, Q., Liu, Z., Du, K., & Kang, X. (2019). Oryzalin-induced chromosome doubling in triploid *Populus* and its effect on plant morphology and anatomy. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 138(3), 571–581.
- Zhang, L.-Y., Guo, Q.-G., Li, X.-L., Zeng, H., Tan, J.-M., & Liang, G.-L. (2005). Study on the relationship between the number of chloroplasts in stomatal guard cells and the ploidy of loquat cultivars. *International Journal of Fruit Science*, 3(9), 229–233.
- Zhang, Q., Luo, F., Liu, L., & 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., & Liu, X. (2008). In vitro induction of tetraploids in *Phlox subulata* L. *Euphytica*, 159(1), 59–65.
- Zhou, H.-W., Zeng, W.-D., & Yan, H.-B. (2017). In vitro induction of tetraploids in cassava variety ‘Xinxuan 048’ using colchicine. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 128(3), 723–729.
- Zohary, M. (1952). A monographical study of the genus *Pistacia*. *Palestine Journal of Botany, Jerusalem Series*, 5, 187–228.