



T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



AZOT PROTOKSİT VE ORİZALİNİN '41 B'
İLE 'FERCAL' ASMA ANAÇLARINDA
MUTAJENİK ETKİLERİ

Osman DOĞAN

DOKTORA TEZİ

Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

Mart-2022
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

TEZ KABUL VE ONAYI

Osman DOĞAN tarafından hazırlanan “**Azot Protoksit ve Orizalinin ‘41 B’ ile ‘Fercal’ Asma Anaçlarında Mutajenik Etkileri**” adlı tez çalışması 03/03/2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı’nda DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Başkan

Prof. Dr. Zeki KARA

.....

Danışman

Prof. Dr. Zeki KARA

.....

Üye

Prof. Dr. Birhan MARASALI KUNTER

.....

Üye

Prof. Dr. Ali SABIR

.....

Üye

Prof. Dr. İlknur KORKUTAL

.....

Üye

Dr. Öğr. Üyesi Kevser YAZAR

.....

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Sait GEZGİN
FBE Müdürü

Bu tez çalışması ÖYP tarafından 2018-ÖYP-030 nolu proje ile desteklenmiştir.

TEZ BİLDİRİMİ

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.

Osman DOĞAN

Tarih: 03.03.2022

ÖZET

DOKTORA TEZİ

AZOT PROTOKSİT VE ORİZALİNİN '41 B' İLE 'FERCAL' ASMA ANAÇLARINDA MUTAJENİK ETKİLERİ

Osman DOĞAN

Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Zeki KARA

2022, 119 Sayfa

Jüri

Prof. Dr. Zeki KARA

Prof. Dr. Birhan MARASALI KUNTER

Prof. Dr. Ali SABİR

Prof. Dr. İlknur KORKUTAL

Dr. Öğr. Üyesi Kevser YAZAR

Asma (*Vitis* spp.), küresel boyutta sosyal ve ekonomik açıdan en önemli bitkilerden birisidir. Üzüm çeşitleri ve asma anaçlarının geliştirilmesi günümüzdeki tüketici taleplerinin yanı sıra iklim değişikliğine uyum sağlamak için giderek artan bir öneme sahiptir. Bugüne kadar seleksiyon ve melezleme çalışmalarıyla elde edilen asma anaçları, tüm talepleri karşılayamamaktadır. Çoğu asma anacı Avrupa bağ bölgeleri için seçilmiş olsa da ülkemizdeki kireçli ve sıg topraklarda, kısa vejetasyonlu bağ alanlarında üretici gereksinimlerini tam olarak karşılayamamaktadırlar. Asma ıslahında doğal genetik çeşitlilikten yeni genotipler elde etmede mutantlar, melezlemeye kıyasla daha umut vericidir. Poliploit bitkiler, diploit akrabalarına kıyasla çeşitli açılardan daha iyi performans gösterirler. Bu çalışmada, 41 B ve Fercal asma anaçlarının büyüme için uyarılmış tohum ve çeliklerine orizalin ve N₂O gazının farklı doz ve sürelerde uygulanarak poliploit asma anaçları elde edilmedeki etkinlikleri incelenmiştir. Kimyasal mutajen uygulamalarının LD₅₀ değerleri belirlenmiş, morfolojik ve sitolojik etkileri makroskobik, mikroskobik ve sitolojik yöntemlerle incelenmiştir. Tüm mutajen uygulamalarında canlılık oranları azalttığı gibi, uygulama süresi ve doz artışına zıt bir şekilde LD₅₀ değerleri de azalmıştır. Orizalin ve N₂O uygulamalarıyla uyardığımız poliploit bireylerin yaprak kalınlığı ve klorofil içeriklerinde diploit ebeveynlerine kıyasla önemli artışlar belirlenmiştir. Benzer şekilde poliploit bireylerin stoma boyutları önemli ölçüde artarken stoma yoğunlukları azalmış, kloroplast sayılarında önemli artışlar kaydedilmiştir. Kloroplast ve stoma ölçümleri sonucunda mutant olduğu düşünülen 55 adet örnekte FC analizleri yapılmıştır. FC analizinde, Fercal neslinden 1 adet tetraploit, 4 adet miksoploit ve 41 B neslinden ise 1 adet miksoploit bitki seçilmiştir. Fercal asma anacı tohumlarına N₂O gazının 10 bar 96 saat uygulaması sonucunda tetraploit elde edilirken miksoploit bitkiler 41 B ve Fercal asma anacının her ikisinde de orizalinin 100 µM 96 saat uygulaması yapılan fideler arasından seçilmiştir. Miksoploit ve tetraploit bireylerin nükleer DNA içeriği diploit bitkilerle karşılaştırıldığında sırasıyla 1.34 ve 2.00 kat artmıştır. Poliploit anaç genotiplerinin kök ucu örneklerinde yapılan kromozom sayımında tetraploit Fercal asma genotipinin kromozom sayısı diploit orijinaline kıyasla 2 kat arttığı doğrulanmıştır. 41 B ve Fercal asma anaçlarında farklı doz ve sürelerdeki orizalin ve N₂O uygulamaları poliploit bitki uyarımında etkili bulunmuştur. Uygulamaların poliploidinin doğrulanması, poliploit bireylerin tespitinde ön veriler olarak kullanılan stoma özellikleri ve kloroplast sayımları kısmen başarılı bulunmuştur. FC analizi miksoploit genotipinin tespitinde vazgeçilmez olarak görülmektedir. Poliploidi uyarımında elde edilen mutantların ploidi düzeylerinin tespiti için FC analizi ve kesin doğrulama için kromozom sayımlarının gerekliliği düşünülmektedir. Bundan sonraki poliploit mutant elde etme çalışmalarında asma anacı genotiplerine, 100 µM-96-saat orizalin ve 10 bar 96-saat N₂O dozları öncelikli olarak test edilebilir.

Anahtar Kelimeler: asma anacı, flow sitometri, ıslah, kromozom sayımı, mutajen, poliploidi

ABSTRACT

Ph.D THESIS

MUTAGENIC EFFECTS OF NITROGEN PROTOXIDE AND ORYZALIN ON '41 B' AND 'FERCAL' GRAPEVINE ROOTSTOCKS

Osman DOĞAN

**THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF
SELÇUK UNIVERSITY
THE DEGREE OF DOCTOR OF SCIENCE
IN HORTICULTURE**

Advisor: Prof. Dr. Zeki KARA

2022, 119 Pages

Jury

Prof. Dr. Zeki KARA

Prof. Dr. Birhan MARASALI KUNTER

Prof. Dr. Ali SABIR

Prof. Dr. İlknur KORKUTAL

Dr. Öğr. Üyesi Kevser YAZAR

Grape (*Vitis* spp.) is one of the most important crops globally, both socially and economically. The development of grape varieties and vine rootstocks is of increasing importance to adapt to climate change as well as today's consumer demands. The vine rootstocks obtained by selection and hybridization studies have not been able to meet all demands. Although most grape rootstocks are selected for the European vineyard regions, they cannot fully meet the needs of the producers in the calcareous and shallow soils and vineyard areas with short vegetation in our country. In grape breeding, mutants are more promising than crossbreeding in obtaining new genotypes from natural genetic diversity. Polyploid plants outperform their diploid relatives in several respects. In this study, the effects of oryzalin and N₂O gas on seeds and cuttings stimulated for growth of 41 B and Fercal rootstocks were investigated in obtaining polyploid rootstocks by applying different doses and application times. LD₅₀ values of chemical mutagen applications were determined, morphological and cytological effects were examined by macroscopic, microscopic, and cytological methods. Significant increases were determined in leaf thickness and chlorophyll contents of polyploid seedlings, which we stimulated with oryzalin and N₂O applications, compared to their diploid parents. Similarly, stomatal sizes of polyploid individuals increased significantly, while their stomatal densities decreased, and significant increases were recorded in chloroplast numbers. FC analyses were performed on 55 samples that were thought to be mutant because of chloroplast and stoma measurements. In FC analyses, 1 tetraploid seedling from Fercal offspring, 4 mixoploid seedlings and 1 mixoploid seedling from 41 B offspring were selected. While tetraploid mutant was obtained by applying N₂O gas to Fercal vine rootstock seeds for 96 hours at 10 bar, mixoploid seedlings were selected among the seedlings in which 100 µM-96-hour of oryzalin was applied to both grapevine rootstocks. The nuclear DNA content of mixoploid and tetraploid offspring was increased by 1.34 and 2.00-fold, respectively, when compared to their diploid parents. Chromosome counts of root tip samples of polyploid grapevine rootstock offspring confirmed that the chromosome number of the tetraploid Fercal grapevine rootstock offspring was increased by 2 times compared to the diploid parent. Different doses and durations of oryzalin and N₂O applications to 41 B and Fercal rootstocks were effective in stimulating polyploid plants. The stomatal characteristics and chloroplast counts, which were used as preliminary data in the confirmation of the polyploidy of the applications and the detection of polyploid individuals, were found to be partially successful. FC analysis was indispensable in detecting the mixoploid genotype. FC analysis for the detection of ploidy levels of mutants obtained in polyploidy induction and chromosome count were deemed necessary for definitive

confirmation. In future studies to obtain polyploid mutants in grapevine rootstock genotypes, 100 μ M-96-hour oryzalin and 10 bar 96-hour N₂O can be tested with priority.

Keywords: breeding, chromosome count, grape rootstock, flow cytometry, mutagen, polyploidy



ÖNSÖZ

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

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

Çalışmamın her aşamasında yardımlarını esirgemeyen Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Öğretim üyesi sayın Dr. Öğretim Üyesi sayın hocam Kevser YAZAR ve Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Sayın Araş. Gör. Heydem EKİNCİ'ye, ihtiyaç duyduğum zaman yardımlarını esirgemeyen Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Öğretim üyesi Araş. Gör. Dr. Namık Kemal YÜCEL'e

Flow Sitometri analizinin yapılmasında yardımcı olan ve bilgilerini paylaşan İDA Yasam Teknolojileri teknik personeli sayın Recep ERGÜN'e,

Çalışmamın sera aşamasında yardımlarını esirgemeyen doktora öğrencileri Yasin GAYRETLİ ve Sarmad Aydın ABDULHADI, kromozom sayımı aşamasında yardımcı olan Mine ERBOĞA ve Sabit YAZICI'ya ve doktora süreçlerimizi beraber yürüttüğümüz Malatya Turgut Özal Üniversitesi Battalgazi Meslek Yüksekokulu sayın Öğr. Gör. Ayşe ÖZER'e

Dua ve desteklerini hiçbir zaman eksik etmeyen annem Şerife DOĞAN, babam Ahmet DOĞAN, eşim Şerife Betül DOĞAN'a ve kızlarım Ayşe Sena ve Meryem Meva'ya teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Osman DOĞAN
KONYA-2022

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
ÖNSÖZ	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR	x
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	4
2.1. Asma Anacı.....	4
2.2. Poliploidi.....	6
2.3. Ploidi Belirleme Yöntemleri	14
2.4. Anaç Islahı	16
2.5. Poliploit Anaç	21
2.6. N ₂ O ile Poliploidi Teşviki.....	28
2.7. Orizalin ile Poliploidi Teşviki.....	32
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	42
3.1. Materyal	42
3.1.1. 41 B.....	42
3.1.2. Fercal	43
3.1.3. Kyoho.....	44
3.1.4. Orizalin	44
3.1.5. N ₂ O (diazotmonoksit, nitroz oksit, gülme gazı)	45
3.2. Yöntem.....	47
3.2.1. Canlılık oranının tespiti	51
3.2.2. Ortalama öldürücü doz (LD ₅₀) tespiti	51
3.2.3. Yaprak kalınlığı	51
3.2.4. Stoma yoğunluğu (adet mm ⁻²) ve stoma boyutları (µm).....	52
3.2.5. Kloroplast sayımı (adet stoma ⁻¹).....	53
3.2.6. Yaprak klorofil içeriği	53
3.2.7. Flow sitometri (FC) yoluyla ploidi analizi	54
3.2.8. Kromozom sayımı.....	55
3.2.9. İstatistiksel analiz.....	56
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA.....	57
4.1. Canlılık Oranı	57
4.2. Ortalama Öldürücü Doz (LD ₅₀) Değeri	58
4.3. Yaprak Kalınlığı	61
4.4. Stoma Yoğunluğu (adet mm ⁻²) ve Stoma Boyutları (µm)	62
4.5. Kloroplast Sayısı.....	68

4.6. Yaprak Klorofil İçeriği (SPAD)	70
4.7. Flow Sitometri (FC) Analizi ve Nükleer DNA İçeriği	71
4.8. Kromozom Sayısı	73
4.9. Seçilmiş Bitkilerden Elde Edilen Sonuçlar.....	73
4.10. Tartışma	76
4.10.1. Canlılık oranı	81
4.10.2. Ortalama ldrc doz (LD ₅₀) değeri.....	82
4.10.3. Yaprak kalınlığı	84
4.10.4. Stoma yoğunluğu (adet mm ⁻²) ve stoma boyutları (μm).....	85
4.10.5. Kloroplast sayısı	87
4.10.6. Yaprak klorofil içeriği (SPAD).....	88
4.10.7. Flow sitometri ve nükleer DNA içeriği	89
4.10.8. Kromozom sayısı	91
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	93
5.1 Sonuçlar	93
5.2 neriler	94
ZGEMİş	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
KAYNAKLAR	96

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

%	: Yüzde
≈	: Yaklaşık
C	: Karbon
Ca	: Kalsiyum
H	: Hidrojen
HCl	: Hidroklorik asit
K	: Potasyum
Kg	: Kilogram
Mg	: Magnezyum
N	: Azot
N ₂ O	: Azot protoksit
NaCl	: Sodyum Klorür
NaOH	: Sodyum hidroksit
O ₂	: Oksijen
°C	: Santigrat Derece
P	: Fosfor
pH	: Power of Hidrojen=-log[H ⁺] (hidrojen iyonu konsantrasyonunun negatif logaritması)
S	: Kükürt

Kısaltmalar

°Brix	: Suda çözünür kuru madde
2,4-D	: 2,4-diklorofenoksi asetik asit
2n	: Somatik kromozom sayısı
3n	: Triploit
4n	: Tetraploit
ACC	: Asetil-CoA karboksilaz
AM	: Arbusküler mikorizal fungus
ArMV	: Arabis mozaik nepovirüs
Atm	: Atmosfer
BA	: Benzil adenin
cm	: Santimetre
cm ²	: Santimetre kare
cm ³	: Santimetreküp
CP	: Kılıf proteini
DH	: Dihaploidizasyon
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
EMS	: Etil metan sülfonat
FC	: Akış sitometrisi
g L ⁻¹	: Gram litre ⁻¹
g	: Gram
GA ₃	: Giberellik asit
Ha	: hektar
IBA	: İndol bütirik asit

JA	: Jasmonik asit
kPa	: Kilopascal
LD ₅₀	: Ortalama öldürücü doz
Ltd.	: limited
m	: Metre
M	: Mol
mg L ⁻¹	: Miligram litre-1
ml	: Mililitre
mm	: Milimetre
mM	: Milimol
mm ²	: Milimetrekare
MMS	: Metil metansülfonat
MPa	: Megapaskal
mRNA	: Mesajcı RNA
MS	: Murashige ve Skoog yapay besi ortamı
n	: Gameteki kromozom sayısı
N	: Normal
NaN ₃	: Sodyum azid
NN	: Nitsch ve Nitsch yapay besi ortamı
OSR	: Genel başarı oranı
örn.	: örneğin
PCR	: Polimeraz zincirleme reaksiyonu
Pg	: Pikogram
psi	: İnçkare başına libre
RNA	: Ribo nükleik asit
SA	: Salisilik asit
SSCP	: Tek telli konformasyonel polimorfizm
Şti.	: Şirketi
vb	: ve benzeri
x	: Temel kromozom sayısı
µl	: Mikro litre
µM	: Mikro mol
µm	: Mikrometre
µm ²	: Mikrometrekare

1. GİRİŞ

Asma (*Vitis* spp.), küresel boyutta sosyoekonomik açıdan en önemli bitkilerinden birisi olup ıslahı yönünde giderek artan bir talep vardır. Aynı zamanda, üzümünden elde edilen ürünlerin çeşitliliği yetiştiriciliğe olan ilgiyi arttırmaktadır. Dünyada 9925972 ha alandan 77137016 ton üzüm üretilmektedir. Çin üzüm üretiminde 17372167 tonla ilk sırayı alırken Türkiye 4100000 ton üretimle altıncı sırada yer almaktadır (Faostat, 2021). 2016 yılında 68 milyar dolar olan üzüm piyasası dünyada domatesten sonra en çok para kazandıran bahçe bitkileri ürünüdür (Alston ve Sambucci, 2019).

Filoksera ile diğer biyotik ve abiyotik stresler nedeniyle bütün dünyada bağcılık asma anaçları üzerinde sürdürülmektedir. Bu maksatla Amerikan orijinli türler saf ya da melez anaçlar olarak kullanılır. Günümüze kadar seleksiyon ve melezleme çalışmalarıyla elde edilen asma anaçları, tüm talepleri karşılayamamışlardır. Çoğu anaç Avrupa'nın kuru yaz iklimi için seçilmiş fakat bu anaçlar Türkiye gibi kireçli ve sık topraklarda, kısa vejetasyonlu bağ alanlarında üretici gereksinimlerini tam olarak karşılayamamaktadırlar.

Asma diğer kültür bitki türleriyle kıyaslandığında en fazla çeşide sahip olduğu düşünülmektedir. Dünyada 25538 asma genotipi ve 1432 asma anacı *Vitis* Database'de yer almaktadır (VIVC, 2021). Dünya genelindeki bağların %90'ında yaklaşık 10 anaç çeşidi kullanılmakta (Keller, 2020), muhtemelen %50'sini Teleki/Kober seleksiyonu anaçlar oluşturmaktadır (Reynolds, 2015). Öte yandan, dünyada farklı iklimlerde ve farklı topraklarda birçok bağ bölge veya lokasyonları bulunmaktadır. Şu anda kullanılan az sayıda anaç çeşidinin, bağcılık yapılan tüm alanların gereksinimlerini karşılaması pek olası değildir (Reynolds, 2015). Ayrıca kullanılan anaçların %88'ini 4 asma türü [*V. berlandieri* (%28), *V. rupestris* (%25), *V. riparia* (%24) ve *V. vinifera* (%11)] veya bunların melezleri oluşturmaktadır (Riaz ve ark., 2019; VIVC, 2021).

Anaç ıslahı Fransa'da (863 asma anacı) başlamış, daha sonra bu ülkeyi İtalya (171 asma anacı) takip etmiştir. Filokseranın oluşturduğu yıkıcı etki ve anaç kullanma zorunluluğu ortaya çıktıktan sonra Almanya, Macaristan ve Çek Cumhuriyeti gibi ülkeler de asma anacı ıslahına başlanmıştır. Çin'de bağlar çoğunlukla aşısız asmalarla tesis edilmiş, bu yüzden Çin anaç ıslahını uzun süre göz ardı etmiştir. Bununla birlikte, son 10 yıldır asma anaçlarının filoksera sorununun üstesinden gelmenin ötesinde abiyotik sorunların çözümüne katkı sunduğunun anlaşılmasıyla Çin ve diğer bazı bağcı

lkeler de asma anacı ıslahı çalışmalarına başlamışlardır (Reynolds, 2015; VIVC, 2021). Örneğin Kore’de asma anacı ıslahı yakın zamana kadar geri planda kalmış olmakla birlikte son 20 yıldır yoğun bir ilgiyle çalışılmaktadır (Yun ve Park, 2007).

Asma heterozigot bir bitkidir ve bu nedenle melezleme ıslahında buğday gibi diğer türlerle karşılaştırılmaz. Heterozigot zm eşitleri melezlendiğinde 274 milyardan fazla farklı olası genotip kombinasyonları oluşmaktadır. Bu muazzam miktar göz önüne alındığında, bir melezleme sonucunun tahmin edilebilir olmadığı açıktır ve belirli kromozom kombinasyonlarına ulaşmak için tam bir şans gereklidir. Doğal genetik çeşitlilikten yeni genotipler elde etmek için mutantlar, melezlemeye kıyasla daha umut vericidir (Reynolds, 2015).

Poliploidi, somatik hücre başına ikiden fazla genom varlığıdır. Genel olarak, poliploit organizma, birden fazla kromozom setine veya aynı türlerde bulunan kromozom setlerinin kombinasyonu veya yakından ilişkili bir diploit türüne sahiptir. Poliploit organizmalar, somatik hücrelerin kromozom kopyaları ile kendiliğinden (mitotik ploid) veya diploit gametlere neden olan homolog kromozomların ayrılmamasıyla, mayozda ortaya çıkabilir (Ramsey ve Schemske, 2002). Poliploidi laboratuvarı yapay olarak, hücre bölünmesini engelleyen mutajen uygulamaları ile de uyandırılabilir. Poliploitlerin, diploitle kıyasla bazı seçici avantajlar sağladığı bilinmektedir. Bunlardan bazıları artan büyüme gücü, artan heterozigotluk, yeni varyasyonlar, yeni genotiplerin elde edilmesi ve allelik alt fonksiyonelleşmeleridir (Salmon ve ark., 2005; Udall ve Wendel, 2006; Abbott ve ark., 2007; Anssour ve ark., 2009; Dar ve ark., 2013).

Poliploit organizmalar genellikle büyüme gücü artışı gösterir ve bazı durumlarda, diploit akrabalarına kıyasla çeşitli açılardan daha iyi performans gösterirler (Sattler ve ark., 2016), çünkü kromozomların poliploidizasyonu genellikle hücre boyutunda bir artışa neden olur. Böylece, poliploit bireyler, karşılık gelen diploitlerden daha büyük organlara (kökler, yapraklar, meyveler vb) sahiptirler. Ancak, artan hücre büyüklüğü her zaman bitki büyüklüğünde genel bir artışa yol açmaz. Örneğin, tetraploit anaçlar diploit akrabalarından daha kalın ve daha kısa köklere sahiptir; kök emiciliğini etkileyen temel faktör olan köklerin yüzey alanı tetraploitlerde diploit orijinlerine kıyasla daha küçüktür, bu nedenle tetraploitler bodur anaç olarak kullanılabilirler.

Tetraploit zm çeşitlerine ilginin artmasıyla birlikte Çin (Chen ve ark., 2014), Güney Kore (Park ve ark., 2006), Japonya (Yamada ve Sato, 2016), Brezilya (Sinski ve

ark., 2014) ve ülkemizde (Kara ve ark., 2018b) poliploit asma anacı ve üzüm çeşidi çalışmaları yapılmaktadır. Ayrıca ıslah edilmiş tetraploit çeşitler diploit anaçlara aşılandığında ortaya çıkan problemlerin çözümü için tetraploit anaçların geliştirilmesine çalışılmaktadır. Bodur poliploit asma anaçları büyüme gücünde azalma sağlayarak bodur anaç gereksinimini karşılamakta, diğer taraftan, diploit çeşitlere anaç olarak kullanıldıklarında yüksek yoğunluklarda bağ tesislerine fırsat verebilecektir (Gao-Takai ve ark., 2017). Ayrıca tetraploit üzüm çeşitlerinin diploit ve tetraploit anaçlara aşılanarak yapılan çalışmalarda, tetraploit anaçlara aşılanan çeşitlerin tane antosiyanin içeriğinin de daha fazla (Gao-Takai ve ark., 2017) ve renklenmesinin daha iyi olduğu (Motosugi ve ark., 2007; Gao-Takai ve ark., 2017) bildirilmiştir.

Kolhisin poliploidi çalışmalarında en çok kullanılan mutajendir. Orizalin, kolhisin ile aynı prensibi izleyen, mitotik mili uygun konsantrasyonlarda depolimerize eden bir herbisittir, daha fazla miktarda poliploit hücreye izin vererek daha yüksek bir verimlilik elde edilebilir (Kosonoy-González ve ark., 2019).

Başarılı bir poliploidi teşviki, antimitotik ajanın etkili penetrasyonunun sinerjik bir eşleşmesini gerektirir ve antimitotik ajanlara maruz kalma süresine ve dozlarına, doku tiplerine, bazal ortam ve bitki büyüme düzenleyicileri ile etkileşimlerine bağlı olabilir (Touchell ve ark., 2020). Doğru uygulama zamanı ve süresi ile N_2O 'nun küçük molekül yapısından dolayı bitkiye kolaylıkla nüfuz ederek poliploidi teşvikini sağlayabilir. Ayrıca N_2O , kolhisin kadar doğaya zararlı da değildir (Kara ve ark., 2018c).

Bu çalışmada, küresel düzeyde asma anacı gereksiniminin karşılanmasına yönelik olarak orizalin ve N_2O gazının farklı doz ve sürelerle 41 B ve Fercal anaçlarının çimlenmiş tohumları ve çeliklerine yapılacak uygulamalarla poliploit asma anaçları elde edilmeye çalışılmış, kimyasal mutajen uygulamalarının morfolojik ve sitolojik etkileri makroskobik, mikroskobik ve sitolojik yöntemlerle incelenmiştir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Asma Anacı

Asmalar, toprak kaynaklı yaprak biti olan filoksera'nın (*Daktulosphaira vitifoliae* Fitch) kendi köklerinde yetişen *Vitis vinifera* L. asmalarını yok ettiği on dokuzuncu yüzyılın sonlarına kadar çeliklerden çoğaltılmıştır. 1868'de Fransa'ya filoksera'nın girmesiyle Avrupa bağları zarar görmeye başlanmış ve bağcılığı kurtarmak için kapsamlı uluslararası araştırma ve iş birliği oluşturulmuştur. Çok sayıda yetiştirici ve bilim adamı, filokseraya karşı tarihi kampanya başlatmışlar ve Avrupa asmalarının Amerikan anaçlarına aşılınmasıyla bu sorunun çözümünün bulunmasında önemli roller üstlenmişlerdir. Bu süreçte birçok araştırmacı yakın zamanda Amerikan *Vitis* türlerinin ve asma anaçlarının çeşitli özelliklerini incelemişlerdir (Galet, 1979; Pongrácz, 1983; Galet, 1988; Hardie ve Cirami, 1990).

Filoksera, Kuzey Amerika'nın doğu ve güney kesimlerinde bulunan yerli asma türleri üzerinde yaşamaktadır. Bu yabancı asmalar arasında, asmanın yaprak ve köklerinde yaşayarak, bazen onları zayıflatan ama asla öldürmeyen ilişkisi vardır. Binlerce yıllık birliktelikle, kökleri böceğin neden olduğu hasara dayanabilen birçok yabancı asma türü geliştirmiştir. Bu asmaların ana savunma mekanizması, köklerinin, beslendiği sırada böceğin neden olduğu yaraları onarmayı başarması ve *Vitis vinifera* asmalarında asıl hasara neden olan bakteri ve mantarlar gibi diğer zararlı organizmaların istilasını önlemesidir. Amerikan yerli asmalarının kökleri, böceklerle hoş gelmeyen bir özsu bulundurmasından dolayı böcekler tarafından uzun süreli kolonileşme için tercih edilmezler. Ayrıca, özsu böceğin beslenme düzeneğini bozar ve böceğin daha iyi bir besin kaynağı aramasına neden olur ve bu da onun çoğalma sürecini bozar veya yavaşlatır. Kısacası, Amerikan asmalarının kökleri hem beslenme hem de üreme açısından böcekler için rahatsız edici bir yuvadır (Skelton, 2020).

Amerikan *Vitis* türlerinin belirli doğal yaşam alanları vardır; çoğu kalıcı bir su kaynağının yakınında (kanyonlar, nehir yatakları, alüvyonlu toprak, akarsular ve nemli ağaçlık alanlar vb) yetişir, ancak bazıları kuru ve kayalık bölgelerde de (kayalık tepeler, kuru yamaçlar, kum tepeleri vb) bulunmaktadır. Doğal habitatları genellikle her türün çevresel koşullara adaptasyonunu yansıtır (Pongrácz, 1983; Galet, 1988; Morano ve Walker, 1995; Padgett-Johnson ve ark., 2003).

Dünya çapındaki bağların %80'inden fazlasında tek bir Amerikan *Vitis* türünün anaçlarına aşılanmış bir *V. vinifera* çeşidi veya ebeveynlerin arzu edilen özelliklerini birleştiren *Vitis* türlerinin seçilmiş melezlerine aşılanmış asmalar kullanılmaktadır (Smith, 2004). Günümüzde kullanılan anaçların çoğunluğu *V. berlandieri*, *V. riparia* ve *V. rupestris* türlerinin melezleridir (Galet, 1998; Whiting, 2005). Sonuç olarak, kültürü yapılan anaçlar genellikle iki genomun bir kombinasyonudur. Anaç genotipi, asmanın kök sistemini, yani toprak altı ortam ile bitki arasındaki bağlantıyı temsil eder. Anaçlar su ve mineral alımından sorumludur ve karbonhidratları depolamada önemli rol oynar. Aşı noktası, sürgün (toprak üstü organlar, yani *V. vinifera* kültür çeşidi) ve kök (toprak altı organlar, yani asma anaçlar) arasındaki ara yüzü tanımlar (Skelton, 2020).

Filoksera emici ağız yapısına sahiptir. Asma kökleri üzerinde nodozite ve tuberozitetler olarak bilinen karakteristik şişkinlikler oluştururlar. Nodozitetler subepidermal kallus formasyonunda oluşan küçük şişkinliklerdir. Filokseranın beslenmesi esnasında salgıladığı maddelerin etkisiyle bitkide büyüme maddelerinin aşırı üretimi sonucu nodozitetlerin oluştuğu sanılmaktadır. Tuberozitetler geniş nodozitetlerdir. Filoksera ile bulaşmış asmalarda, köklerin hassasiyetine bağlı olarak nodozite ve tuberozitetler oluşur ve yeni köklerin oluşumu engellenir. Bu oluşumlar bitkinin su ve mineral alımını büyük ölçüde bozar. Sonuçta asmalar zayıflar ve hatta ölür. *V. vinifera* ve çoğu Amerikan asma anaçlarına kökleri ve yapraklarının filokseraya tepkileri farklıdır. *V. vinifera* türlerinin kökleri, Amerikan asma anaçlarının ise yaprakları filokseraya hassastır (Granett ve ark., 2001; Kara, 2020).

Çok sayıda asma türünün kökleri filoksera besleme bölgelerinin çevresinde mantarimsı bir tabaka oluşturarak yumru gelişimini ve filokseranın yaşamasını engeller (Boubals, 1966). *V. riparia* ve *V. rupestris* gibi türler bu tepkiyi gösterirken, bazı türler ise (*V. rotundifolia*, *V. berlandieri* ve *V. cinerea*) başka tipte antibiyozlar (zararlı sağlığının azalması veya iki organizma arasında, birinin olumsuz etkileyen antagonistik ilişki) gösterir (Granett ve ark., 2001). Mantar tabakasının tetikleyicileri ve neden sadece bazı türlerde oluştuğu bilinmemekle (Granett ve ark., 2001) birlikte *Vitis* türlerinin filokseraya karşı direnci büyük olasılıkla birkaç genle ilişkilidir (Boubals, 1966). Bu direnç, kök korteksinin anatomik özgünlüğü ile bağlantılı da olabilir (Davidis ve Olmo, 1964).

Filokseraya karşı anaç direnci oldukça sürdürülebilir olmasına rağmen, filokseranın suşları arasındaki karmaşıklık ve genetik değişkenlik aralığı, filokseraya

dayanıklı anaçlarda oluşabilecek yeni suşlara hassasiyet potansiyeli olduğunu ortaya koymuştur (Powell, 2008).

Filokseraya ek olarak, anaçlar nematodlar gibi diğer toprak kaynaklı zararlıların kontrolüne ve kuraklık, tuzluluk, kireç ve mineral beslenme sorunları gibi çeşitli abiyotik kısıtlamalara yanıt verilmesine katkıda bulunur. Ayrıca tüm bitki gelişimini, biyokütle birikimini ve yeniden bölünmesini ve fenolojiyi de değiştirirler. Bütün bitki performansları üzerindeki etkileri, yapısal (kök morfolojisi) ve fizyolojik özellikleri ile ilişkilidir. İklim değişikliği bağlamında, adaptasyonun kilit bir unsuru olarak kabul edilebilirler (Ollat ve ark., 2015).

2.2. Poliploidi

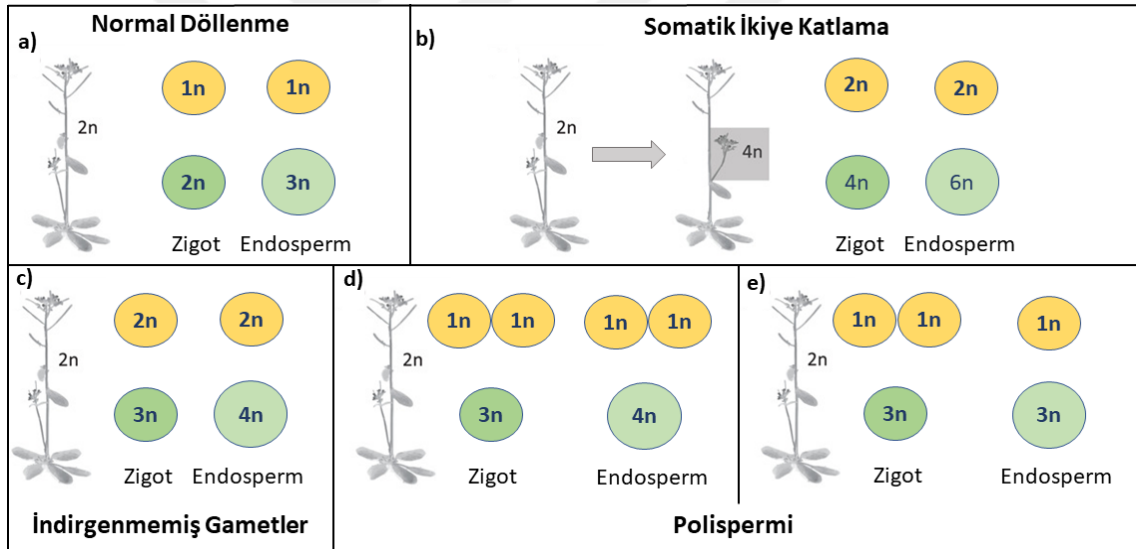
Poliploidi son 350 milyon yıldan beri bitkilerin evrimine eşlik ettiği bilinmektedir (Vision ve ark., 2000; Bowers ve ark., 2003). Poliploitler, yeni oluşan habitatların başarılı istilacıları olarak bilindiğinden, açık tohumluların mesozoik dönemin sonuna doğru (yaklaşık 65 milyon yıl önce) büyük düşüş ve yok oluşuyla birlikte yerini odunsu kapalı tohumluların yeni oluşan poliploitlerine bıraktığı varsayılmaktadır (Stebbins, 1950).

İngiliz Kewscience bitki DNA C-değeri veri tabanına göre, kapalı tohumlu bitkiler içinde dünyada doğal olarak 7379 adet türün farklı ploidi seviyesine sahip olduğu bilinmektedir. Bu türler sırasıyla $2n$ (5129 adet), $3n$ (178 adet), $4n$ (1339 adet), $5n$ (39 adet), $6n$ (405 adet), $7n$ (9 adet), $8n$ (170 adet), $9n$ (13), $10n$ (43 adet), $11n$ (2 adet), $12n$ (29 adet), $14n$ (5 adet), $15n$ (1 adet), $16n$ (9 adet), $18n$ (1 adet), $19n$ (1 adet), $20n$ (2 adet), $22n$ (1 adet), $24n$ (1 adet), $26n$ (1 adet) ve $38n$ (1 adet) olarak belirlenmiştir (Kewscience, 2022).

Bitkilerde birçok kendiliğinden poliploidi oluşturma yöntemleri vardır. Bunlar, mitoz sırasında somatik dokunun ikiye katlanması, gametik indirgenememe ve polispermidir. Somatik ikiye katlanma, tamamen poliploit birey elde etmek için veya bazı apikal meristemlerde lokal olarak poliploit kimeralar oluşturmak için bir zigot veya genç embriyoda meydana gelir (Ahloowalia ve Garber, 1961; Hiesey ve ark., 1971). Birden fazla kromozom setine sahip gamet oluşumuna neden olan mitotik veya mayotik düzensizlikler poliploit bitkiler oluşumuna neden olur. Nadiren oluşan diploit gametler, haploit gametlerle birleşir ve triploit zigotları oluşturur. Bunlar kararsızdır ve steril olabilir veya poliploit gametler oluşturabilir (Şekil 1). Poliploidinin poliembriyonik

tohumlardan da kaynaklandığı bilinmektedir (Webber, 1940). Mikro ve mega sporogenez sırasındaki gametik azalma, poliploit oluşumunun ikinci ana yöntemidir. Bir yumurtanın birden fazla sperm çekirdeği tarafından döllenmesi olan polispermi, birçok bitkide gözlenir, ancak poliploit oluşumu için bir mekanizma olarak katkısı, bazı orkideler dışında oldukça nadirdir (Ramsey ve Schemske, 2002).

Poliploidi, yüksek bitkilerin evriminde önemli bir rol oynamıştır (Leitch ve Bennett, 1997). Başlangıçta poliploitlerin tek bir kökene sahip olduğu düşünülmekte ve bir türün tüm bireyleri arasında genetik tekdüzelik olduğu varsayılmaktaydı. Son moleküler biyoloji tekniklerinin, özellikle de DNA markörlerinin uygulanması, tek bir poliploit türünün birden fazla kökene sahip olabileceğini göstermiştir, bu da poliploitlerde tek kökene göre daha fazla varyasyon oluşturduğunu ortaya koyar (Soltis ve Soltis, 1993; Soltis ve ark., 1993; Leitch ve Bennett, 1997; Soltis ve Soltis, 1999; Doyle ve ark., 2004; Soltis ve ark., 2004; Martelotto ve ark., 2007).



Şekil 2.1. Bitkilerdeki doğal poliploidi oluşturma yöntemleri (Tekleyohans ve Groß-Hardt, 2020'dan uyarlanmıştır). (a) Normal döllenme sırasında, bir haploit sperm (sarı), sırasıyla bir diploit embriyo ve triploit endosperm oluşturmak için bir haploit yumurtayı ve polar çekirdekleri döller. (b ve c) hücre döngüsü kusurları nedeniyle oluşan somatik katlanma (b) veya gametlerin indirgenmemesine (c) neden olabilir. (d ve e) halen, polisperminin her iki gamete de babadan gelen ekstra polenler sağlayıp sağlamadığı (d) veya seçici yumurta hücresi poliploidizasyonunun mümkün olup olmadığı (e) belirsizdir.

Poliploidi yapay olarak farklı yollarla oluşturulmaktadır (Ramsey ve Schemske, 1998). Tetraploitler, iki indirgenmemiş (2n) gametin birleşmesi veya somatik ikiye katlama ile doğrudan bir diploit popülasyonda oluşturulur (Tekleyohans ve Groß-Hardt, 2020).

Poliploit bitkiler otopoliploitler, allopoliploitler, segmental poliploitler ve oto-allopoliploitler olmak üzere dört ana tiptedir (Stebbins Jr, 1947; Rehman, 2017)

(Çizelge 1). Otopoliploitler geleneksel olarak, yapısal olarak benzer homolog genomların (AAAA) iki katına çıkmasıyla tek bir tür içinde ortaya çıktığı düşünülürken, allopoliploitler, türler arası hibridizasyon ve ardından homolog olmayan genomların (AABB) iki katına çıkmasıyla ortaya çıkar (Parisod ve ark., 2010). Bunların tanımları ve sınırları tartışmalı olmakla birlikte (Lewis, 1980; Jackson, 1982; Soltis, 1984; Levin ve Donald, 2002; Ramsey ve Schemske, 2002; Bennett, 2004; Tate ve ark., 2005), taksonomik tanımları takiben, otopoliploitlerin genellikle tek bir türden türetildiği düşünülür, allopoliploitler iki tür arasındaki melezlemeyle elde edilir. Angiospermilerin doğal popülasyonlarında allopoliploidi uzun zamandır otopoliploididen daha önemli olduğu kabul edilmiştir (Soltis ve ark., 1993; Soltis ve Soltis, 1999; Soltis ve Soltis, 2000).

Segmental allopoliploitler, kromozom eşleşmesi sırasında bivalentlere ve multivalentlere yol açan iki veya daha fazla kısmen farklı genomdan oluşur. Oto allopoliploitlerde, hem oto hem allopoliploitler bir araya gelir (Stebbins Jr, 1947).

Çizelge 2.1. Poliploidinin tanımlanması (Rehman, 2017)

Tip	Açıklama	Genomik yapı	Örnek
Otopoliploit	Birden fazla aynı genom kümesine sahip olan bir poliploit	AAAA	<i>Solanum tuberosum</i> , <i>Zea perennis</i>
Allopoliploit	Birden fazla farklı genom kümesine sahip olan bir poliploit	AABB	<i>Triticum aestivum</i> , <i>Gossypium hirsutum</i>
Segmental allopoliploit	Birden çok benzer fakat aynı genom grubuna sahip olan bir poliploit	A ₁ A ₁ B ₂ B ₂	<i>Aesculus carnea</i> , <i>Delphinium gypsophilum</i>
Oto allopoliploit	Otopoliploidi ve allopoliploidi kombinasyonu ile elde edilen bir poliploit	AABBBB	<i>Helianthus tuberosus</i>

Bitkilerde poliploidi teşviki, yeni bitki karakterleri geliştirmek amacıyla kullanılmakla beraber araştırmacılar için yeni bir konu olarak kabul edilmektedir (Cheng ve Korban, 2011; Dhooghe ve ark., 2011). Poliploidi teşviki için kullanılan farklı yöntemler vardır. Bunlardan ilki radyasyonun kullanılmasıdır. Poliploidi teşviki için çok kısa dalga boylu ışınlar, örn. X ışınları, gama ışınları ve ultraviyole ışınları kullanılmıştır (Breslavetz, 1939; De Nettancourt ve ark., 1971; Särkilahti, 1988). Bitkide çiçek tomurcukları gibi bitki kısımları kısa süreyle radyasyona maruz kalabilir. Işınlama, somatik hücrelerde veya hızlı bölünmekte olan hücrelerde kromozomların ikiye katlanmasına neden olabilir.

Poliploidi teşviki için birçok çalışmada düşük ve yüksek sıcaklık şokları da kullanılmıştır. *Datura stramonium*'nın zigotik aşamada soğuk ile muamele edilmesi

(Belling ve Blakeslee, 1924b; Belling ve Blakeslee, 1924a) ve *Zea mays*, *Hordeum vulgare* L., *Oryza sativa*, *Triticum*, *Melilotus officinalis* (L.) Lam., *Capsicum* ve *Populus* 'ta sıcaklık şoku uygulamaları poliploidi teşviki için denenmiştir (Randolph, 1932; Matusima, 1935; Atwood, 1936; Dorsey, 1936; Peto, 1938; Kang ve ark., 2000; Zhang ve ark., 2002; Wang ve ark., 2012; Lu ve ark., 2013; Li ve ark., 2017).

Bitki hücrelerinin bir totipotensi (her canlı hücrenin meydana geldiği organizmanın bütününe meydana getirme potansiyeli) özelliği vardır. Bitki, genellikle kısmi meristematik bölge yaralanmaları sonrasında o noktadaki hücreler hızla çoğalır ve bir kallus oluşturur. Bitkiler tarafından üretilen kimyasal bir bileşik olan kumarin, kallus büyümesini teşvik ederek kromozomların somatik olarak iki katına çıkmasına neden olur. Kallustan geliştirilen vejetatif tomurcuklar genellikle poliploitlerdir. Bu yöntem, Tetraploit *Solanum* ve *Nicotiana* elde edilmesi için de kullanılmıştır (Rehman, 2017).

Daha büyük boyutlu indirgenmemiş diploit polenler, ince cam tüplerle toplanabilir ve tozlama için kullanılabilir. Pratassenja (1939) bu yöntemi şeftalilerde kullanmıştır. Son zamanlarda, Yao ve ark. (2017) kauçuk ağacı klonu RRIM 600'de yüksek sıcaklık kullanarak indirgenmemiş polen elde etmiştir.

Bazı yosun ve eğrelti otlarında poliploidi, bir gametofiti yeniden elde etmek için sporofitten diploit bir doku kullanılarak elde edilebilir. Tetraploit sporofit, normal eşeyli üreme sürecinde diploit gametofitlerden elde edilebilmektedir (Rehman, 2017).

Bitkilerde poliploidi teşviki için kolhisin, orizalin, trifluralin ve amipropos-metil gibi çeşitli kimyasallar da kullanılmaktadır (Blakeslee ve Every, 1937; van Tuyl ve ark., 1992; Bouvier ve ark., 1994; Dewitte ve ark., 2010; Podwyszyńska ve ark., 2011). Bunlar arasında en çok kullanılan kimyasal ise kolhisindir (Rogalska ve ark., 2007; Dhooghe ve ark., 2011). Orizalin gibi herbisitler, düşük konsantrasyonlarda kullanılabilir ve insanlar için kolhisine göre daha az toksiktir (Dhooghe ve ark., 2011). Orizalinin bir başka potansiyel avantajı, NaOH veya etanolde çözülebilmesidir; kolhisin, bitki dokusuna daha fazla zarar veren DMSO içinde çözünür (Hamill ve ark., 1992). Kolhisin veya orizalin uygulamalarının bir sonucu olarak kromozomun iki katına çıkma etkinliği çeşitli türlerde karşılaştırılmıştır. Orizalinin *Lilium* ve *Nerine*'ye (Cornish Zambağı) yapılan uygulamalarda kolhisine kıyasla daha etkili, daha az fitotoksik ve daha çok tercih edilen bir alternatif olduğunu bildirmişlerdir (van Tuyl ve ark., 1992). *Helleborus*'a (Düğün Çiçeğigiller) yapılan bir uygulamada ise kolhisin

kromozom katlamada etkisiz kalırken, orizalin tetraploit oluşumunu teşvik etmiştir (Dhooghe ve ark., 2011).

Yapay poliploitlerin üretimi için N_2O da kullanılmaktadır. Bu yöntemde poliploit zigotlar ve proembriyolar (tozlanmadan 24-48 saat sonra) azot oksit (3-6 atmosfer N_2O) muamelesiyle elde edilir. Tozlanan çiçek alınır ve 5 ila 24 saat boyunca sıvı besiyeri içeren şişelere yerleştirilir. Bu yöntem *Crepis capillaris* (Östergren, 1954), *Phalaris* (Östergren, 1957), *Melandrium* (Nygren, 1955), buğday ve arpa (Dvorak ve ark., 1973), *Trifolium* (Taylor ve ark., 1976), *Zea mays* (Kato ve Geiger, 2002) ve hibrid zambaklar (Akutsu ve ark., 2007; Kitamura ve ark., 2009) dahil birçok bitkide kullanılmıştır.

Poliploidi çalışmalarında standart kimyasal olarak kullanılan kolhisin, çok toksik olup özel koşullarda uygulanması gerekir. Buna karşılık, N_2O basit bertaraf gereksinimlerine sahip, nispeten güvenli bir gazdır. Herbisitler ve kolhisinin aksine, N_2O özel bir imha gerektirmez ve iyice havalandırılan bir alanda atmosfere salınabilir, ancak büyük miktarlarda serbest bırakılmasından kaçınılmalıdır (The Linde Group, 2011).

Mikrotübüllerin birincil bileşenleri olan tubulinler, hücre içi bileşenlerin uzaysal organizasyonu, bölümlerin dinamik dağılımı ve ökaryotik hücre formunun oluşturulması ve sürdürülmesi gibi temel süreçlerde doğrudan yer alır (Mandelkow ve Mandelkow, 1995; Nogales, 1999). Tübülünün işlevi ve aktivitesi, hücre içi lokalizasyonuna bağlıdır. Bununla birlikte, daha eksiksiz bir anlayışa yönelik son çabalar, tübülün moleküllerinin üç boyutlu (3-D) yapısı üzerine yapılan çalışmalardan gelmiştir (Nogales, 2001). Bu yapısal araştırmalardaki ilerleme, büyük ölçüde hayvan tübülünün 2 boyutlu kristalin tabakalarının kullanımına dayanmaktadır (Nogales ve ark., 1995). Farklı çalışmalardan elde edilen tübülün dizileri hakkında geniş bir bilgi yelpazesinin varlığı ve kristalografik çalışmalardan yakın zamanda elde edilen sonuçların (Nogales ve ark., 1998; Amos, 2000), bilgisayar modellemesinin avantajlarını vurgulamaktadır. Bu protein ailesinin uzaysal yapısı, bitki tübülünleri (Nyporko ve Blume, 2001) dahil olmak üzere incelenmiş (Gogonea ve ark., 1999) ve tübülün moleküllerinin işlevsel olarak önemli özellikleri gösterilmiştir. Bu bilgilerin önemi ve gerekliliği aşağıdaki faktörlerle açıklanmıştır. Örneğin, çeşitli bileşiklerin önemli uygulaması olan herbisitler, fungusitler, antikanser ve anti-helminetik ilaçların etki mekanizması, bu ajanların doğrudan tübülün molekülleri ile etkileşime girme yeteneğiyle ilgilidir (Morejohn ve Fosket, 1991; Strashnyuk ve Blume, 1993).

Düşük moleküler ağırlıklı tübülün bağlayıcıları arasında dinitroanilin, fosforoamidat ve N-fenil karbamat gibi herbisitler, hayvan tübülünlerinden ziyade bitki tübüllerine yüksek özgüllüğe sahip bileşiklerdir (Anthony ve Hussey, 1999; Yemets ve Blume, 1999; Baird ve ark., 2000; Breviario ve Nick, 2000). Bu dinitroanilinlere dirençli mutant, fosforo amidatlara çapraz direnç gösterir (Vaughn ve ark., 1987) ve daha önce kimyasal olarak farklı bu iki anti-mitotik herbisit sınıfının aynı reseptör bölgesine/bölgelerine bağlandığı öne sürülmüştür (Ellis ve ark., 1994).

Bitkilerin poliploidizasyonu üzerine deneyler, kolhisinin yüksek bitki hücrelerinde kromozom aktivitesini ikiye katladığının keşfedildiği 1940 yılında başlamıştır (Hancock, 1997). 1979'a kadar 150'den fazla bitki türünün kromozom sayısı kolhisin kullanılarak iki katına çıkarılmakla birlikte (Dewey, 1980) az sayıda poliploit bitki türü piyasaya sürülmüş ve daha da azı dünya pazarında yer edinebilmiştir (Hancock, 1997).

Kolhisin bitki hücreleri üzerinde güçlü bir toksik etkiye sahip olup bitkilerin çoğalmasını ve kromozom setinin stabil olarak yenilenmesini engeller ve kimerik bitki oluşumunu teşvik eder. Dinitroanilinler gibi bileşiklerin potansiyel mutajen maddeler olarak test edilmesinin ana nedeni budur (Mitrofanova ve ark., 2003). Kolhisin ile benzer bir anti-mikrotübül aktivite moduna sahiptirler, ancak daha az toksiktirler çünkü bitki tübüllerine yüksek düzeyde spesifik bir bağlanma yeteneğine sahiptirler ve düşük konsantrasyonlarda mikrotübülü etkili bir şekilde depolimerize ederler (Morejohn ve Fosket, 1991).

Çeşitli dinitroanilinlerin (orizalin, ethalfluralin, trifluralin, pendimetalin ve benefin) kolhisin ile karşılaştırmalı olarak poliploidizasyon etkileri incelenmiş ve poliploit uyarımındaki başarıları kanıtlanmış, kolhisine göre daha yüksek poliploidizasyon potansiyeli belirlemişlerdir (Mitrofanova ve ark., 2003).

1990'larda dikkatler, *in vitro* kromozom katlamayı daha da iyileştirebilecek kolhisin dışındaki kimyasallara yöneldi, antimikrotübül herbisitler, kolhisin ile karşılaştırılabilir mikrotübül engelleyicileri olarak rapor edildiler (Yemets ve Blume, 2008).

Hansen ve Andersen (1996) yaptıkları çalışmalarda, kolhisin ve mikrotübül depolimerize edici herbisitler olan orizalin, trifluralin ve amiprofosmetilin (APM) *Brassica napus* mikrospor kültüründe *in vitro* kromozom katlama potansiyelini inceleyerek her üç herbisitin de yaklaşık 100 kat daha düşük konsantrasyonlarda kolhisine benzer etki gösterdiğini belirlemişlerdir.

Orizalin, APM ve kolhisinin kullanıldığı patates (Ramulu ve ark., 1991) ve *Quercus suber* L. (Pintos ve ark., 2007) poliploidi çalışmalarında orizalinin diğer iki mutajenden daha etkili olduğunu bildirmişlerdir.

Düşük dozlarda kullanılan orizalinin düşük fitotoksitesitesi ve uzun vadeli etkileri ve genetik bozuklukların olmaması nedeniyle kolhisine göre daha üstün kabul edilebileceği öne sürülmüştür (Tosca ve ark., 1995; Väinölä, 2000).

Kolhisin ana etki mekanizması, mikrotübülleri bozarak kromozom indirgenmesini bloke etmesi ve iğsi mikrotübüllerin kolhisine interfaz mikrotübüllerinden daha duyarlı olmasıdır (Bhattacharyya ve ark., 2008). *In vitro* çalışmalarda dinitroanilinler ve fosforotiyoamidatlar gibi antimikrotübül bileşikler kolhisine göre bitki tübülüne daha spesifik olarak bağlanır (Bajer ve Mole-Bajer, 1986). Kimyasal olarak farklı bu iki antimitotik herbisit in aynı reseptör bölgelerine bağladığı bildirilmiştir (Ellis ve ark., 1994).

Eleusine indica'nın dinitroanilin ve fosforotiyoamidat herbisit biyotiplerine karşı iyi karakterize edilmiş duyarlı ve dirençli tübülün dizileri vardır (Blume ve ark., 2003). Daha önce, bu direncin, α 1-tubulin molekülünün 239. pozisyonundaki bir nokta mutasyonundan kaynaklandığı ve bunun sonucunda Thr amino asidinin Ile ile yer değiştirmesiyle sonuçlandığı gösterilmiştir (Yamamoto ve ark., 1998; Anthony ve Hussey, 1999). Thr239 kalıntısının bilinen tüm mantar, bitki ve hayvan α -tubulinlerinde yüksek oranda korunduğuna ve mutasyon bölgesini çevreleyen dizilerin analizi sonucunda tüm bitki α -tubulinlerinde aynı olmasa da bunların da korunduğu öne sürülmüştür (Yemets ve Blume, 2008).

Poliploidi dünyadaki türlerin ve bazen de cinslerin sayısının muazzam bir şekilde artmasına yardımcı olmuştur. Radikal olarak farklı fakat güçlü ve iyi uyum sağlamış genotipleri elde etmenin bilinen en hızlı yöntemidir (Stebbins, 1950), bu nedenle bitki ıslahında, daha da önemlisi allopoliploidide büyük değer taşır. Bitkiler aleminde poliploidi, buğday, şeker kamışı, yulaf, pamuk, tütün, elma, armut, erik, *Rubus* vb gibi önde gelen ticari ürünler de dahil olmak üzere kapalı tohumlular arasındaki yüksek oranda çalışılmaktadır. Poliploidi heterosis, gen fazlalığı ve eşeysiz üreme gibi bazı önemli avantajlar sağlar (Comai, 2005).

Heterosis veya hibrit gücü, iki diploit atadan elde edilen poliploit bitkinin iki ebeveyninden de daha güçlü olmasıdır ve farklı yollarla oluşabilir. Bunlardan biri, orijinal ebeveynlerin genomları arasındaki rekombinasyonu önleyen bir allotetraploit içindeki homolog kromozomların zorunlu eşleşmesidir. Böylece nesiller boyunca

heterozigotluğu etkin bir şekilde korur. Bu heterozigotluk, sonraki nesillerin genomlarında çekinik mutasyonların birikmesini engeller ve böylece hibrit gücünü korur (Comai, 2005). Heterosis, allopoliploidlerin kalıcı bir özelliğidir; genellikle allopoliploidlerde yüksektir ve otopoliploidlerde yoktur. Baskın veya aşırı baskın gen eylemleri heterosisin genetik temeli olduğu tahmin edilmektedir (Chen, 2010).

Hücrelerin boyutundaki artış, poliploidinin birincil etkisidir. Poliploidiyle birlikte genom ikiye katlanır ve hücre hacmi artar. Bunun nedeni hücre hacminin hücre çekirdeğindeki DNA miktarıyla orantılı olmasıdır. Bir hücrenin genomunun iki katına çıkarılmasıyla çekirdekteki kromozomların kapladığı alandaki hacminin iki katına çıkması beklenir, ancak çekirdek zarının yüzey alanında yalnızca 1.6 kat artışın olduğu bilinmektedir (Melaragno ve ark., 1993). Bu durum normalde kromozomlar ve zara bağlı proteinler dahil olmak üzere çekirdek bileşenleri arasındaki etkileşime aracılık eden faktörlerin dengesini bozabilir. Ayrıca tüm kromozomların kopya sayısındaki artış, tüm genleri eşit olarak etkiler ve gen ifadesinde tek tip bir artışla sonuçlanmalıdır. Ancak bazı genlerin ploidi ile orantılı olarak değişmeyen düzenleyici faktörlere yanıt verdikleri için bu varsayımdan sapmaları mümkündür (Comai, 2005). Yapılan bir çalışmada 1x, 2x, 3x ve 4x mısırdaki 18 gen için genom başına mRNA seviyeleri karşılaştırılmıştır. Çoğu genin ekspresyonunun ploidi ile artmasına rağmen, bazı genlerin ekspresyonunda sapmalar tespit edilmiştir. Örneğin, sakaroz sentazın 2x ve 4x dokularda beklenen oranda ekspresyon gösterdiğini ancak 1x ve 3x dokularda ekspresyonun sırasıyla üç ve altı kat daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Guo ve ark., 1996). Poliploidinin en göze çarpan dezavantajlarından iki tanesi ise otopoliploidlerde diploid atalarına kıyasla polen ve tohum canlılığının azalmasıdır (Stebbins, 1950).

Poliploidizasyonun fenotip üzerinde doğrudan etkisi vardır. Kromozomun ikiye katlanması, mikro evrimsel zaman içinde popülasyonlarda bazı ani, aşırı ve göze çarpan değişiklikler getirir (Levin, 1983). Genom ikiye katlanmasının en yaygın etkisi hücre hacminin artmasıdır. Bu durum çevre koşullarına bağlı olarak da değişebilir. Genellikle stoma boyutu başlangıçta ploidi seviyesinin dolaylı bir ölçüsü olarak kullanılmaktadır. Polen çapı da ploidi tespit etmek için kullanılır. Hücre hacmindeki değişiklikler, özellikle zarlardaki metabolik süreci değiştirebilir (Cavalier-Smith, 1978).

Ülkemizde asmanın mutasyonuna dayalı ıslah çalışmaları yeni olmasına rağmen çok sayıda araştırma yapılmıştır. İlk mutasyon ıslahı çalışmaları Co60 uygulamaları ile başlamıştır (Çoban, 1998; Marasalı ve ark., 2003; Ekbiç, 2010). Daha sonra kolhisin (Kara ve ark., 2018a; Kara ve ark., 2018b; Kara ve Yazar, 2021), orizalin (Pehlivan,

2020; Kara ve ark., 2021) ve N₂O (Kara ve ark., 2021; Özer, 2021) mutajenleri mutasyon ıslahında kullanılmış ve bu çalışmalardan poliploid asma genotipleri elde edilmiştir.

2.3. Ploidi Belirleme Yöntemleri

Poliploidi seviyesini belirlemek için kromozom sayımları, FC analizi, morfolojik veya anatomik parametreler gibi birçok yöntem bulunmaktadır. Kromozom sayımı, etkin kromozom sayısı belirlendiği için ploidi seviyesini belirlemede en somut yöntemdir (Doležel ve ark., 2007). Bununla birlikte, kök ucu veya sürgün hücreleri üzerinde bitkiye özgü enzimatik uygulamalar ve mikroskopi içeren bu yöntem çok zahmetlidir. Sonuç olarak, yalnızca sınırlı sayıda hücre analiz edilebilir (Bohanec, 2003). Ayrıca, birçok küçük kromozomu sayarken hatalar yapılabilir.

FC, bitki ploidi analizini belirlemek için kullanılan yaygın bir tekniktir (Eeckhaut ve ark., 2005; Doležel ve ark., 2007). FC analizi, hücre çekirdeklerinin jiletle kesme (Galbraith ve ark., 1983) veya boncukla dövme (Roberts, 2007) işleminden sonra DNA boyama yapılarak bir FC cihazıyla yapılmaktadır. Bu cihaz, hidrodinamik odaklama ile çekirdekleri hizalar, boyalı çekirdekleri aydınlatmak için bir ışık kaynağı kullanır ve yayılan flüoresansı algılar. Her çekirdekteki flüoresans miktarı, DNA içeriği ile ilişkilidir. Numuneler toplu olarak çalıştırılabilir ve tek bir çalıştırmada on binlerce hücre sayılabilir. Boncukla döverek yüksek verimli numune hazırlama (Roberts, 2007) ve mikrotitre plakalarda analizle (Cousin ve ark., 2009) ilgili son gelişmeler, analiz maliyetini arttırmaktadır. FC, poliploidizasyon için mikroskobik sayımlara kıyasla çeşitli avantajlara sahiptir. Kromozom sayımı, heterojen bir hücre popülasyonunun temsili bir resmini sağlayamazken (Doležel ve ark., 2007), FC, ploidi testi için hızlı bir yöntem olup çok sayıda bitkinin incelenmesini ve farklı doku veya hücre katmanlarının analizini sağlamaktadır (Leus ve ark., 2009). DNA içeriğini doğrudan ploidi sayılarıyla ilişkilendirir. Ayrıca FC analizi, taze köklere veya ortama alıştırılmış bitkilere ihtiyaç duymaz ve bu nedenle kromozomu katlanmış bitkilerin çok erken bir aşamada teşhisini sağlar. Yer ve zamandan tasarruf etmek için erken teşhis poliploidi çalışmalarında çok önemlidir (Väinölä, 2000).

Kromozom katlamasını belirleyen morfolojik ve anatomik gözlemler basittir ancak çoğu zaman kesin sonuçlar vermez (Brummer ve ark., 1999; Zlesak ve ark., 2005). En sık kullanılan özelliklerden bazıları stoma yoğunluğu ve stoma boyutlarıdır.

Stoma özelliklerinin belirlenmesi basittir ve pahalı aletler gerektirmez (Tal, 1980; Cohen ve Yao, 1996). Diploit bitkiler kromozomu katlananlara kıyasla daha küçük stomalara sahip olma eğilimindedir (Hodgson ve ark., 2010). *Chaemomeles japonica* (Stanys ve ark., 2006), *Pyrus communis* (Sun ve ark., 2009), *Pyrus pyrifolia* (Kadota ve Niimi, 2002), *Vitis vinifera* (Yang ve ark., 2006) ve *Musa* (Hamill ve ark., 1992) türlerinde kromozomu katlanmış bitkilerin orijinal diploitlerine kıyasla daha büyük stomalara sahiptir. Boyutun yanı sıra stoma yoğunluğu da poliploit bitkilerde değişmektedir. *Vitis vinifera* (Yang ve ark., 2006), *Morus alba* (Chakraborti ve ark., 1998), *Lagerstroemia indica* (Zhang ve ark., 2010), *Pennisetum* (Campos ve ark., 2009) türlerindeki poliploit bitkilerde stoma boyutlarındaki artışın aksine stoma yoğunluklarında azalma tespit edilmiştir.

Poliploit bitkileri tespit etmede kullanılan bir başka stoma özelliği, stoma bekçi hücresi başına kloroplast sayısıdır ve tetraploit bitkiler orijinal diploitlere kıyasla daha yüksek kloroplast sayısına sahiptir. Stoma bekçi hücrelerindeki kloroplast sayısının dut (Chakraborti ve ark., 1998), *Lagerstroemia indica* (Zhang ve ark., 2010), kavak ve kara akasya (Ewald ve ark., 2009) ve *Vitis vinifera* (Kara ve ark., 2018b) bitkilerinde ploidi düzeylerini belirlemek için kullanılmıştır.

Polen boyutunun ploidi düzeyine göre değişiklik gösterdiği bilinmektedir (Cohen ve Yao, 1996; Chauvin ve ark., 2005; Dewitte ve ark., 2009). Bununla birlikte, polen boyutu tespiti nadiren kromozom katlamayı doğrulamak için kullanılır.

Klorofil, bitki büyüme ve gelişimini araştırmak için sıklıkla fizyolojik bir indeks olarak kullanılan en önemli parametrelerden biridir. Genel olarak, tetraploidin klorofil değeri, orijinal diploitlerinden anlamlı olarak daha yüksektir (Rao ve ark., 2019). *Lilium* (Fu ve ark., 2019a) *Lycium ruthenicum* (Rao ve ark., 2019) ve *Rhododendron fortunei* Lindl (Mo ve ark., 2020) tetraploit bitkilerinin klorofil içeriği orijinal diploitlerine kıyasla önemli artışlar gösterdiği bildirilmiştir.

Bir başka poliploit bitki tespit etme yöntemi yaprak kalınlığıdır. Tetraploit bitkilerin orijinal diploitlerden daha geniş ve kalın yapraklara sahip olduğu bilinmektedir (Rao ve ark., 2019). Tetraploit Çin kavağı (Lu ve ark., 2014), kavak (Zeng ve ark., 2019) ve karpuz (Bae ve ark., 2020) bitkilerinin yaprak kalınlığı diploitlere kıyasla daha kalındır.

Klasik tek değişkenli ve çok değişkenli istatistikler, bitki ıslahı ve biyoteknoloji çalışmalarında veri analizi için kullanılan en yaygın yöntemlerdir fakat öğrenen makine teknikleri, "çoklu bağımsız değişkenlere karşı çoklu bağımlı değişkenler" doğasına

sahip büyük miktarlarda karmaşık ve belirleyici olmayan bilgilerin işlenmesinde klasik istatistiksel modellerden daha etkilidir. Kromozom mühendisliği çalışmalarında (poliploidi ve haploit teşviki), ploidi seviyesini belirlemek en önemli adımlardan biridir ve FC gibi öğrenen makinaların kullanımı poliploidi ıslahı çalışmalarında büyük kolaylık sağlamaktadır (Niazian ve Niedbała, 2020).

2.4. Anaç Islahı

Geleneksel asma ıslahı, özelliklerin karmaşıklığı ve yaklaşık 25 yıllık uzun ıslah süreci nedeniyle ıslahçılara büyük zorluklar oluşturur. Asma özelliklerini genetik olarak incelemek için QTL analizi ve moleküler markerlar gibi yeni teknolojiler geliştirilmiş ve ıslah programlarına dahil edilmiştir. Bu yeni araçlar ve yeni nesil dizileme teknolojileri, ıslah süreçlerini 10 yıla kadar kısaltacak ve genetik mühendisliği gibi alanlar mevcut çeşitlerin iyileştirilmesi için ıslahçılara kolaylık sağlayacaktır (Töpfer ve ark., 2011). Ayrıca Trenti ve ark. (2018) asma anacı ıslahında strese duyarlı genlerin ekspresyonunu farklı zamanlarda yapraklardan ölçerek asma anacı ıslahına yeni yöntemler kazandırmayı amaçlamışlardır. Salama ve ark. (2020), RAPD tekniğiyle asma ıslahında mutasyonun kullanımını desteklemekte ve asma genotipleri arasındaki mutasyonları ve genetik çeşitliliği tespit etmek için önemli bir araç olarak kullanılmaktadırlar. De Rosa ve ark. (2021), anaç ıslahı çalışmalarında genom çapında ilişkilendirme, marker destekli seçim, genetik haritalama, yabani asma türleri, somatik varyasyon ve germplazm koleksiyonunun kullanılması gerektiğini bildirmişlerdir.

Germplazm bankalarının yönetimi, özellikle birçok katılım söz konusu olduğunda karmaşık olduğundan mikrosatellit markerları, ıslah programlarında kullanımlarını optimize ederek, germplazm koleksiyonlarının genetik çeşitliliğini değerlendirmek için etkili bir araçtır. Polimorfik mikrosatellit markerlar asma germplazmının yönetimini kolaylaştırabilir ve sofralık, şaraplık, kurutmalık ve anaçlık özelliklerinin geliştirilmesini kolaylaştırmak için genetik çeşitliliğin verimli bir şekilde kullanılmasına rehberlik eder (de Oliveira ve ark., 2020).

Bağcılığının uzun geçmişi düşünüldüğünde, üzüm üretiminde anaçların kullanımı nispeten yenidir ve bir endüstrinin temel dayanak izleri olarak anaç ıslahı ve uygulanması için katalizör noktası Avrupa filoksera krizidir. Filoksera (*Daktuloshpairoa vitifoliae*) 1845'te Avrupa'ya girmiş ve Avrupa şaraplık üzüm endüstrisini hızla harap etmiştir (Campbell, 2006). İlk başta insanlar farklı yöntemlerle (kimyasallar gibi)

filokseraya karşı bağları korumuşlar, ancak bunlar tam olarak başarılı olamamış, daha sonra böceklerin kumlu topraklarda yaşayamadığı anlaşıncı asma çelikleri kumlu toprağa dikilmiş, kumlu topraklarda bağcılık gelişmeye başlamış ve araştırmacılar Kuzey Amerika'da filokseraya dayanıklı anaçlar tespit ederek anaç ıslahı çalışmalarını başlatmışlardır (Hajdu, 2019).

Bağcılıkta zararlı ve hastalık baskıları geleneksel olarak asma anaçlarının kullanımına neden olmuş, sınırlı su kaynakları ve değişen iklim koşulları nedeniyle tarım için mevcut su kaynakları muhtemel azalmadan dolayı soyağacının bir fonksiyonu olarak ve kuraklık toleransı açısından sürgün gelişimi ve özellikle verim bileşenleri üzerindeki asma anacının etkileri araştırılmakta ve zararlılara, hastalıklara ve abiyotik streslere dirençli yeni anaçların ıslahına olan ilgi artmaktadır (Peterson ve ark., 2019).

Kuzey Amerika yabani asmaları (*Vitis*) arasındaki gen kaynakları kullanılarak biyotik ve abiyotik streslere adaptasyonlar çalışılmaktadır (Morales-Cruz ve ark., 2021).

Konukçu savunma sistemini aşmak, parazitik etki için bir ön koşuldur. Bitkilerde parazit algısını takiben, jasmonik (JA) ve salisilik asit (SA) sinyal yolları, biyotik stres sinyallerine aracılık ederek konukçuya karşı savunma yanıtlarının etkinleştirilmesine neden olur. Delici emici etki gösteren asma filokserası (*Daktulosphaira vitifoliae*), organoid kök urları oluşturarak asmaları istila eder. Köklerde gal oluşumu (aşılardan sonraki 24 saat ve 14 gün sonra), JA'nın azalmasına, ancak Salisilik Asit sinyal yolunun teşvikine neden olur. T5C (*V. berlandieri* x *V. riparia*) asma anacı çelikleri, bir *D. vitifoliae* tek kurucu soyu (biyotip C) ile istila ettirilmiş, çalışma sonunda fitohormon miktar tayini (HPLC-MS) ve JA/SA işaretleyici genlerinin (qRT-PCR) transkripsiyonel değişiklikleri, kök dokularında larva zararından (14 saat sonra) gal oluşumuna (> 14 gün sonra) kadar tespit etmişler, böcek zararı (14 saat sonra) sırasında analiz edilen tüm JA işaretleyici genlerde önemli bir artış gözlenirken erken gal oluşumu (24 saat sonra) sırasında ise önemli düşüşler olmuş, gal oluşumunu takiben (5-14 gün sonra) SA ve JA-ile artışı olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca yalnızca analiz edilen SA işaretleyici genleri teşviki, JA işaretleyici gen ifade seviyelerini önemli ölçüde azaltmış, JA sinyal yolunun gözlemlenen baskılanmasının, uyumlu *D. vitifoliae* – *Vitis* spp. kök etkileşimi için önemli bir adımı temsil edebileceği sonucuna varmışlardır (Eitle ve ark., 2019).

Walker ve ark. (2014) yaptıkları çalışmada iklim, su mevcudiyeti, zararlı baskısı ve kontrol uygulamalarındaki değişiklikler, yeni ve daha iyi uyum sağlamış anaçların geliştirilmesinin gerektiğini vurgulamışlardır. Bu amaçla *Muscadinia rotundifolia*'nın

olağanüstü zararlı direncini kullanma çabaları nematodlara, filokseraya ve yelpaze yaprak virüsüne karşı dirençli anaçlar ıslah etmede öne çıkmış ve *Vitis × Muscadinia rotundifolia* arasında geniş melezleme popülasyonları oluşturmuşlardır. Çalışma sonucunda kök-ur nematod suşlarına dirençli beş adet anaç elde etmişlerdir.

Abbate ve ark. (2019), anaç geliştirme potansiyeli olan dört allotetraploit somatik turunçgil melezinin *Citrus tristeza* virüsüne diploitlerden daha dayanıklı olduğunu belirlemişlerdir.

Canlı kök dokuları, kuraklık stresi altında bitki su alımını önemli ölçüde dengeler, ayrıca kuraklık stresi kök yapısı, hidrolik ve büyüme için önemli olan köklerin hacim ve turgorunu kaybetmesine neden olur (Bartlett ve ark., 2021). Üzüm üretimi ve kalitesi, asmanın su ve beslenme durumuna göre değişmekte ve modern bağcılıkta, asma ve toprak arasındaki arayüz, su ve besin alımını düzenleyen anaç ile temsil edilmektedir. Bu nedenle, abiyotik stres toleransı için anaç seçimi, iklim değişikliğinin dayattığı yeni çevre koşullarında bağcılık için bir adaptasyon stratejisini temsil etmektedir (Bianchi ve Brancadoro, 2021).

Asma anaçları su stresi altında stoma iletkenliğini ve kök su potansiyelini azaltırken fotosentetik aktiviteyi arttırmış ve VvNCED1 ve VvNCED2 genlerinin transkriptlerinde bir artış gözlenmiştir (Bianchi ve ark., 2020). Ayrıca, su stresine toleranslı asma anaçlarının çoğunluğu, Mg'ye K'dan daha fazla afinite göstermiş ve yüksek karbon asimilasyonu oluşturmuştur (Bianchi ve Brancadoro, 2021).

Anaçlar, canlılık ve verimi etkilemenin yanı sıra üzüm bileşiminde de rol oynayarak üzüm bileşimi ve fenolik maddelerin su stresine tepkisi üzerinde doğrudan etkiler gösterdiği ve fenolojiyi geciktirerek meyve olgunlaşması sırasında şeker ve fenolik maddelerin birikimini dolaylı olarak önlemeye hizmet edebilirler. Ayrıca, anaç çeşitleri K absorpsiyonunda farklılık gösterdiğinden, sıcak bölgelerde meyve pH'ını kontrol etmeye yardımcı olmak için potansiyel olarak kullanılmakta, genetik mühendisliği araçlarıyla anaç ıslah programlarında hedeflenen direncin ve geliştirilmiş özelliklerin altında yatan moleküler mekanizmaların daha iyi anlaşılmasını sağlar ve markör destekli seçimle yeni anaçların daha hassas ve daha hızlı geliştirilmesi sağlanır (Marín ve ark., 2021). Dang ve ark. (2019), poliploit bitkiler anaç olarak kullanıldığında kuraklık, tuz stresi, soğuğa ve demir eksikliğine diploit anaçlardan daha dayanıklı olduğunu bildirmişlerdir.

Provost ve ark. (2021), farklı anaçlar (3309C, SO4, Riparia Gloire ve 101-14) üzerine aşıllı soğuğa dayanıklı üzüm çeşitlerinin (Frontenac, Frontenac blanc ve

Marquette) tomurcukların canlılık oranını, bitki gelişimini, besin eksikliklerini, verimi ve meyve kompozisyonunu 6 yıl sonunda değerlendirmişler, soğuğa dayanıklı çeşitlerin her anaçtan farklı şekilde etkilendiğini, Mg noksanlığı aşılı Frontenac ve Frontenac blanc'da kendi köklü asmalara göre daha düşük bulunmuş, ancak tomurcuk canlılığı ve asma gelişimi anaçtan etkilenmemiş, ayrıca verim bileşenlerine ilişkin sonuçlar, anaçlar ile kendi köklü asmalar arasında önemli farklılıklar göstermiştir. Sonuçta anaçların soğuğa dayanıklı melezleri etkilediğini ve doğu Kuzey Amerika koşullarında potansiyellerinin olduğunu bildirmişlerdir.

Tuz stresine karşı direnç, esas olarak anacın klorürü dışlama yeteneği ile ilişkilidir (Colmenero-Flores ve ark., 2020). *V. amurensis* Rupr cv Zuoshan-1 $\times$ SO4'ün (*V. berlandieri* $\times$ *V. riparia*) melezlenmesiyle elde edilen A15 ve A17 hibritlerinin tuz stresine direnci erkek ebeveyni olan SO4 ile karşılaştırılmış, 100 mmol L⁻¹ NaCl uygulaması sonucunda A15 ve A17 genotipleri VvNHXP ve VvHKT genlerinin ekspresyonunu önemli ölçüde arttırırken SO4 asma anacında ise azalmıştır. VvNHXP ve VvHKT gen ekspresyonu ile A15 ve A17 köklerinde tuz stresinin önemli ölçüde düzenlendiği ve böylece iyon hasarının neden olduğu tuz stresini hafifletmek için kök sistemi içindeki iyon dengesini koruduğu belirlenmiştir (Fu ve ark., 2019b). Ayrıca, asma anaçlarında tuz stresi toleransını belirlemek için moleküler markerlar (Fort ve Walker, 2008) ve Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) (Abdel Aziz ve ark., 2018) kullanılmıştır.

NaCl kaynaklı tuz stresi asma anaçlarında sürgün sayısı, sürgün uzunluğu, yaprak sayısı, sürgün yaş ağırlığı (g), sürgün kuru ağırlığı (g), canlılık oranı, kallus oluşumu ve kök oluşum yüzdesi gibi morfolojik özelliklerin yanı sıra nispi su içeriğini, klorofil a, klorofil b, toplam klorofil ve karotenoidlerin azalmasına neden olurken yapraklardaki element birikimi ve prolin miktarını arttırmışlardır (Edriss ve ark., 2016).

Bitkide tuza tolerans mekanizmaları arasında yüksek antioksidan üretimi, sürgünlerde ve tanelerde suyun düzenlemesi ve tuz ulaşımının engellenmesine ek olarak sürgünlerin topraktan önemli miktarlarda tuzlu iyon biriktirmesini, iyonların kökten sürgüne ksilem yoluyla transferinin düzenlenmesinde yer alan spesifik taşıma proteinleriyle engelleyerek bitkilerin tuz stresinden korunmasını sağlayabilir (Zhou-Tsang ve ark., 2021). Ayrıca Saleh ve ark. (2008) yaptıkları çalışmada poliploid narenciye ağaçlarının tuz stresine daha dayanıklı olduğunu belirlemişlerdir.

Dalbó ve Souza (2018), yaptıkları çalışmada Brezilya'daki üzüm üretimi için ciddi sorun olan kav ve geriye doğru ölüm hastalıklarına dayanıklı anaç ıslahını

başlatmışlar ve umut verici sonuçları *V. caribaea* × 101-14 Mgt melezi olan IAC 572 asma genotipiyle elde etmişlerdir. Ayrıca seçim süreçleri 840 fideyle başlamış ve üç farklı bölgede hiçbir kav hastalığı belirtisi göstermeyen 23 genotiple çalışmalarını sonuçlandırmışlardır.

Mikrobiyom, çevresel değişikliklerin üstesinden gelmek ve zorlu koşullarla başa çıkmak için bitkinin kapasitesini genişleterek uyarlanabilirlik ve metabolik çeşitlilik sağlar (Bulgarelli ve ark., 2013; Rosenberg ve Zilber-Rosenberg, 2016). Toprak mikroorganizmalarının çeşitliliği ve topluluk yapısı, sürdürülebilir tarım ve bitki sağlığına önemli katkı sağlayan unsurlar olarak giderek daha fazla kabul görmektedir (Vink ve ark., 2021). 5 BB ve 1103 P üzerine aşılanmış *V. vinifera* ‘Lambrusco’'nın bitkilerinde kök ve rizosfer mikrobiyomlarını karşılaştırmak için 16S rRNA dizilimini kullanmışlar, 1103 P'nin potasyum çözücü mikroorganizmaların üyeleri dahil olmak üzere kök ve rizosfer mikrobiyomlarında azaltılmış bir çeşitlilik gösterdiğini, bunun da muhtemelen bu anacın yetersiz potasyum emilimiyle ilişkili olduğu açıklanmıştır (D'Amico ve ark., 2018).

Vink ve ark. (2021), 4 farklı anaç (125 AA, 5 BB, Binova ve SO4) ve çeşidin (Calandro, Reberger, Felicia ve Villaris) kombinasyonunda kök mikrobiyomları incelemişler, α -çeşitlilikteki farklılıkların büyük ölçüde anaç-çeşit kombinasyonlarına bağlı olduğunu, bakteri topluluk yapısının öncelikle çeşit farklılıklarına göre kümelendiğini, ardından anaçlardaki farklılıkların izlediğini, yirmi dört bakteri indikatör cinsi bir veya daha fazla çeşitte önemli ölçüde daha fazla olduğunu, sadece on üçünün bir veya daha fazla anaç genotipiyle spesifik olarak ilişkili olduğunu, ancak çeşit ve anaç indikatör cinsleri arasında çok az benzerlik belirlemişlerdir. Aşılı asmalardaki bakteri çeşitliliğinin hem çeşit hem de anaçtan etkilendiğini, ancak bu etki, hangi çeşitlilik ölçüsünün incelendiği (yani, α - veya β -çeşitlilik) ve belirli anaç-çeşit kombinasyonlarına bağlı olduğu bildirmişlerdir.

Dries ve ark. (2021), 1103 Paulsen, 140 Ruggeri, 161-49 Couderc ve Kober 5BB anaçlarının rizosferiyle ilişkili bakteri toplulukları, 16S rRNA geninin V4-V5 bölgelerini hedef alan ampikon bazlı dizileme tekniği ile karakterize etmişler, dört anaç bakteri topluluğunun yapısı (zenginlik ve düzgünlük) açısından benzerlikler, bununla birlikte, bakteri topluluklarının bileşiminde farklılıklar tespit etmişler, araştırılan tüm anaçların ayırt edilebilir özelliklere sahip mikrobiyom toplulukları olduğunu ve anaç genotipinin bakteri bileşiminin itici gücü olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Vitis genetik kaynaklarının mevcudiyeti ve bunlara kolay erişim, ıslah programları için esastır (Carimi ve ark., 2014). *Vitis* gen bankası koleksiyonları geleneksel olarak saha depolarında korunur, fakat arazi bakımı maliyetli ve zaman alıcıdır, geniş arazi gerektirir ve bitkiler abiyotik streslere ve biyotik tehditlere karşı savunmasızdır (Benelli ve ark., 2013; Marković ve ark., 2013; Pathirana ve ark., 2016). *In vitro* bitki muhafazası, *Vitis* germplazmının kısa süreli korunmasına bir alternatiftir (Postman ve ark., 2006; Hassan ve ark., 2013), ancak doku kültürü yoğun emek gerektirir ve bitkiler kontamine olabilir veya somaklonal varyasyona uğrayabilme gibi sorunlar yaşanabilir (Souza ve ark., 2016; Kaya ve Souza, 2017; Mathew ve ark., 2018). Ayrıca *Vitis* türleri virüs enfeksiyonlarına karşı oldukça hassas olduğundan virüssüz bitkiler, klonal olarak çoğaltılan germplazm için çoğaltma materyali olarak ve ayrıca asma genetik kaynaklarının küresel değişimi için gereklidir (Bettoni ve ark., 2021).

Kriyoprezervasyon, biyolojik malzemelerin sıvı azot (LN) (–196 °C) veya LN buharı (–165 ila –190 °C) içinde depolanmasıdır (Bettoni ve ark., 2019) ve kriyoprezervasyon koşulları altında, canlı çoğaltma materyalleri hücresel bölünmelerini ve metabolik süreçlerini en aza indirirler (Benelli ve ark., 2013; Wang ve ark., 2018). Diğer muhafaza yöntemlerinin maliyetleri ile karşılaştırıldığında, dondurularak muhafaza maliyet ve işgücünü en aza indirmektedir (Benson, 2008). Bettoni ve ark. (2019) yaptıkları çalışmada *in vitro* olarak yetiştirilen bitkilerden kesilen sürgün uçlarını kullanarak 12 *Vitis* türünün (*V. vinifera* cvs. Chardonnay ve Riesling, *V. actinifolia*, *V. aestivalis*, *V. Jacquemontii*, *V. flexuosa*, *V. palmata*, *V. riparia*, *V. rupestris*, *V. sylvestris*, *V. ficifolia*, *V. treleasi* ve *V. xnovae* angeliae) kriyoprezervasyonunu çalışmışlar, 12 *Vitis* türünü temsil eden 13 genotip için en az %43 yeniden büyüme seviyeleri ile bu tekniğin geniş uygulanabilirliğini, teknik personelle başarıyla tekrarlanabileceğini bildirmişlerdir.

2.5. Poliploit Anaç

Patel ve Olmo (1957) Hunisa (*Vitis vinifera*), James (*Vitis rotundifolia*) ve Stuckey (*Vitis rotundifolia*) çeşitlerini *Vitis lincecumii*, *Vitis labrusca*, *Vitis vinifera* ve *Vitis rotundifolia* geni taşıyan RX 45–3 (2n = 59) çeşidiyle melezlemişlerdir. Hunisa çeşidinin 3951, James çeşidinin 625 ve Stuckey çeşidinde 3125 çiçeğini tozlamışlardır. Tozlama sonucunda sadece Hunisa çeşidinde %29.13 oranında tane bağlama belirlemişlerdir. Bu tanelerin %0.93'ü (37) çekirdekli olurken %28.2'si (1117) de

çekirdeksiz olmuştur. Bu melezlemeler sonucunda 42 adet tohum elde etmişlerdir. Sağlıklı tohumların boyutları ve polen boyutlarında farklılık meydana gelmiştir. Tohumların çimlendirilmesiyle elde edilen melezlerin son derece kuvvetli ve *Vitis rotundifolia*'ya benzemiştir. Melezlerin arzu edilen bir anaç üretmede önemli olmasının yanı sıra meyve veren bir çeşit olabileceğini de bildirmişlerdir.

Notsuka ve ark. (2000) 29 diploit, 3 triploit ve 1 tetraploit asma genotiplerinin mikro çekliklerini *in vitro* koşullarda kromozom katlanması için kullanmışlardır. Bir veya iki gün boyunca %0.05 dozunda kolhisin uygulamasının tetraploit (4x) bitkileri teşvik etmede uygun olduğunu bildirmişlerdir. Uygulama yapılmış tomurcuklardan elde edilen sürgünlerin genellikle yapraklarında anormallikler ve bunların bir kısmında sitokimerik (2x+4x) yapı belirlemiştir. Diploit çeşitler kolhisine karşı farklı tepki vermiş ve *V. vinifera*'dan tetraploit bitki teşvik etme yüzdesi Amerikan hibritlerine kıyasla nispeten daha yüksek bulunmuştur. Elde ettikleri hekzaploit (6x) bitkilerin daha zayıf bir kök sistemine sahip fakat sadece kök uçlarında 3x hücrelere sahip sitokimerik yapıda olduğu, köklenmesinin daha iyi olduğunu tespit etmişlerdir. Oktoploit bitki (8x) elde edilmediğini fakat kısmen 8x hücreye sahip sitokimerik, büyümesi yavaş ve bodur yapılı bitkiler belirlemiştir. Elde edilen tetraploit bitkiler güçlü, kolay köklenen özellikte ve uzun yıllar boyunca stabil kalırken, 3x+6x ve 4x+8x sitokimerik yapıya sahip bitkiler *in vivo* büyütme sırasında sırasıyla triploit ve tetraploit kaynağına geri dönerek kaybolmuşlardır. Elde edilen tetraploit bitkiler ve orijinal diploitlerinin karşılaştırılması sonucunda, tam olgunluk süresi, salkım ve tane şekli, kabuk rengi, °Brix ve asitlik açısından önemli farklılıklar tespit etmişlerdir. Ancak çeşitlere bağlı olarak 4x ile 2x arasında tane boyut artışı 1.1 ile 1.5 kat arasında, ortalama 1.3 düzeyinde bulunmuştur.

Motosugi (2002) diploit 5 BB (*Vitis berlandieri* Planch, × *V. riparia* Michx), 101-14 (*V. riparia* × *V. rupestris* Scheele) ve 41 B (*V. berlandieri* × *V. vinifera* L.) asma anaçları ile tetraploit 5 C (*V. berlandieri* × *V. riparia*) asma anacı arasında yaptığı melezlemelerden triploit asma anacı elde etmeyi amaçlamıştır. Diploit × tetraploit asma anaçları arasında yapılan melezlemelerden elde edilen tanelerin çekirdek sayısı diploitler arasında yapılan melezlemelerden farklı olmadığı, ancak diploit × tetraploit bitkilerden elde edilen tohumların neredeyse hiç çimlenmediği, özellikle 41 B (2x) × 5 C (4x) melezlemesinden hiç tohum elde edilemediği, tohumlardan elde edilen bitkilerin FC analizi sonucunda 5 BB (2x) × 5 C (4x) melezlerinin %75'inin, 101-14 (2x) × 5 C (4x) melezlerinin ise %50'sinin triploit olduğunu bildirmiştir.

Motosugi ve ark. (2002a) kolhisin uygulayarak elde edilen ototetraploit dört asma anacının (Riparia Gloire de Montpellier, Rupestris St. George, Couderc 3309 ve Kober 5 BB) filokseraya (*Daktulosphaira vitifoliae* FITCH) direncini, bir petri kabında kök parçaları ve filokseranın aseptik ortak kültüründe değerlendirmişler ve orijinal diploitleri ve Cabernet Franc (*Vitis vinifera* L.) ile karşılaştırmışlardır. Diploit ve ototetrapolit anaçların kökünde hiç veya çok az filoksera larvası ergin hale gelirken, Cabernet Franc köklerinde ise yumurtaların %26.8'i ergin hale gelmiştir. Riparia Gloire de Montpellier, Rupestris St. George, Couderc 3309 ve bunların ototetraploit bitkilerinin filokseraya karşı direncini tespit etmek için filokserayla bulaşık bağa dikilerek test etmişler ve bir tetraploit sofralık üzüm çeşidi olan Kyoho çeşidiyle de karşılaştırmışlardır. Tetraploit asma anaçlarının kök uçlarındaki gal oluşumunda orijinal diploit bitkilerine kıyasla önemli ölçüde artış gözlememişler fakat karşılaştırma için kullandıkları Kyoho üzüm çeşidinin kök uçlarında ise %52.9 oranında gal tespit etmişlerdir. Bu çalışma sonucunda kullanılan ototetraploit asma anaçlarının filokseraya karşı direncinin yüksek olduğunu, dolayısıyla orijinal diploit bitkilerinden farklı olmadığını bildirmişlerdir.

Motosugi ve ark. (2002b), üç asma anacının [Gloire (*Vitis riparia* Michx), St. George (*V. rupestris* Scheele) ve 3309 C (*V. riparia* × *V. rupestris*)] mikro çoğaltılmış bitkilerine kolhisin uygulamasıyla ototetraploidiyi teşvik etmişlerdir. Seçtikleri klonların kromozom seviyesini FC analiziyle araştırmışlardır. Tetraploit bitkilerin yaprakları orijinal diploit asmaların yapraklarından daha düşük yoğunlukta stoma içermiştir. Kromozomu katlanan tüm tetraploit bitkilerin orijinal diploitlerine kıyasla çok daha kısa kökleri olmuştur. Tetraploit Gloire ve St. George bitkilerinin sürgünleri diploit orijinlerinden daha kısa olurken, tetraploit 3309 C bitkilerinin ise daha uzun olmuştur. Alıştırma aşamasında, tetraploit bitkiler orijinal diploitlerine göre sürgün, boğum araları ve köklerinin daha kısa olduğunu bildirmişlerdir. Sera koşullarında geliştirilen tetraploit anaçların sürgünleri diploit orijinallerine göre daha zayıf bir büyüme gösterirken, daha kalın gövde çapları ve daha yüksek yaprak özgül ağırlıklarına (yaprak kuru ağırlığı/yaprak alanı) sahip olmuşlardır. Tetraploit anaçların daha kalın ve daha kısa köklere sahip olmaları nedeniyle kök sistemlerinin diploit orijinallerine göre daha kompakt hale geldiği öne sürülmüştür.

Motosugi ve ark. (2002c) Arbusküler mikorizal (AM) mantarı *Gigaspora margarita* BECKER ve HALL'ın tetraploit asma anaçlarının (Gloire de Montpellier, Rupestris St. George ve Couderc 3309) büyüme ve yaprak mineral konsantrasyonları

üzerindeki etkilerini orijinal diploitleriyle karşılaştırmışlardır. Her bir tetraploit asma anacına aşılanmış AM enfeksiyonu yüzdesi, aşılanmış diploit bitkilerdeki kadar yüksek (%90'ın üzerinde) olduğunu belirlemişlerdir. AM aşılanan tetraploit asmaların sürgün ve kök gelişimi, aşılanmamış asmalardan önemli ölçüde daha iyi olduğunu tespit etmişlerdir. Orijinal diploit anaçlarda aşılamaadan bağımsız olarak hemen hemen aynı sürgün ve kök gelişimini gözlemişlerdir. AM mantar aşılanmış tetraploit ve diploit anaçların yapraklarındaki P konsantrasyonları aşılanmamış asmalardan önemli ölçüde daha yüksek, buna karşılık AM mantar aşılı tetraploit asmalarda ise daha düşük Ca ve Mg konsantrasyonları belirlemişlerdir. Daha kalın köklere ve daha kompakt kök sistemlerine sahip olan tetraploit anaçların orijinal diploitlerine göre daha çok AM'lere bağlı olduğunu da bildirmişlerdir.

Motosugi ve Naruo (2003) yaptıkları çalışmada 101-14 (*Vitis riparia* Michx $\times$ *V. rupestris* Scheele), 41 B (*V. berlandieri* Planch. $\times$ *V. vinifera* L.) ve 5BB (*V. berlandieri* $\times$ *V. riparia*) diploit asma anacıyla 5 C (*V. berlandieri* $\times$ *V. riparia*) tetraploit anacını melezleyerek yeni bir bitki elde etmek için embriyo kültürünü kullanmışlardır. Bu üç melezleme kombinasyonundan elde edilen embriyoların çoğu küresel ve anormal veya belirsiz şekilli olmuştur. 101- 14 (2x) $\times$ 5 C (4x), 41 B (2x) $\times$ 5 C (4x) ve 5 BB (2x) $\times$ 5 C (4x) melezlemeleri sonucunda elde edilen embriyolardan sırasıyla dört, üç ve iki adet triploit bitki elde etmişlerdir. 5 BB (2x) $\times$ 5 C (4x) melezlemesi sonucu elde edilen ve E-1 (3x) olarak adlandırılan triploit bitkiyi 5 BB (2x) ve bu bitkinin tetraploidiyle [5 BB (4x)] karşılaştırmışlardır. E-1'in (3x) sürgün ve kök gelişmeleri ve yaprak morfolojisi, 5 BB (2x) ve 5 BB (4x) arasında ve orta düzeyde olduğunu belirlemişlerdir. 5 BB (2x), E-1 (3x) ve 5 BB (4x) üzerine mikro aşılanmış Kyoho üzüm çeşidinin büyümesini de iklimlendirme aşamasında karşılaştırmışlardır. Bitkiciklerin sürgün ve kök gelişimi sırasıyla 5 BB (2x), E-1 (3x) ve 5 BB (4x) olarak tespit etmişlerdir. E-1 (3x) ve 5 BB (4x)'in filokseranın (*Daktulosphaira vitifoliae* Fitch) aseptik ortak kültüründe, böceğe karşı oldukça dirençli olduğunu da bildirmişlerdir.

Motosugi ve Yamamoto (2004) Riparia Gloire de Montpellier, 3309 C ve bunların tetraploitleri üzerine aşılanmış Kyoho üzüm çeşidinin yapraklarındaki su ilişkisi ve net fotosentez oranlarını incelemişlerdir. Tetraploit anaçlar üzerine aşılı Kyoho çeşidinin yapraklarındaki transpirasyon oranı, stoma iletkenliği ve net fotosentez oranının diploit anaçlara aşılı asmalara kıyasla daha düşük olduğunu belirlemişlerdir. Anaçlar arasında ksilem su potansiyeli açısından herhangi bir fark belirlememişlerdir. Günlük ölçümde, 3309 C (4x) üzerine aşılı Kyoho çeşidinin yaprak transpirasyonu ve

net fotosentez oranları, orijinal diploit anaçlarına aşılı asmalara göre gündüzleri sürekli olarak daha düşük olduğunu fakat bu farkın akşama doğru kaybolduğunu bildirmişlerdir.

Saleh ve ark. (2008), turunçgil türlerinin ağaçlarının sıklıkla tuzluluk stresine maruz kaldıklarını ve yeni anaçların tuz stresine toleranslı olması gerektiğini bildirmişler ve bu amaçla üç tetraploit anaç genotipini diploit anaçlarla (*Poncirus trifoliata*, *Carrizo citrange*, *Cleopatra mandarin*) karşılaştırmışlardır. Diploit *Poncirus trifoliata* bitkilerinde yaprak dökümü, *Poncirus trifoliata* ve *Carrizo citrange* diploit bitkilerinde ise kloroz belirtileri gözlemişler, diploit bitkilere kıyasla tetraploit bitkilerin yapraklarında daha düşük klorür iyonu biriktiğini ve tetraploit turunçgil anaçlarının diploitlerine göre tuz stresine daha toleranslı olduğunu belirlemişlerdir.

Mouhaya ve ark. (2010), iyi sulama koşullarında diploit ve tetraploit turunçgillerin yüksek tuzluluğa toleransını araştırdıkları çalışmada üç yapraklı portakal (*Poncirus trifoliata* L. Raf.) ve *Citrus deliciosa* Ten diploit ve tetraploitleri arasında karşılaştırmalar yapmışlardır. Daha önce orta düzeyde tuzlu su stresi altında, narenciye 4x genotiplerinin 2x'e göre daha toleranslı olduğunu bildirmişler, ancak yaptıkları çalışma koşulları altında, 4x fideleri, daha fazla toksik iyon biriktirdiğini ve 2x genotiplerden daha fazla etkilendiğini ve 2x'e göre tuz stresine daha hassas olduğunu belirlemişlerdir.

Guerra ve ark. (2014), diploit ve tetraploit citrumelo [Swingle (*C. paradise* Macf. × *Poncirus trifoliata* L. Raf)], citrange [Troyer (*C. sinensis* L. Osb. × *P. trifoliata*)], Fepagro C 13 ve Fepagro C 37 (*C. sinensis* cv. Pêra × *P. trifoliata*)] anaçlarının morfolojik ve gelişme özelliklerini araştırmışlardır. Tetraploit anaçların diploidlere göre daha kalın, koyu, geniş ve uzun yapraklara sahip oldukları ve daha düşük büyüme gücüne sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Guerra ve ark. (2016), turunçgil anaçlarından poliploit bitkileri belirlemek ve genetik yapının ve çevrenin kromozom katlama sıklığı üzerindeki etkisini değerlendirmek için Trifoliata (*Poncirus trifoliata* L. Raf), citrumelo [Swingle (*C. cennet* Macf. × *P. Trifoliata*)], sitrange [Troyer (*C. sinensis* L. Osb. × *P. Trifoliata*)], Fepagro C13, Fepagro C37 ve Fepagro C41 (*C. sinensis* L. Osb. cv. Pêra × *P. Trifoliata*) anaçlarından tohumlar almışlar ve çimlendirilerek gelişmelerini sera ve arazi koşullarında takip etmişlerdir. Araziden alınan 415 örneğin 7'sinin (%1.69) ve seradan alınan 435 örneğin 29'unun (%6.67) FC analizleriyle tetraploit olduğu, bunların C 37 (%2.12) ve C 13 (%2.04) anaçlarının arazi koşullarında C 13 (%15.52) ve C 37 (%6)

anaçlarının ise sera koşullarında meydana geldiğini, narenciye anaçlarında ototetraploit oluşma sıklığının yaygın, genetik yapı ve çevresel koşullarla ilişkili olduğunu belirlemişlerdir.

Gao-Takai ve ark. (2017), Kober 5 BB ve Hybrid Franc (HF) anaçları ile bunların kolhisinle uyarılmış ototetraploitleri üzerine aşılı Ruby Roman (*Vitis labruscana*) üzüm çeşidinin büyüme ve tane kalitesini 2 yıl boyunca saksıda ve ardından 2 yıl boyunca arazi koşullarında incelemişlerdir. Fidanlık aşamasında, iki diploit anaca aşılı çeliklerin hayatta kalma oranı, kök ve sürgün büyümesinin tetraploitlerden açıkça daha büyük olduğunu belirlemişlerdir. Daha sonra saksılarda ve arazideki yetiştirme sırasında, 5 BB (4x) üzerine aşıl原因an asmaların daha az sürgün büyümesi (ağırlık ve uzunluk), daha kısa boğum arası uzunluğu ve bazı durumlarda 5 BB (2x) asma anacına aşıl原因anlardan daha küçük gövde çapına sahip olmuştur. Bununla birlikte, 5BB'nin aksine, saksı yetiştiriciliği sırasında HF (2x) ve HF (4x) arasında toplam taç gelişiminde önemli bir fark olmadığı fakat 2014 yılında arazi koşullarına aktarıldığında HF (4x) asmadaki toplam sürgün uzunluğu ve ağırlığı HF (2x) asmasına kıyasla daha büyük olmuştur. Saksıda 2 yıllık büyümenin sonunda HF (diploit ve tetraploit) anaçlarının kök gelişimi, 5 BB (diploit ve tetraploit) anaçlarına göre daha kuvvetli olmuştur. Ayrıca, iki diploit anaçta [5 BB (2x) ve HF (2x)] ince köklerin (çaplar <1 mm) oranını, iki tetraploit anaçtan [5 BB (4x) ve HF (4x)] daha fazla, buna karşılık iki diploit anaçtaki kalın köklerin (çap 1-2 mm, 2-5 mm ve >5 mm) oranlarını ise iki tetraploit anaçtakinden daha az bulunmuştur. Ayrıca, 5 BB (4x) üzerine aşılı asmalardan hasat edilen Ruby Roman üzüm çeşidinin tane kabuk rengi diğer asmalardan hasat edilenlere göre çok daha koyu renkli olduğu belirlenmiştir.

Kara ve ark. (2018a), 41 B anacına ait tek göz çelikleri serada köklendirilip hızlı büyümeye geçtikleri dönemde farklı süre (24, 48, 72 ve 96 saat) ve dozlarda (%0.1, %0.3, %0.5, %0.7, %0.9 ve %1.1) kolhisin uygulamalarının ploidiye etkilerini incelemişlerdir. Kolhisin, uygulanan doz ve sürelerle göre morfolojik değişikliklere neden olmuştur. Stoma boyu, stoma genişliği ve stoma alanında artış, stoma sayısında ise azalma tespit edilmiştir. Ancak FC analizlerinde sitolojik değişiklik tespit edilememiştir. Sonuçta, 41 B tek göz çeliklerinden gelen sürgünlere farklı doz ve uygulama süreleriyle yapılan kolhisin uygulamalarından toplam 240 adet materyalin FC analizine göre mitotik otopoliploit bitkilere ulaşamamışlardır. 41 B asma anacında kolhisinle poliploidi teşvikine yönelik tam mutasyon frekansının bu çalışmadan elde edilen bulgulara göre 1/240'den daha düşüktür.

Kara ve ark. (2018b) yaptıkları denemede asmalara poliploidi teşviki için apikal meristemden kolhisin uygulaması yapmışlardır. Farklı kolhisin konsantrasyonlarını (0, 1 gL⁻¹, 2 gL⁻¹, 3 gL⁻¹, 4 gL⁻¹, 5 gL⁻¹, 6 gL⁻¹) Gök Üzüm (*Vitis vinifera* L.), Trakya İlkeren (*Vitis vinifera* L.), Isabella (*Vitis labrusca* L.) ve 41 B asma anacı [Chasselas (*Vitis vinifera* L.) x (*Vitis berlandieri* Planch.)] olmak üzere dört diploit üzüm genotiplerine uygulamışlardır. Bu amaçla serada ilk gerçek yaprakların çıktığı 3 gün boyunca günde (gündüz 25 °C ve gece 20 °C) iki kez (08:30 ve 18:00) genç fidanların meristematik kısmına sekiz doz kolhisin uygulamışlardır. Poliploidizasyon uyarılarından 16 hafta sonra morfolojik ve sitolojik parametreleri değerlendirmişlerdir. Stoma boyutu, şekli ve yoğunluğu, bekçi hücrelerindeki kloroplast sayısına ve kök ucundaki kromozom sayımına dayanarak kolhisin kaynaklı tetraploit bitki elde edememişler fakat Trakya İlkeren çeşidinde ise anöplöit bitki belirlemişlerdir. Anöplöit Trakya İlkeren çeşidinin kromozom sayısını $2n = 2x = 40$ olarak tanımlamışlardır. Bu çalışma sonucunda asma genotiplerinin kromozom katlanmak için yapılan teşvike kolhisinin çok iyi tepki vermediğini fakat asmada kolhisin kaynaklı ilk anöplöit raporu olduğunu bildirmişlerdir.

Abbate ve ark. (2019), anaç geliştirme potansiyeli olan dört allotetraploit somatik turuncgilde azalmış bir viral yanıt seviyesi gösterdiğini belirlemişlerdir.

Calvez ve ark. (2019), *Candidatus liberibacter* spp. bakterisinin neden olduğu Huanglongbing (HLB) hastalığı su sıkıntısı olan bahçelerde daha fazla etki gösterdiğini, tetraploit anaç kullanımı kuraklık koşullarına daha iyi uyum sağlayarak bu hastalığa karşı direnç için poliploit anaç kullanımının etkisini araştırmışlardır. Bu nedenle, 2x ve 3x lime çeşitlerini 2x ve 4x anaçlara aşıl原因arak ağaçların su eksikliğine adaptasyonunu sağlayıp sağlayamadığını doğrulamak için bir çalışma başlatmışlar, 4x anacın aşısı kalemine kuraklığa karşı daha iyi tolerans sağladığını göstermesinin yanı sıra, triploit aşısı kaleminde daha iyi detoksifikasyon (toksinsizleştirme) meydana geldiğini bildirmişlerdir.

Dang ve ark. (2019), poliploit bitkiler anaç olarak kullanıldığında, poliploit bitkilerin bodurlaşmaya neden olabileceğini ve ağaçların kuraklık, demir eksikliği, tuz, ağır metal ve soğuk gibi abiyotik stres toleransını arttırabileceğini bildirmişlerdir.

Oustric ve ark. (2021), narenciye türlerinde tetraploit anaçların kullanılmasıyla daha düşük besin girdileriyle adaptasyonun iyileşebileceği ve bu maksatla optimum gübreleme altında ve 7 aylık besin eksikliğinden sonra diploit klementin (C) çeşidine diploit (2x) ve tetraploit (4x) *Carrizo sitrange* (C/CC2x ve C/CC4x) ve *Citrumelo* 4475

(C/CM2x ve C/CM4x) anaçlarının etkilerini incelemişlerdir. Fotosentetik süreçlerdeki değişiklikleri ve malondialdehit birikimini değerlendirmişler ve C/CM 4x kalem/anaç kombinasyonlarına göre besin eksikliğinden daha az etkilendiğini ve besin eksikliğine toleransın anaç poliploidisiyle düzeltilebileceğini öne sürmüşlerdir.

2.6. N₂O ile Poliploidi Teşviki

Okazaki ve ark. (2005), yaptıkları çalışmada triploit bitki elde etmek için lale soğanlarına farklı sürelerde (24 ve 48 saat) N₂O:O₂ (5:1) uygulaması yapmışlardır. Muamele edilen bitkilerin çoğu n, 2n ve anöploit polen tanelerinin bir karışımı olan geniş boyut dağılımına sahip polen taneleri üretmişlerdir. Nispeten yüksek oranda büyük polen tanelerini içeren polen karışımının diploit lalelerle melezlenmesi sonucunda triploit bitki ve çok az poliploit bitki elde etmişlerdir. Bu çalışma sonunda lale ıslahında N₂O kullanılarak 2n polenin yüksek sıklıkta üretilebileceğini bildirmişlerdir.

Barba-Gonzalez ve ark. (2006), Oriental × Asiatic lily (*Lilium*) melezlemeleri (2n = 2x = 24) sonucunda F1 bitkilerin sekiz farklı genotipini 24 ve 48 saat boyunca N₂O gazıyla (6 bar) muamele etmişlerdir. Uygulama sırasındaki tüm bitkilerin en yaşlı çiçek tomurcuklarındaki anterlerin erken mayotik aşamalara sahip olduğunu, uygulama yapılmış bitkilerden elde edilen olgun çiçekleri, *in vitro* polen çimlenme yoluyla ve bunların hem erkek hem de dişi ebeveynler olarak diploit Asya melezleri (2n = 2x = 24) ile melezlemelerde kullanılmışlardır. OA melezlemeleri sonucu elde edilen sekiz genotipe uygulanan N₂O gazının beş genotipte 2n polen elde edildiğine dair kanıtları *in vitro* ortamda yapılan incelemelerle sunmuşlardır. Üç genotipten elde ettikleri 2n polenleri melezlemelerde kullanmışlardır. N₂O uygulaması sonucu elde edilen 41 poliploit bitkinin 34'ü triploit 7'sini de tetraploit olarak belirlemişlerdir.

Kato ve Birchler (2006), yaptıkları çalışmada Oh43 mısır hattına döllenme sırasında (tozlaşmadan 30–36 saat sonra) 20 saat N₂O gazı uygulamışlardır. 600-1000 kPa basınçlar arasında N₂O gaz uygulamasının tetraploit bitki teşvikinde etkili olmuş, uygulamalar mısırdaki çekirdeksiz ve buruşmuş tane oluşum oranını önemli ölçüde artırmıştır. 12 doğal hattı tozlanmadan 30 ve 36 saat sonra 800 ve 900 kPa basınç altında 20 saat N₂O gazına maruz bırakmışlar ve test edilen 12 doğal hattın 9'unda tetraploit veya anöploidiyi başarılı bir şekilde teşvik etmelerine rağmen bu hatların yalnızca 6 tanesinde başarılı bir şekilde yeni bitki elde etmişlerdir. Uygulama yaptıkları

materyallerden kromozomları kırılmış bitkiler veya kimera olan anöploitleri de tespit etmişlerdir.

Akutsu ve ark. (2007), yaptıkları çalışmada mayotik süreci N_2O gazı ile durdurarak Asya melez zambaklarından $2n$ polen üretimini teşvik etmişlerdir. $2n$ polen teşvikinde en uygun mayotik aşamayı belirlemek için, farklı mayotik aşamadaki tomurcukları olan bitkilere basınca dayanıklı bir tank içinde 24 saat N_2O ($N_2O:O_2 = 5:1$) gazı uygulamışlardır. Faz I'deki anterlere sahip bitkilere yapılan uygulamalarla birkaç $2n$ polen tanesi ve ağırlıklı olarak anterlerde mayotik metafaza maruz kalan bitkiler kullanılarak farklı büyüklükteki karışık polen taneleri elde etmişlerdir. Normal zambak polen taneleri eliptik olmasına rağmen, N_2O 'ya maruz kalan bitkilerin polenleri dev küresel tanecikli yapıya sahip olmuştur. FC analiziyle dev polen tanelerinin diploit olduğunu tespit etmişlerdir. Normal ve dev polen taneleri içeren karışık polenler tetraploit çeşitlerle melezlendiğinde ortaya çıkan fidelerin tetraploit ve anöploit olduğunu belirlemişlerdir. Bu da diploit dev polen tanelerinin füzyon yoluyla tetraploit bir dişi ebeveynden sağlanan diploit yumurtalarla tetraploit fideler oluşturmaktadır.

Kitamura ve ark. (2009), 24 saat N_2O uygulandıktan sonra, mikrotübüllerin etkili bir şekilde depolimerize edildiğini; bunun da kromozomların kutuplara hareket etmesinin engellediğini ve N_2O uygulanmış hücrelerin merkezinde kromozom tutulmasına neden olduğunu bildirmişlerdir. Hücre plakası oluşumu gecikmeden gerçekleştiğini ve diploit genomlu bir hücre ve kromozomsuz başka bir hücre oluştuğunu belirlemişlerdir. Ayrıca N_2O uygulaması, sitokinez sırasında anormal kromozom ayrılmasına bağlı olarak sıklıkla mikro çekirdekleri teşvik ettiğini de tespit etmişlerdir. Mikro sporositlerdeki aktin filamentlerinin N_2O 'ya duyarlı olduğunu, elde ettikleri bu bulgularla N_2O 'nun mikrotübül polimerizasyonunu engelleyerek poliploidizasyona aracılık ettiğini, ancak mikrosporosit mayozu sırasında aktin filament oluşumunu etkilemediğini bildirmişlerdir.

Dewitte ve ark. (2010), Begonya çiçek tomurcuklarına $2n$ polen oluşumunu teşvik etmek için trifluralin (10, 100 ve 1000 μM 'de) ve N_2O (6 Bar) uygulamaları yapmışlardır. Polen DNA içeriği ile ilgili olan polen boyutunun hem N_2O hem de trifluralin uygulamaları sonrasında arttığını, ancak büyük polen teşviki genotipe bağlı olduğunu, hem trifluralin hem de N_2O uygulamalarının polen tanelerindeki DNA içeriğini etkili bir şekilde artırdığını, trifluralin uygulamalarından sonra, polenler düşük çimlenme kabiliyeti göstermiş ve artan ploidi teşvikinde daha az etkin olduğunu, N_2O uygulamalarıyla birkaç yaşayabilir triploit bitki elde edildiğini, Bu nedenle, N_2O

Begonya'da ve muhtemelen diğer birçok tür için 2n polen teşvikinde etkili olduğunu bildirmişlerdir.

Nukui ve ark. (2011), Optimum N₂O uygulama koşullarını ve sitolojik etki mekanizmasını belirlemek için verimli ve steril hibrit zambaklarından farklı anter gelişim aşamalarında çeşitli büyüklükteki çiçek tomurcuklarına N₂O gazı uygulamışlardır. Çiçek tomurcuklarının 1-4 mm olduğu dönemde 48 saat 6 bar basıncın uygulanması sonucunda zambaklardan 2n polen elde etmişlerdir. Elde ettikleri verimli polenlerin *Lilium* × *formolongi* geri melezlemesi sonucunda birçok triploit bitki üretmişler, böylece arkesporiyal hücre çoğalma aşamasında N₂O uygulaması, melez zambaklarda polen sterilitesini etkili bir şekilde yenerek, döl üretebilen verimli 2n polen taneleri ile sonuçlanmıştır.

Wongprichachan ve ark. (2013b), yaptıkları çalışmada işlem görmemiş *Phalaenopsis amabilis*'in polen taneleri (2n = 2x = 38) 24 ve 48 saat N₂O ile muamele edildikten sonra aynı türlerle melezlenmesiyle elde edilen bitkilerin ploidi seviyeleri, FC ve kromozom sayımı ile belirlemişlerdir. 24 saat uygulamalarında %35.6 triploit ve % 6.7 tetraploit bitki ve 48 saat uygulamasında ise sadece % 5 tetraploit bitki elde ettiklerini, *P. amabilis*'te poliploidi teşvikte N₂O uygulamalarının etkili olduğunu, kök uçlarındaki kromozom sayımı sonuçlarının FC analizleriyle uyumu, FC'nin ploidi seviyesi belirlemede güvenilir bir yöntem olduğunu, sonuç olarak N₂O'nun *P. amabilis*'te kromozom katlamada etkili bir ajan olarak kullanılabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Wongprichachan ve ark. (2013a), yaptıkları çalışmada mitotik süreci N₂O:O₂ (5:1 bar) ile durdurarak indirgenmemiş *Phalaenopsis* gametini teşvik etmeye çalışmışlardır. *Phalaenopsis amabilis* ve *P. equestris* (2n = 2x = 38) 0, 24, 48 ve 68 saat basınç altında N₂O gazı uygulamışlardır. 24 ve 48 saatlik uygulamalar, *P. amabilis*'de indirgenmemiş gamete neden olmuş, ancak 68 saatlik uygulamada *P. amabilis*'in çiçek tomurcuğu için zararlı olmuştur. *P. equestris*'de 2n polen elde edememişlerdir. Bu nedenle, N₂O uygulamalarının *Phalaenopsis* ıslahı için yeni bir yaklaşım sağlayabileceğini bildirmişlerdir.

Luo ve ark. (2016), kısır diploit Oriental × Trumpet melezlerinde (O×T) (*Lilium*) canlı 2n polen teşvik etmek için N₂O gazını, mayozun farklı aşamalarında dört kısır diploit OT çeşidinin (Nymph, Gluhwein, Yelloween ve Shocking) çiçek tomurcuklarına uygulamışlardır. Kontrolde polen çimlenmemiş, bununla birlikte 600 kPa N₂O uygulamasından sonra, O×T melezlerinin üçünde (Nymph, Gluhwein ve Yelloween)

hem verimli çiçek yüzdeleri (%4.3-16) hem de daha yüksek polen çimlenme oranlarını (%18.8- 72.5) ayrıca, 600 kPa N₂O gazının 48 saat uygulamasındaki verimli çiçek yüzdeleri ve polen çimlenme oranlarının 24 saatlik uygulamadan daha yüksek olmuştur. 600 kPa basınç altında 72 saatlik N₂O uygulamasından sonra çoğu çiçek tomurcuğu veya bitki zarar görmüş ve zarar görmeyenler ise çiçeklenme anında anormal anterler oluşturmuş, 600 kPa basınç altında 48 saatlik N₂O uygulamasıyla dört kısır melez O×T zambak çeşitlerinden üçünde canlı 2n poleni teşvik etmişlerdir. Zambak melezlerinde N₂O uygulaması ile 2n poleni teşvik etmek için mayozdaki profaz I - metafaz I'in en uygun aşama olduğunu belirlemişlerdir.

Kara ve ark. (2018b), poliploit asmalar elde etmek için N₂O uygulamasının daha önce test edilmemiş ve bağcılıkta yeni bir yaklaşım olarak kullanıldığını bildirmişlerdir. Yaptıkları çalışmada 41B asma anacı ve Trakya İlkeren, Gök Üzüm ve Ekşi Kara üzüm çeşitlerinde (*Vitis vinifera* L.) tek göz çeliklerine mitotik ploidiyi teşvik etmek için N₂O uygulamışlardır. Bu çeşit ve anaçlara çelikler sürdükten ve mitozun farklı aşamalarındaki bitkilerde 2-3 yaprak geliştikten sonra 25 °C'de 24 saat 12000 kPa uygulama yapmışlardır. N₂O'nun etkilerini, stoma özellikleri (yoğunluk, uzunluk, genişlik ve alan) ve FC analiziyle değerlendirdiklerinde N₂O uygulamalarının stomada önemli morfolojik değişikliklere neden olurken FC analizlerinde herhangi bir poliploit bitki teşhisi yapılamamıştır.

Kara ve ark. (2018c), ploidi teşviki maksadıyla kullanılan kimyasalların uygulandığı bitki kısımları, uygulama teknikleri, dozları ve etkinliği türler ve hatta çeşitler düzeyinde farklılıklar gösterdiğini, N₂O gazı basınca dayanıklı kaplarda ve farklı sürelerde aktif mitoz veya mayoz bölünmedeki dokulara (polen ve/veya yumurta kesesi ana hücresi) uygulandığını ve bu şekilde 2n polen, poliploit fide ve/veya sürgün oluşumu teşvik edildiğini bildirmişlerdir.

Molenaar ve ark. (2018), N₂O ile mısır fidelerinde kromozom katlama işlemini standart kolhisin uygulaması ve alternatif herbisitler olan amipros-metil ve pronamid uygulaması ile dihaploidizasyon (DH) üretimi için uygun iki ortamı (DH fidanlığı ve sera) karşılaştırmışlardır. Uygulama ve emilim süresi, uygulama odasındaki hava, N₂O ve O₂'nin farklı basınç ve konsantrasyonları dahil olmak üzere çeşitli faktörler çimlenmiş fidelerin hayatta kalma oranları üzerine etkilerini analiz etmişler ve tohum bağlayan haploit bitkilerin oranı olarak çoğalmayı ölçmüşlerdir. Genel başarı oranı (OSR) çimlendirilmiş fidelerden elde edilen tohum seti ile D0 bitkilerinin oranı olarak belirlemişlerdir. En iyi N₂O uygulamasının OSR'si, yıla ve ortama bağlı olarak %6.4 ila

% 33.3 arasında değişirken, kolhisinin OSR'si % 5.0 ila % 28.1 arasında kalmıştır. Ayrıca N₂O uygulaması, herbisit uygulamasından önemli ölçüde farklı bir OSR'ye sahip olmadığını belirlemişleridir. Sonuç olarak, N₂O uygulaması, kromozom katlanma için kolhisin ve herbisit uygulamalarına rekabetçi bir alternatif ve güvenli olmasının yanı sıra imha edilmesinin kolaylığı gibi faydaları vurgulanmıştır.

Gordej ve ark. (2019), kış çavdarının diploit çeşit ve melezlerini N₂O kullanılarak zigotik otopoliploitleri teşvik etmeye çalışmışlardır. Bu çalışma sonucunda N₂O'nun zigotik tetraploit çavdar oluşturduğunu, elde edilen bitkilerin %86.0'ya kadarının tetraploit olduğunu, ortalama tetraploit oranını ise %51 olarak belirlemişlerdir. Bu yöntemle 9 yeni tetraploit çavdar genotipi oluşturmuşlardır. Elde edilen tetraploit bitkilerin yanı sıra düşük seviyede anöloit bitkiler (%9.7'ye kadar) de tespit etmişlerdir. Oluşturulan tetraploit bitkilerin nükleer DNA'sının bir kısmı C6-C7 nesillerinde elemine olmuştur.

Qu ve ark. (2019), 2n polen ve poliploit bitki elde etmek için iki diploit lale çeşidini (Synaeda Amor ve Carnaval de Rio) kullanmışlardır. Mayoz bölünen soğanlara 24 saat boyunca 6 atmosfer basınçta N₂O uygulanmışlardır. 2n polenleri, elde edilen bitkilerin ploidi seviyesi ve ebeveynlerine kıyasla polen büyüklüğündeki değişime göre tanımlamışlardır. Bu iki diploit lale çeşidinin N₂O uygulamalarıyla 2n poleni başarıyla teşvik etmişlerdir. Bununla birlikte iki çeşit arasında 2n polen teşviki açısından önemli farklılıklar oluşmuştur.

2.7. Orizalin ile Poliploidi Teşviki

Aleza ve ark. (2009) triploit çekirdeksiz narenciye elde etmek için diploit çeşitlerin polenleri ile tetraploit apomiktik olmayan çeşitleri melezlemeyi amaçladıkları çalışmada kolhisin ve orizalinin %0.1'lik uygulaması sonucunda 60 adet bitkiden kolhisin uygulamasıyla 9 adet canlı bitki, orizalin uygulaması sonucunda ise 20 adet canlı bitki tespit etmişler, bu bitkilerden 3'er tanesinin tetraploit olduğunu FC analizi sonucunda belirlemişler, ayrıca kolhisin uygulaması sonucunda 2 adet, orizalin uygulaması sonucunda ise 1 adet miksoiploit bitki belirlemişlerdir.

Sakhanokho ve ark. (2009), bodur süs zencefil türü olan *Hedychium muluense*'e 30, 60 ve 120 µM orizalini 24, 48 ve 72 saat ve 2.5, 5 ve 10 mM kolhisini 24, 48 ve 72 saat uygulayarak *in vitro* koşullarda triploit ve tetraploit bitki teşvik ettiklerini ve orizalinin poliploidi teşvikinde kolhisinden daha etkili olduğunu bildirmişlerdir. FC

analizi, kloroplast sayımı ve stoma sıklığının ploidi değerlendirme yöntemleri olarak stoma uzunluğundan daha etkili ve güvenilir olduğunu, en yüksek tetraploidi teşvik oranının embriyojenik kalluslara 72 saat 60 μM orizalin uygulaması sonucunda %15 olarak belirlemişlerdir.

Viehmánová ve ark. (2009), yacon (*Smallanthus sonchifolius*) bitkisinin *in vitro* boğum kültüründe oktoploit ($2n = 58$) bitki teşviki için 24 ve 48 saat 20, 25 ve 30 μM dozunda orizalin ve 1, 3 ve 5 mM dozunda kolhisine maruz bırakmışlardır. Orizalin uygulaması yapılan 240 boğumun %3.33'ünün heksadekaploid ($2n = 116$) bitki olduğunu FC analizi ve kromozom sayımlarıyla tespit etmişlerdir. Orizalin dozunun artışına zıt şekilde canlılık oranının azaldığı, en yüksek poliploidi etkinliğinin 25 μM orizalin dozunun 48 saat uygulaması olduğunu belirlemişler, *in vitro* boğum kültüründe orizalin uygulamalarının kromozom katlanması için etkili olduğunu bildirmişlerdir.

Miguel ve Leonhardt (2011) *Dendrobium*, *Epidendrum*, *Odontioda* ve *Phalaenopsis* orkidelerine (*Orchidaceae*) orizalin kullanılarak *in vitro* poliploit teşviki için bir protokol geliştirmişlerdir. Sıvı besin ortamındaki protokormlar ve protokorm benzeri cisimler (PLB'ler), 3 ve 6 gün boyunca 14.4, 28.9 ve 57.7 μM konsantrasyonlarında orizaline maruz bırakılmıştır. Daha yüksek konsantrasyonlar ve daha uzun uygulama süreleri, eksplantların hayatta kalma oranlarını düşürmüştür ancak üretilen poliploitlerin sayısını artırmıştır. Stoma bekçi hücre uzunlukları, birçok poliploidinin tanımlanmasına yardımcı olmuştur. *Dendrobium* ve *Odontioda* için 6 gün 14.4 μM , *Epidendrum* için 6 gün boyunca 57.7 μM ve *Phalaenopsis* için 3 gün 14.4 μM orizalin dozu optimal poliploidi elde etme dozu olarak belirlemişlerdir.

Podwyszyńska ve ark. (2011), Saçaklı Siyah Lale çeşidini ve ıslah edilmiş üç diploit klonunu (Pol-D 21, Pol-D 32 ve Pol-D 50) *in vitro* poliploidizasyon için kullanmışlardır. 5 ve 10 mg L^{-1} dozlarında orizalin ve amipros metil içeren rejenerasyon ortamına dinlendirilmiş soğanlardan elde edilen başlangıç eksplantlarının (çiçek sapı parçacıkları) inkübasyonunu yedi veya on dört gün süreyle sağlamış, daha sonra eksplantları antimitotik maddeler olmayan aynı ortama aktarmış ve sırasıyla her dört, altı ve sekiz haftada bir olmak üzere üç kez alt kültüre almış, rejenere sürgünlerin 14 hafta 5 °C'de soğutulmasıyla soğan oluşumunu teşvik etmişler, elde ettiği soğanları *ex vitro*'da köklendirmişlerdir. FC analiziyle iki genotipten tetraploit genotipler elde etmişler, tetraploit bitkiler Pol-D 21 genotipinde dört (%28.6) ve Saçaklı Siyah genotipinde ise on altı tane (% 33.3) oranında tetraploit bitki elde etmişlerdir. Her iki mutajenin de tetraploit bitki teşvik ettiğini bildirmişlerdir.

Ming ve ark. (2012) kolhisin (%0, 0.02 ve 0.04) ve orizalinin (%0, 0.006 ve 0.01) 24 ve 48 saat muamele ederek üç *lilium* türünde (*L. pumilum*, *L. sargentiae*, *L. tsingtauense*) tetraploit zambak elde etmeyi amaçlamışlardır. Kolhisin uygulamalarında en yüksek tetraploit yüzdesi, *L. pumilum*'ye %0.04 dozunun 24 saatlik uygulamasıyla, *L. sargentiae* ve *L. tsingtauense*'de ise tetraploit bitkiler %0.02 ve %0.04 kolhisin dozlarının 48 saat uygulamalarından elde etmişlerdir. Tetraploit teşviki için optimal orizalin uygulama süre ve dozunu, *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 dozu belirlemişlerdir. Orizalin zambak türlerinde tetraploitleri teşvik etmede kolhisinden daha etkili bulunmuştur. Mutajenin muamele süresi ve dozu, hayatta kalma oranı, soğan oluşumu ve kromozom katlamasına etkileri önemli bulunmuş, stoma özellikleri ve yaprakların morfolojik ve anatomik yapısının zambakların ploidi seviyesiyle ilişkili olduğunu, kromozom sayımı ve FC analiziyle doğrulanmıştır.

Chung ve ark. (2014), *Calanthe discolor* ve *C. sieboldii* türlerinin melezlenmesi sonucunda elde edilen tohumlara %0.05 ve 0.1 kolhisin dozunu 3 ve 7 gün, %0.003 orizalin dozunu ise 1, 2, 4 ve 7 gün uygulayarak tetraploit ve miksploit bitkileri FC analiziyle tespit etmişlerdir. Bu uygulamalardan en etkili olanı ise tohumlara 0.003 orizalin dozunun 1 (%86 tetraploit, %14 miksploit) veya 2 (%85 tetraploit, %15 miksploit) gün uygulaması olduğunu belirlemişlerdir. Sitolojik ve morfolojik sonuçların FC analiz ile doğrulandığını, tetraploit bitkilerin stoma yoğunluğu daha az ve stoma boyutlarının önemli ölçüde daha büyük, yaprakları diploidlere göre daha yuvarlak ve kısa olduğunu bildirmişlerdir.

Gallone ve ark. (2014), *Hebe Comm. ex Juss.* Oratia Beauty bitkisinde tetraploidiyi teşvik etmek için *in vitro* boğum kültüründe kolhisin (500 ve 1000 μ M) ve orizalin (11.5, 58 ve 289 μ M) kullanmışlar ve tüm sağ kalım oranlarını %73'ün üzerinde bulmuşlardır. Tüm eksplantlar köklendirilmiş, iklimlendirilmiş ve farklı ploidi seviyelerine sahip bitkilerin morfolojik özelliklerini karşılaştırmışlar, diploit, miksploit ve poliploit bitkileri FC analiziyle doğrulamışlar ve en yüksek tetraploit oranını orizalinde (289 μ M) %45.7, kolhisinde (1000 μ M) %28.6 olarak tespit etmişlerdir. Diploit ve tetraploitlerin yaprak uzunluk ve genişlikleri önemli ölçüde farklılık göstermezken, tetraploitler diploidlere kıyasla daha büyük stoma uzunluğu ve daha düşük stoma yoğunluğu belirlenmiştir.

Lam ve ark. (2014), yaptıkları çalışmada triploit *Acacia crassicarpa* elde etmek amacıyla tohumlara 24 saat %0.005, %0.02, %0.05 ve %0.5 dozunda kolhisin ve

%0.0005, %0.005 ve %0.01 dozunda orizalin uygulayarak miksploit ve tetraploit bitkileri FC analiziyle tespit etmişlerdir. İki mutajen uygulamasında da doz artışına zıt bir şekilde canlılık oranı azalmış, elde ettikleri bitkilerin nükleer DNA miktarlarını diploit, triploit ve tetraploitler için sırasıyla 1.75, 2.74 ve 3.47 pg olarak tespit etmişlerdir. Orizalin uygulaması sonucunda elde ettikleri en yüksek miksploit (%26) ve tetraploit (%6) oranını %0.01 dozuyla belirlemişlerdir.

Sinski ve ark. (2014) kolhisin ve orizalini iki çekirdeksiz üzüm çeşidinde kromozom katlama için sürgün uçları ve somatik embriyolara uygulamışlardır. Organogenez ve somatik embriyojenez yoluyla canlı bitki rejenerasyonunda orizalin konsantrasyonları ve uygulama süresinin artırılmasıyla doğrusal azalma tespit etmişlerdir. Crimson Seedless ve BRS Clara'nın sürgün uçları ve somatik embriyoları için daha yüksek bitki geri kazanım oranlarını teşvik eden koşullar, orizalin ve kolhisin ile kromozom katlama deneylerinde kullanmışlardır. Oluşturulan protokollerin, her iki çeşitte de %30'un üzerinde kimerik olmayan ototetraploit bitkilerin geri kazanılmasına izin verdiğini, stoma boyu parametreleri, rejenerantların ploidi seviyesi ile istatistiksel olarak ilişkili ve ön poliploidi taraması için etkili olduğunu, çekirdeksiz üzümlerin ototetraploit soyları, daha ileri agronomik değerlendirmeler için *Vitis* germplazmasına dahil etmişlerdir. Bu çalışma, asmalarda *in vitro* orizalin kaynaklı poliploidizasyon ve bitkilerde kromozom katlanmasını optimize etmek için matematiksel modellemenin kullanıldığı ilk rapordur.

Xie ve ark. (2015), 101-14 Millardet et de Grasset [(*Vitis riparia* × *V. rupestris*) (101-14 Mgt) (2n = 2x = 38)] × *Muscadinia rotundifolia* cv. Trayshed (2n = 2x = 40) melezlemesi sonucunda tetraploit bitkilerin *in vitro* koşullarda teşvik için bir protokol oluşturmuşlardır. Farklı eksplant materyalleri, 24, 48 ve 72 saat üç dozda kolhisin (250, 625 ve 1250 µM) ve orizalin (5, 15 ve 30 µM) antimitotik ajanlarına maruz bırakmışlardır. *In vitro* sürgün uçları, anterler ve proembriyojenik kültürler yeniden oluşturulmuş ve bunların ploidi seviyelerini kromozom sayımları ve FC analiziyle doğrulamışlardır. Genel olarak yaprakların anatomik özellikleri, yapraktaki stoma boyutu ve stoma bekçi hücrelerindeki kloroplast sayısının asmadaki ploidi seviyeleriyle ilişkili bulunmuş, kromozom sayımları ve FC analizleriyle stoma bekçi hücrelerdeki kloroplastların sayısı ve stoma boyutları güvenilir işaretler sunduğu, stoma analizlerinin diploit ve tetraploit bitkiler arasında açık farkları ortaya koyduğunu ve kromozom sayımları ve FC analizi öncesinde stoma boyut ve kloroplast sayım ölçümlerinin uygun olacağını, yaptıkları çalışmayla asma anaç ıslah programlarında kullanılmak üzere

tetraploit bitkilerin potansiyel olarak verimli *Vitis* × *Muscadinia* melezlerinden kolay ve etkili bir şekilde elde edilebileceğini bildirmişlerdir.

Tomé ve ark. (2016), *Solanum commersonii* ssp.'nin iki diploit klonunda tetraploit bitkilerin teşviki ve yaprak anatomisi üzerine etkisini araştırmak için boğum kültüründe kolhisin (3.5, 5.0 ve 6.5 mM dozunu 72 saat) ve orizalin (10, 30 ve 50 µM dozunu 24 saat) anti-mitotik ajanlarına maruz bıraktıktan sonra MS ortamında 60 gün gelişimini sağlamışlardır. 6.5 mM kolhisinin 72 saat ve 50 µM orizalinin 24 saat uygulanması sonucunda *in vitro* ortamda canlı bitki kalmamış, 10-50 µM orizalin dozunun 24 saat uygulamasında ise tetraploit bitki teşviki sağlanmıştır.

Bosco ve ark. (2017), yabani tip (2n) ve ototetraploit (4n) asmalardaki global CpG (bir sitozin nükleotidinin 5' → 3' yönü boyunca lineer baz dizisinde bir guanin nükleotidi tarafından takip edilen DNA bölgeleridir) metilasyon miktarını karşılaştırmışlardır. Crimson Seedless, BRS Clara, 1103 P, IAC 572 Jales ve IAC 313 Tropical çeşitlerinin sürgün ucu meristemlerini 16 °C'de 24 saat 80 µM orizalin ilave edilmiş *in vitro* sıvı ortamda bitkiler tamamen geliştirilip köklendirildikten sonra sitogenetik ve FC analizlerini yapmışlardır. Diploit kontrol bitkileri *in vitro* ortamda üretmişlerdir. Ploidi ve global metilasyon varyasyonunun etkileri, korelasyon analizleri ve Genelleştirilmiş Doğrusal Karışık Modeller (GLMM'ler) ile değerlendirmişlerdir. Kullandıkları tüm çeşitlerde canlı ototetraploit bitkiler elde etmişler, antimitotik ajan dozu, uygulama süresi ve rejenerasyon sistemi poliploidi teşvikini önemli ölçüde etkilemiştir. Kimerik olmayan tetraploit bitkilerin geri kazanımı, çeşitlere bağlı olarak %8.6 ila 30 aralığında değişmiştir. Epidermal yapı morfolojisinin ışık mikroskobu analizleri, kromozom sayısı ile stoma uzunluğu ve genişliğinin doğrusal ölçümleri ve stoma bekçi hücrelerindeki kloroplast sayısı arasında pozitif bir korelasyon belirlemişlerdir. Birim alandaki stoma yoğunluğu, ploidi seviyesi ile negatif korelasyon gösterdiğini, Global genom metilasyon seviyeleri, ototetraploit bitkilerde, yabani tip ve diploit *in vitro* rejenere bitkilere kıyasla daha yüksek bulunmuştur. Melezlerden elde edilen ototetraploitlerde metillenmiş CpG seviyeleri, *V. vinifera*'ya kıyasla daha yüksek tespit etmişlerdir. Daha fazla transkripsiyon analizleri, yapay olarak teşvik edilmiş asma poliploitlerinde bir "genom şoku" yanıtı olarak metilasyonun öngörülen rolünü aydınlatmaya yardımcı olabileceğini bildirmişlerdir.

Pliankong ve ark. (2017), *Capsicum frutescens* L.'ye karanlık koşullar altındaki oda sıcaklığında çimlenmeden önce 6 saat kolhisin (0, 100, 200 ve 300 mg L⁻¹) ve orizaline (0, 10, 20 ve 30 mg L⁻¹) daldırarak poliploit fideleri teşvik etmişlerdir. Sonuçta

300 mg L⁻¹ kolhisinin *C. frutescens* L.'de %70 oranında en yüksek poliploidi teşvikini, 20 ve 30 mg L⁻¹ orizalinin ise %40'lık dozunun aynı oranda poliploidiyi teşvik ettiğini belirlemişlerdir. Poliploit bitkilerin stoma bekçi hücre boyutu ve meyve boyutunun kontrollerden daha büyük olması poliploit fidelerin hızlı bir şekilde taranmasını kolaylaştırmıştır. Poliploit bitkilerin kontrollerden daha fazla miktarda kapsaisin ürettiğini de tespit etmişlerdir. 300 mg L⁻¹ kolhisin ile muamele edilen tohumlardan elde edilen meyvelerin kuru ağırlıkta kapsaisin miktarı 4.55 mg g⁻¹, kontrolde ise 3.32 mg g⁻¹ olarak belirlemişlerdir. 30 mg L⁻¹ orizalin ile muamele edilen tohumlardan elde edilen meyvelerde ise kuru ağırlıkta 4.44 mg g⁻¹ kapsaisin tespit etmişlerdir.

Menezes-Sá ve ark. (2019), diploit orkidelerin FC ve stoma analizleri kullanarak yapay poliploidizasyonun teşvikini ve doğrulamayı amaçlamaktadırlar. Eksplantları 0, 2.5, 7.5 ve 12.5 mM konsantrasyonlarda 24 ve 48 saat kolhisin ve 0, 10, 30 ve 50 µM konsantrasyonlarda orizaline 3 ve 6 gün maruz bırakmışlardır. FC analizi için her bitkiden bir yaprak örneği almışlar, çekirdekleri serbest bırakmak için ezmişler ve propidyum iyodür ile boyamışlardır. FC analizine ek olarak, antimitotik işleme tabi tutulmuş bitkilerin ploidi seviyesi stoma gözlemleriyle değerlendirmişlerdir. Yoğunluğun, işlevselliğin ve stomatal indeksin değerlendirilmesinde genç yaprakları kullanmışlardır. *C. tigrina*'ya uygulanan kolhisin konsantrasyonları ve sürelerinde tatmin edici poliploidi teşviki sağlamış ve 48 saat 12.5 mM dozunda daha fazla sayıda poliploit birey elde etmişler, orizalin uygulanan bitkilerde ise kromozom katlama meydana gelmediğini bildirmişlerdir.

Zeng ve ark. (2019) heksaploidinin *in vitro* teşviki ve (*Populus alba* × *P. glandulosa*) × *P. tomentosa*'deki morfolojik ve anatomik özelliklere etkilerini araştırmışlardır. Tübülün engelleyicisi olarak orizalin ile bir triploit klonda [(*Populus alba* × *P. glandulosa*) × *P. tomentosa*] *in vitro* kromozom katlamasını teşvik etmişlerdir. 5 ve 10 mm'lik boğum çeliklerini 24, 48 ve 72 saat 2.5 ve 5.0 mg L⁻¹ dozunda orizaline maruz bırakmışlardır. Farklı orizalin dozu, maruz kalma süresi veya boğum uzunluğunun hayatta kalma oranlarını önemli ölçüde etkilediğini; ancak tüm oranlar kontrollerdekinden önemli ölçüde daha düşük olduğunu, en yüksek heksaploidi sıklığını 5 mm'lik boğumların 72 saat 5 mg L⁻¹ dozunda orizalin ve 10 mm'lik boğumların 5 mg L⁻¹ orizalin ile 24 saat uygulananlarında %100 olarak belirlemişlerdir. Hekzaploit bitkileri morfolojik ve anatomik özellikleriyle triploit bitkilerden ayırt etmişlerdir. Kromozomu katlanan bitkilerin yapraklarındaki kalınlık ve klorofil içeriğinde artış tespit etmişlerdir. Hekzaploitlerin stomaları daha büyük ve orijinal triploitlerden daha

düşük bir yoğunluğa sahip olduğunu belirlemişlerdir. Özellikle, kromozomu katlanan bitkilerin triploit orijinlerine kıyasla kök sıklığının daha az, köklerinin daha kısa ve daha büyük çaplara sahip olduğunu, kök özelliklerinin varsayılan hekzaploitlerin tanımlanması için uygun parametre olduğunu, çünkü bunların kolayca ve hızlı bir şekilde değerlendirilebilir olduğunu bildirmişlerdir.

Bae ve ark. (2020) orizalinin farklı konsantrasyon ve yöntemlerle karpuzda (*Citrullus lanatus*) poliploidizasyon üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Yaptıkları ilk yöntemde karpuz fidelerinin sürgün ucuna farklı konsantrasyonlarda (0, 5, 10, 15, 20 ve 25 mg L⁻¹) orizalin uygulaması yapmışlar, poliploidiyi 10 mg L⁻¹ veya daha düşük konsantrasyonlarda teşvik etmişlerdir. 15 ve 20 mg L⁻¹ uygulamalarında miksploit bitkiler gözlemiş ve tetraploit bitkilerin %84'ünü 25 mg L⁻¹ uygulamasından elde edilmiştir. Orizalinin içine yüzey genişletici tween 20'nin eklenmesi, tetraploit bitki elde edilmesi için tek başına orizalin kadar etkili olmamıştır. İkinci denemede tohumları farklı dozlarda orizalinde (0, 30 ve 35 mg L⁻¹) bekletmişlerdir. Bu maksatla, 30 mg L⁻¹ orizalin dozunun poliploidiyi teşvik etmediğini fakat 35 mg L⁻¹ uygulamasının bitkilerin %25 oranında teşvik ettiğini belirlemişlerdir. Tetraploit bir bitkinin ikinci gerçek yaprağının morfolojik özellikleri, diploit bitkininkinden farklı olarak küçük, kalın ve buruşuk bir yapı gösterdiğini de tespit etmişler, ayrıca tetraploit bitkilerde birim alandaki stoma sayısının azaldığını ve stomaların boyutunun iki katına çıktığı, uygulama yapılan bitkilerin kromozomları sayılarak tetraploit bitkiler (2n = 4x = 44) doğrulanmıştır. Sürgün ucuna 25 mg L⁻¹ orizalin uygulamasının en etkili tetraploit karpuz elde etme uygulaması olduğunu tespit etmişlerdir.

Lan ve ark. (2020), *Rhododendron fortunei*'nin çimlenen tohumları farklı dozlarda 16 saat orizaline maruz bırakılmış ve FC analiziyle ploidi düzeyleri değerlendirilerek 27 tetraploit ve yedi oktoploit hat olmak üzere toplam 34 adet poliploit *R. fortunei* hattı belirlemişler ve 7.5 mg L⁻¹ orizalin dozunu optimal poliploit dozu olarak tespit etmişlerdir. Diploit bitkilerle karşılaştırıldığında, tetraploit ve oktoploit bitkiler daha yavaş büyüme oranları ve daha fazla yaprak epidermal tüyleri olan daha kalın ve yuvarlak kıvrılmış yapraklara sahiptirler. Ayrıca, poliploit bitkilerin yapraklarında daha düşük yoğunlukta daha büyük stomalarla birlikte klorofil içeriği de önemli ölçüde artmış, bu da daha koyu yeşil yaprak rengine yol açmıştır.

Pehlivan (2020), Sultani Çekirdeksiz ve Uslu üzüm çeşitlerine *in vitro* koşullarda koltuk altı meristemi ve kallus eksplantına sıvı ve katı MS besin ortamında 0, 20, 30, ve 40 µM dozunda 24, 36, 48 saat orizalin uygulamış, her iki çeşitte de en düşük

canlılık oranını kontrolde belirlerken buna en yakın canlılık oranını ise koltuk altı meristemi ve kallus eksplantında 20 μM orizalin dozunda tespit etmiştir. Sultani Çekirdeksiz çeşidinde koltuk altı meristemi eksplantı için 30 μM dozunun 48 saat, kallus eksplantı için 40 μM dozunun 24 saat uygulamaları, Uslu çeşidinde ise koltuk altı meristemi eksplantı ve kallus eksplantı için 30 μM dozunun 48 saat uygulamalarını LD_{50} değeri olarak belirlemiştir. Orizalin ve kolhisin uygulamaları sonucunda her iki çeşitte de yapılan FC analizleri sonucunda diploit yapının devam ettiğini bildirmiştir.

Ridwan (2020), orizalin kullanılarak tetraploit *Moringa* (*Moringa oleifera* Lam.) elde etme amacıyla çimlenen tohumlarını 1, 3 ve 5 gün 15 μM , 30 μM , 60 μM ve 120 μM dozunda orizalin çözeltisinde bekletmişlerdir. İki tetraploit *Moringa* bitkisi ve iki kimerik diploit ve tetraploit genomu olan bitki belirlemiş, çimlenen tohumların 15 veya 60 μM orizalin dozunda 1 gün bekletilen *Moringa*'da etkili bir şekilde otopoliploidiyi teşvik etmiştir. Tetraploit bitkiler, diploit muadili ile karşılaştırıldığında düşük stoma yoğunluğu, daha büyük stoma boyutu ve daha büyük yaprak boyutu gibi tetraploitin tipik morfolojik özelliklerini göstermiştir.

Ahmadi ve ark. (2021), *Zea mays* L.'ın (mısır) kendilenmiş S61 ve K1263/17 hatlarına orizalin (0, 5, 10, 50 ve 100 mg L^{-1}), trifluralin (0, 5, 10, 50 ve 100 mg L^{-1}) ve kolhisinin (0, 250, 500, 1000 ve 5000 mg L^{-1}) farklı sürelerde (12, 24 ve 48 saat) uygulanmasıyla ototetraploit bitki teşvikini test etmişlerdir. En yüksek tetraploit oranları, 24 saat 50 mg L^{-1} orizalin (%11.1) ve 24 saat (%12.2) ve 48 saat (%15.8) 1000 mg L^{-1} kolhisin uygulamasını takiben kendilenmiş hat olan S61'de tespit etmişlerdir. K1263/17 kendilenmiş hattında, her ikisi de 24 saat 10 mg L^{-1} (%2.3) ve 50 mg L^{-1} (%6.9) trifluralin uygulamasıyla tetraploit bitkiler elde etmişlerdir. 24 saat 1000 mg L^{-1} kolhisin uygulamasıyla daha yüksek oranda tetraploit bitki (%19.5) elde etmişlerdir. Diploit orijinleriyle karşılaştırıldığında, tetraploit bitkiler nispeten daha düşük hayatta kalma oranı göstermiş ve K1263/17 türevli tetraploit bitkilerin sadece %33.3'ünün hayatta kaldığı ve geliştiğini belirlemişlerdir. Ayrıca, hayatta kalan tüm rejenerantlar, yedinci yaprak aşamasına kadar değiştirilmiş ploidi seviyelerini korurken, tozlanma öncesi ploidi seviyesini diploit durumuna geri döndürdüğünü belirlemişlerdir. Bitki boyu, gövde çapı ve yedinci yaprakların toplam klorofil içeriği dışında, diploit ve yeniden diploitize olan tetraploit bitkiler, değerlendirilen diğer morfolojik özellikler açısından önemli ölçüde farklılık göstermediğini bildirmişlerdir. *Z. mays* L.'ta poliploidi teşviki mümkün olsa da ototetraploit bitkiler, bu türde genom küçültme mekanizmasını

daha ayrıntılı olarak incelemek için değerli bir platform sunduğunu, tozlanmasından önce eş zamanlı olarak genomlarını yeniden diploitize ettiklerini tespit etmişlerdir.

Cho ve ark. (2021), yaptıkları çalışmada yeni bir çeşit olan *Cucumis melo* Chammel'in poliploidizasyonu üzerindeki orizalinin etkilerini incelemişler, orizalinle uyarılan 58 adet diploit Chammel fidesinden 12 adet tetraploit bitki elde ettiklerini FC analiziyle doğrulamışlardır. Tetraploit bitkileri kendilemişler ve tohumları hasat ederek tohum ve fideler morfolojik ve sitogenetik analizlerle diploitleriyle karşılaştırmışlardır. Tetraploitlerin yaprak kalınlığı diploit orijinlerine göre önemli ölçüde fazla, bununla birlikte tetraploitlerin yaprak sapının uzunluğu ise daha kısadır, tetraploitlerdeki stoma uzunluğu ve genişliği diploit orijinlerinden daha uzundu, ancak birim alana stoma sayısı daha az, diploitler ve tetraploitler için kromozom sayısının sırasıyla 24 ve 48 olduğunu tespit etmişlerdir.

Deans ve ark. (2021), orizalin ve nitrotirozini *Hydrangea macrophylla* Robert ve *Hydrangea serrata* MAK20'de poliploidi teşviki için *in vitro* mitotik engelleyiciler olarak denemişlerdir. İlk olarak, MAK20 çeşidinin sürgün uçlarını 0, 2, 4, 6 ve 8 gün 15 μ M orizalinle muamele etmişler ve 8 hafta sonra sürgünlerin ploidi seviyesini belirlemişlerdir. Regresyon analiziyle poliploit bitkilerin (tetraploit ve miksploit sürgünler) oranını maruz kalma süresiyle birlikte arttığını bildirmişlerdir. Araştırmayı takip sırasında MAK20 ve Robert çeşitlerine orizalin (0 ve 15 μ M) ve nitrotirozin (MAK20 için 0, 25, 50 ve 100 μ M ve Robert için 0, 12.5, 25, 50 ve 100 μ M) faktöriyel deneme düzeninde muamele etmişlerdir. Orizalin, nitrotirozini ve bunların kombinasyonu, Robert çeşidi için poliploit frekansını etkilemiş ve bu sayede orizalin (15 μ M) ve nitrotirozin (50 μ M) kombinasyonu %50'lik en yüksek poliploit bitki teşvikine neden olduğunu bildirmişlerdir. MAK20 çeşidi için orizalin uygulamasıyla %30.4 poliploit frekansı oluşurken, nitrotirozin ve nitrotirozin ile orizalin kombinasyonu sonucunda poliploit bitki tespit edememişlerdir. Bu ototetraploit Robert ve MAK20 çeşidinin morfolojisi ve polen çimlenmesi *ex vitro* ortamda 1 yıl geliştirildikten sonra önceden geliştirilmiş ototetraploit *Hmacrophylla* David Ramsey çeşidi bitkileri ve diploit benzerleriyle karşılaştırmışlardır. Diploitlerle karşılaştırıldığında, tetraploit ortancaların daha büyük yaprakları, daha kalın gövdeleri, daha düşük yaprak alanı/taze ağırlık oranları ve daha uzun boğum aralarının olduğunu belirlemişlerdir. Tüm tetraploitler bitki başına daha az çiçek salkımı sergilemesine rağmen, her iki *H. macrophylla* çeşidinin çiçek çapları daha büyük ve David Ramsey çiçeklenme başına daha fazla sayıda gösterişli çiçek (genişletilmiş, dekoratif sepaller ile

steril çiçek) sergilediğini tespit etmişlerdir. Polen çimlenme oranlarının tüm tetraploit hatlarda büyük ölçüde azaldığını ancak canlılığı bir miktar koruduğunu da belirlemişlerdir. Bu sonuçlarla *Hydrangea* sp'nin *in vitro* poliploit bitki teşviki için etkili bir protokol sağladığını ve tetraploit fenotipleriyle ilgili bazı arzu edilen özellikleri belgelediğini bildirmişlerdir.

Kara ve ark. (2021), Ekşi Kara ve Gök Üzüm (*Vitis vinifera* L.) çeşitlerine N₂O (5 bar) ve orizalin (25 ve 100 µM) uygulanması yapmışlar, iki çeşit ve tüm uygulamalarda kontrole göre canlılık oranı ve sürgün uzunluğunda azalma, stoma uzunluğu ve genişliğinde artış, stoma yoğunluğunda azalma ve kloroplast sayısında ise artış tespit etmişler, Ekşi Kara çeşidinde 25 µM 48 saatlik orizalin uygulamasından seçilen sadece bir fidenin FC analiziyle tetraploit olduğunu belirlemişlerdir.

Mori ve ark. (2021), *Limonium sinuatum* Early Blue tohumlarına %0, %0.0005, %0.001 ve %0.005 dozunda orizalinin 24, 48 ve 72 saat uygulamasıyla tetraploit ve miksploit bitkileri başarıyla elde etmişlerdir. FC analiziyle doğrulanan üç tetraploidin tümü, diploit orijinlerine kıyasla yaprak genişliği, stoma boyutu, çiçek uzunluğu ve polen genişliği artmış ve tetraploitlerin polen tanelerinde dört, diploitlerinde üç tane açıklık belirlenmiş, orizalin uygulaması hayatta kalma oranını azalmış, tetraploit bitkilerin yaprak uzunluk ve yaprak genişliği, stoma uzunluk ve genişliği artarken birim alana düşen stoma sayısı azalmıştır.

Navrátilová ve ark. (2021) yaptıkları çalışmada, *in vitro* bitki ıslahı için etkili bir protokol bulmayı ve antimitotik ajan olan orizalin kullanımına dayalı iki deneysel yöntemi kullanarak diploit *Thymus vulgaris*'in (2n = 30) *in vitro* poliploidizasyonunu çalışmışlardır. Elde ettikleri sürgünlerin ploidi seviyesini FC analiziyle kontrol etmişler, poliploidiyi teşvik için en etkili koşulların 0.346 ve 1.73 mg L⁻¹ orizalin olan ortamında iki hafta bekletilmesi olduğunu belirlemişlerdir. Canlı poliploit sürgünleri daha fazla değerlendirme için çoğaltıp köklendirme işleminin ardından steril olmayan sera ve arazi koşullarına aktarmışlardır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. 41 B

41 B Profesör Millardet tarafından 1882'de Bordeaux'da Chasselas (*Vitis vinifera* L.) × *Vitis berlandieri* Planch. melezlenmesiyle ıslah edilmiştir. 41 B ilk defa Marquis de Grasset tarafından Pozenas'da test edilmiştir. Vejetasyon periyodu kısa olup Fransa'nın kireçli Charetes ve Champagne bölgelerinde hemen hemen sadece bu anaç kullanılırken Güney Fransa'da sofralık çeşitlerin olgunlaşmalarını erkene almak için de kullanılmaktadır. 41 B'nin ilk yıllardaki gelişmesi yavaş olmakla birlikte olgun asmalarda tane tutumu ve verimi yüksektir. Filokseraya dayanımı yeterli fakat tamamen dayanıklı olmayıp kuvvetli bir gelişim gösterir. Topraktaki kirece dayanımı %80–90 toplam, %40 aktif kireç düzeyinde olup bu tür topraklarda hemen hemen alternatifsiz bir anaçtır. Tuza dayanımı zayıftır ve yapraklarının küllemeye karşı korunması gerekmektedir. Köklenmesi iyi değildir ve köklenme oranı çubukların olgunlaşmasına bağlı olarak %15-40 aralığında olup *Riparia*'nın köklenmesi %100 kabul edilirse, 41 B %70 düzeyindedir. *V. berlandieri* geni taşıdığı için yavaş veya zor köklenmesi masa başı aşısındaki başarısını azaltır. Bununla birlikte yerinde aşılama masa başında aşılama göre daha iyi sonuç vermektedir. Yerinde aşılama aşısı başarısı %80–90 aralığındadır. Köklerinin derine gitmesinin yanında ilk senelerde toprak altı aksamı, daha sonraki yıllarda toprak üstü aksamı gelişme göstermektedir (Galet, 1979; Kara, 2017).

Denemede kullanılan 41 B asma anacının çelik ve tohumları Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü asma genetik koleksiyonu bağından temin edilmiştir.



Şekil 3.1. Denemede kullanılan 41 B asma anacı çekirdek ve çelikleri

3.1.2. Fercal

Fercal 1983’de INRA Fransa’da Bağcılık Araştırma İstasyonu’nda Pont de la Maye, Bordeaux’da Pouget ve Ottenwaelter tarafından *Vitis vinifera* x *Vitis berlandieri* melezinin 333 EM ile melezlenmesi sonucunda elde edilmiştir. Buradan dünyaya yayılmıştır. Çok yüksek pH’ya sahip topraklarda büyük bir potansiyel sunmaktadır. Pamuk kök çürüklüğü, filoksera ve nematoda toleranslı olduğu bilinmektedir (Kara, 2017; VIVC, 2021).

Denemede kullanılan Fercal asma anaçlarının çelikleri Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü asma genetik koleksiyonu bağından, Fercal asma anacı tohumları ise Manisa Bağcılık Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü’nden temin edilmiştir.



Şekil 3.2. Denemede kullanılan Fercal asma anacı çekirdek ve çelikleri

3.1.3. Kyoho

1945 yılında Y. Ohinoue, tarafından Ishihara wase ve Centennial melezlemesi sonucunda elde edilmiştir. Ishihara wase ve Centennial çeşitleri sırasıyla Campbell Early (*V. labruscana*) ve Razakı (*Vitis vinifera* L.) çeşitlerinden meydana gelen tetraploit ($2x=4x$) somatik mutantlardır. Kyoho, taneleri iri (12 ila 14 g), mor renkte ve foxy aromasına sahiptir. Tanelerde tam olgunluk döneminde çatlama görülebilir. Taneleri kısa raf ömrüne sahiptir. Hastalıklara dayanımı orta derecedir (Kara, 2017; OIV, 2017).

Denemede kullanılan Kyoho üzüm çeşidi Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü asma genetik koleksiyonu bağından temin edilmiştir.

3.1.4. Orizalin

Orizalin, dinitroanilin sınıfından bir herbisittir. Orizalin, yabancı ot kontrolünde kullanılan sentetik herbisit olup hücre bölünmesi sırasında mikrotübül düzenliğini bozar. Genellikle kolhisine göre daha etkilidir çünkü bitki tubulinler için daha yüksek bir afiniteye sahiptir (Doležel ve ark., 1994). Son zamanlarda yayınlanan bir dizi raporda orizalinin kolhisine alternatif olduğu bildirilmiştir. Potansiyel bir ikame olarak kullanılabilir, çünkü kolhisin ile karşılaştırıldığında en azından çalışmak daha güvenlidir (Ascough ve ark., 2008). Orizalin kullanılarak birçok bitki türünde

kromozom katlama başarılı bir şekilde yapılmıştır. Bunlardan bazıları; *Vitis* (Sinski ve ark., 2014; Xie ve ark., 2015), *Alocasia* (Thao ve ark., 2003), *Bixa orellana* (de Carvalho ve ark., 2005), *Buddleja* (Dunn ve Lindstrom, 2007), *Buddleja davidii* (Eeckhaut, 2003), *Buddleja globosa* (Van Laere ve ark., 2009), *Chaenomeles japonica* (Stanys ve ark., 2006), *Citrus* (Wu ve Mooney, 2002; Aleza ve ark., 2009), *Dracaena deremensis* (Teng ve Leonhardt, 2007), *Hypericum* (Meyer ve ark., 2009), *Lilium longiflorum* (Takamura ve ark., 2001), *Malus* (Bartish ve Weeden, 1996), *Musa* spp. (Ganga ve Chezhiyan, 2002), *Paspalum notatum* (Quesenberry ve ark., 2010), *Rhododendron* (Väinölä, 2000), *Rosa* (Kermani ve ark., 2003), *Smallanthus songifolius* (Viehmánová ve ark., 2009), *Solanum* (Greplova ve ark., 2009), *Tulipa gesneriana* (Chauvin ve ark., 2005) ve *Watsonia lepida* (Ascough ve ark., 2008) olarak sıralanabilir.

Denemede kullanılan 19044-88-3 CAS numaralı orizalin ($C_{12}H_{18}N_4O_6S$, moleküler ağırlık:346,4), Yapılcın Sağlık Gereçleri Pazarlama ve Ticaret Ltd.Şti aracılığıyla Duchefa Biochemie firmasından temin edilmiştir.



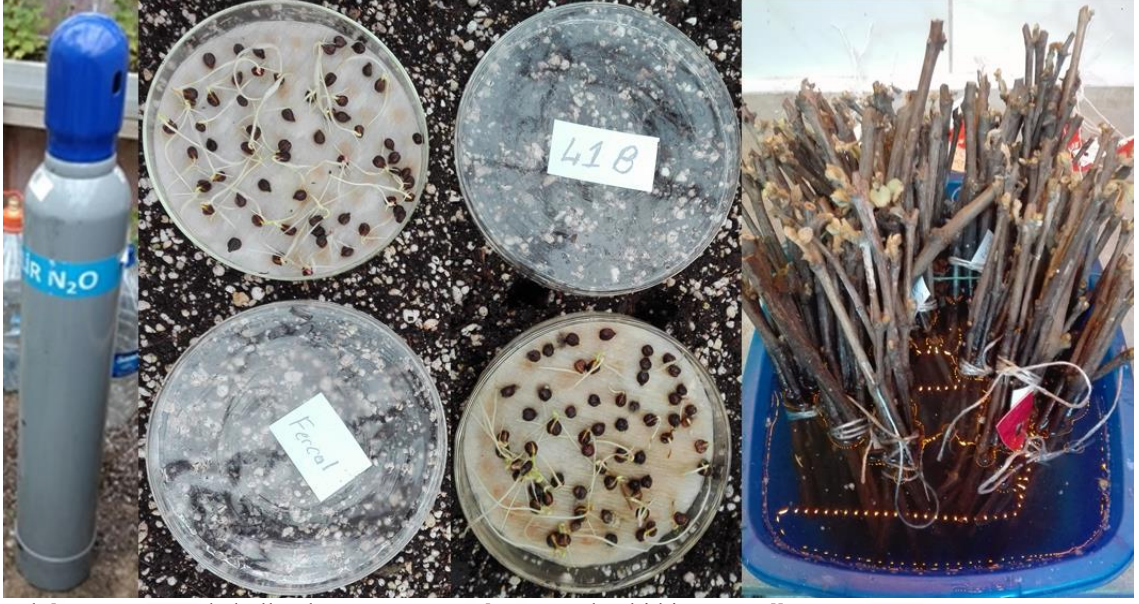
Şekil 3.3. Denemede kullanılan orizalin ve uygulama yapılan asma anacı fideleri

3.1.5. N₂O (diazotmonoksit, nitröz oksit, gülme gazı)

N₂O, insanlar tarafından da kullanılan, kolay bir şekilde ulaşılabilen soluma anestetikidir. N₂O ile muamele edilen HeLa hücrelerinde c-mitoz başarılı bir şekilde teşvik edilir. Hayvan hücrelerinin N₂O gazı ile muamele edilmesi, iğ mikrotübüllerini

parçalayarak iğlerde düzensizlik oluşturmuştur (Brinkley ve Rao, 1973; Kitamura ve ark., 2009). Bitkilerde N₂O ile teşvik edilen poliploidi için çeşitli araştırmacılar başarılı sonuçlar elde etmişlerdir. Bunlardan bazıları; *Crepis capillaris* 10 atm N₂O 4-6 saat (Östergren, 1954), *Phalaris paradoxa* ve *Phalaris canariensis* 10 atm N₂O 4-12 saat (Östergren, 1957), *Triticum dicoccum* (Khapli) 3-6 atm N₂O 5-10-15 saat (Kihara ve Tsunewaki, 1960), *Tulipa* spp. 4-9 atm N₂O minimum 7 saat (Zeilinga ve Schouten, 1968), *Avena sativa* L. 4 atm N₂O (Dvorak ve ark., 1973), *Triticum aestivum* ve *Hordeum vulgare* 4 atm N₂O 24 saat (Dvorak ve ark., 1973), *Hordeum vulgare* × *Hordeum bulbosum* 21.1×10³ kg m⁻² (≈30 psi)- 31.6×10³ kg m⁻² (≈45 psi)- 42.2×10³ kg m⁻² (≈60 psi) N₂O 12-24 saat (Subrahmanyam ve Kasha, 1975), *Triticum pratense* L. 6 atm N₂O 24 saat (Taylor ve ark., 1976), *Triticum aestivum* L. 6 atm N₂O 24-48 saat (Hansen ve ark., 1988), *Psathyrostachys juncea* 0.5 MPa N₂O (Berdahl ve Barker, 1991), *Tulipa* spp. 5-6 atm N₂O 24 saat (Straathof ve Eikelboom, 1997), *Phalaris aquatica* L. 520 kPa N₂O 24 saat (Kelman ve ark., 1999), *Zea mays* L. 600 kPa N₂O 48 saat (Kato ve Geiger, 2002), *Tulipa* spp. 6 atm (N₂O:O₂=5:1) 24-48 saat (Okazaki ve ark., 2005), *Lilium* spp. 6 bar N₂O 0-24-48 saat (Barba-Gonzalez ve ark., 2006), *Zea mays* L. 600-1000 kPa N₂O 20 saat (Kato ve Birchler, 2006), *Lilium* spp. 6 atm (N₂O:O₂=5:1) 24 saat (Akutsu ve ark., 2007), *Lilium* spp. N₂O 24 saat (Kitamura ve ark., 2009), *Lilium* × *formolongi* Hort. 6 atm N₂O 48-72 saat (Sato ve ark., 2009), *Begonia* spp. 6 bar N₂O 48 saat (Dewitte ve ark., 2010), *Phalaenopsis amabilis* N₂O 0-24-48 saat (Wongprichachan ve ark., 2013b), *Lilium* spp., 600 kPa N₂O 24-48-72 saat (Luo ve ark., 2016) şeklinde sıralanabilir. Bu çalışmalarda poliploit ve anöploit bitkiler elde edilerek kromozom katlamayı teşvik etmede N₂O kullanımı tavsiye edilmiştir. Sitolojik sürece göre N₂O'nun, hücre bölünmesinde iğ oluşturmayı etkisiz hale getirdiği ve kardeş kromozomların kutuplara doğru hareketini önleyerek poliploidiyi teşvik ettiği bildirilmiştir (Kihara ve Tsunewaki, 1960).

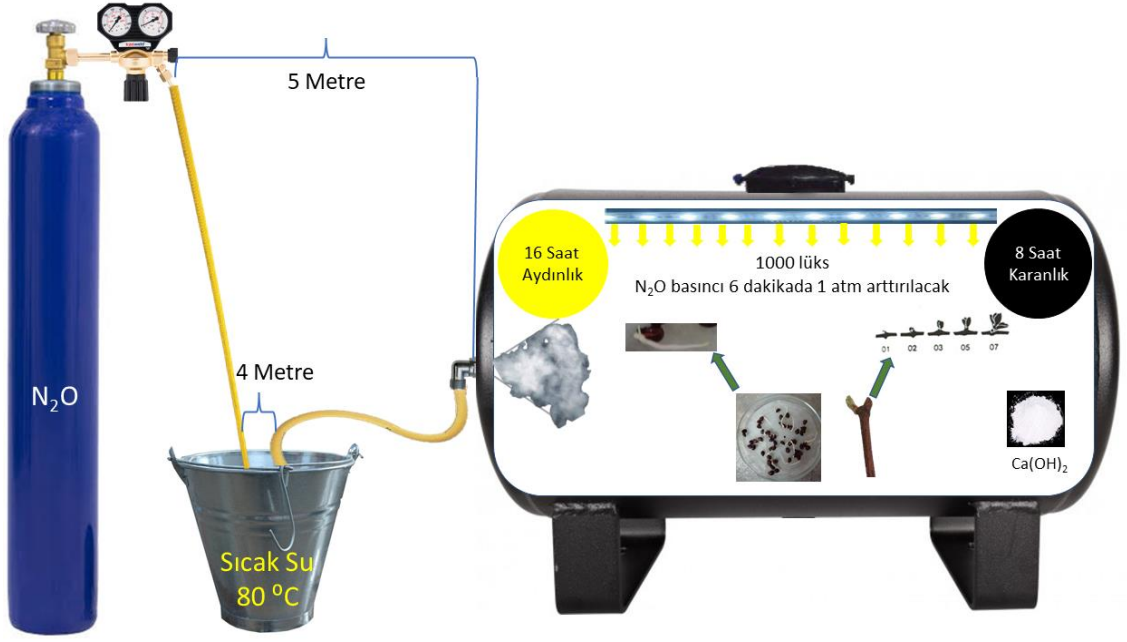
Denemede kullanılan N₂O, 10 litrelik tanklarla Yapılcan Sağlık Gereçleri Pazarlama ve Ticaret Ltd. Şti, Konya firmasında temin edilmiştir.



Şekil 3.4. Denemede kullanılan N₂O ve uygulama yapılan bitki materyalleri

3.2. Yöntem

Bitkisel materyal olarak 41 B ve Fercal asma anaçlarının soğukta katlanmış (+4 °C, nemli perlit içerisinde 90 gün) tohumları (Takai ve ark., 2017) ve dinlenme döneminde alınmış ve +1 °C hava sızdırmayan poşet içerisinde bekletilmiş en az üç göz içeren çelikleri kullanılmıştır. Çelik ve tohumlar basınca dayanıklı tanklara yerleştirilmiş ve basınç regülatörü bağlı N₂O tüpünden tanka gaz akışı sağlanmıştır. Asmanın fenolojik gelişme safhalarına (Eichhorn ve Lorenz, 1977; Ağaoğlu, 2002) göre 3-5 aralığında gelişme gösteren, aktif mitoz aşamasında hücre bölünmesinin olduğu düşünülen çeliklere çeşitli doz (0, 2.5, 5 ve 10 bar) ve sürelerde (48-96 saat) N₂O gazı uygulanmıştır.



Şekil 3.5. Tohum ve çeliklere N_2O uygulama düzeneği; Sıvı azot tankı, basınç regülatörü, sıcaklık kontrolü, basınç tankı (16 saat gündüz, 8 saat karanlık uygulaması, 1000 lüks aydınlatma N_2O basıncının 6 dakikada 1 bar arttırılması)



Şekil 3.6. Orizalin ve N_2O uygulamalarının yapıldığı fenolojik gelişme safhaları (Eichhorn ve Lorenz, 1977; Ağaoğlu, 2002)

N_2O , basınçlı çelik tüpler içerisinde ticari kaynaklardan temin edilmiştir. Tüp içindeki basınç yaklaşık 55 atmosferdir. Muamele yapılmış bitki, vidalı kelepçe ile sabitlenmiş bir kapağı olan kalın çeperli çelik bir tanka konmuştur. Öncelikle tankta bulunan havanın deney boyunca orada kalmasına izin verilmiştir. N_2O , 2 mm çapında et kalınlığına sahip plastikle kaplanmış 15 bar basınca dayanıklı bakır boru (16 mm) vasıtasıyla ortama verilmiştir. İşlem kabındaki basıncı yükseltmek için özel bir kompresöre gerek duyulmamış; N_2O tüpündeki yüksek basınç yeterli olmuştur. Tüpten gaz akışı, yaygın tipte piyasada bulunan bir azaltma vanası ile kontrol edilmiştir. İki adet manometreyle düzenlenmiştir. Bunlardan birincisiyle N_2O tüpüne basınç verilmiş, diğeriyle ise azaltma vanasından muamele tankına gaz salınım basıncını kontrolde kullanılmıştır. Bu ikinci basınç, 20 atmosfere kadar herhangi istenen bir değere

ayarlanabilen bir basınç regülâtörü ile kontrol edilmiştir. Muamele tankındaki basınç 2.5, 5 ve 10 bara ayarlandığında, bu değere yükseltilecek ve denemeden geri kalan süresi orada otomatik olarak muhafaza edilmiştir (Östergren, 1954). Ayrıca N_2O gazının soğuk etkisini kırmak için 5 metrelik borunun 4 metresi içinde 80 °C sıcak su bulunan kovaya konulmuştur. Her bir birimlik basınç tanka 6 dakika arayla verilmiştir.

N_2O uygulaması yapılmış olan çelik materyalleri çelik köklendirme tavalarına (torf:perlit, 3:1) dikilmiştir. Ayrıca N_2O uygulaması yapılmadan çelikler tavalara dikilmiş ve gaz uygulaması ile aynı safhada olan çeliklere çeşitli dozlarda (0, 25, ve 100 μM) günde 2 defa olmak üzere (08:30 ve 18:00 saatlerinde) takip eden 48 ve 96 saat orizalin uygulanmıştır. Soğukta katlanmış tohumlarda ilk çimlenmelerin başlamasıyla çeşitli doz (0, 2.5, 5 ve 10 bar) ve sürelerde (48-96 saat) N_2O uygulanmış, muamele gören tohumlar çimlendirme tavalarına ekilmiştir. Ayrıca N_2O uygulanmamış tohumların kotiledon yapraklarını oluşturup iki kotiledon yaprağı arasında büyüme noktası görünür hale geldiğinde çeşitli dozlarda (0, 25, ve 100 μM) günde 2 defa olmak üzere (08:30 ve 18:00 saatlerinde) takip eden 48 ve 96 saat orizalin uygulanmıştır.



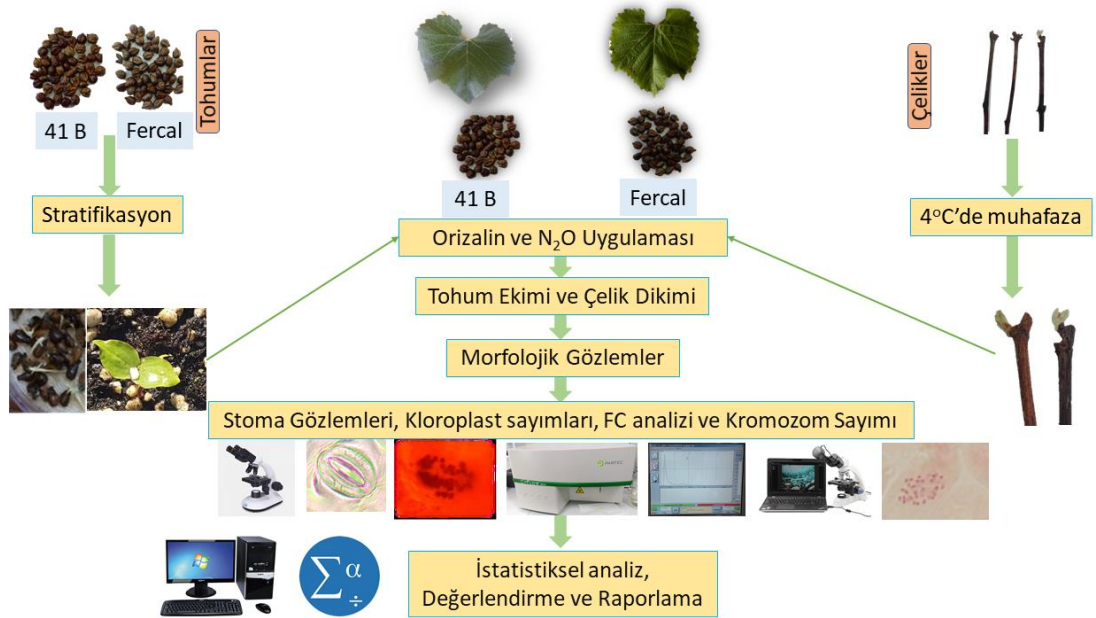
Şekil 3.7. Büyüme ucunun kotiledon yaprakları arasında görüldüğü dönemde orizalin uygulamalarının yapılması

Dikimi yapılan tüm asma anacı materyallerinin gelişmelerini iyi sürdürebilmeleri için rutin bakımları yapılmıştır. Deneme planı toplu olarak Çizelge

1’de verilmiştir. Hayatta kalan bitkilerde birim alandaki stoma yoğunluğu (adet mm⁻²) (Kara ve ark., 2018c), stoma boyutları (µm) (Kara ve ark., 2018a), stoma bekçi hücrelerindeki kloroplast sayıları (adet stoma⁻¹) (Kara ve Yazar, 2021) gibi stoma özellikleri bakımından ölçüm ve sayımların yanı sıra yaprak kalınlığı, klorofil miktarı (Kara ve ark., 2018b), FC analizleri (Yazar, 2018) ve kromozom sayımları (Kara ve ark., 2018b) yapılmıştır. İncelenen tüm verilerin sonuçlarına göre orizalin ve N₂O muamelelerinin asmada kromozom katlaması üzerine etkileri değerlendirilmiştir.

Çizelge 3.1. 41 B ve Fercal asma anaçlarına orizalin ve N₂O mutajenlerinin uygulama planı

Mutajen	Doz	Süre	41 B		Fercal		Toplam
			Tohum	Çelik	Tohum	Çelik	
Orizalin	25 µM	48	60	30	60	30	180
		96	60	30	60	30	180
	100 µM	48	60	30	60	30	180
		96	60	30	60	30	180
N ₂ O	2.5 Bar	48	60	30	60	30	180
		96	60	30	60	30	180
	5 Bar	48	60	30	60	30	180
		96	60	30	60	30	180
	10 Bar	48	60	30	60	30	180
		96	60	30	60	30	180
	Kontrol		60	30	60	30	180
	Toplam		660	330	660	330	1980



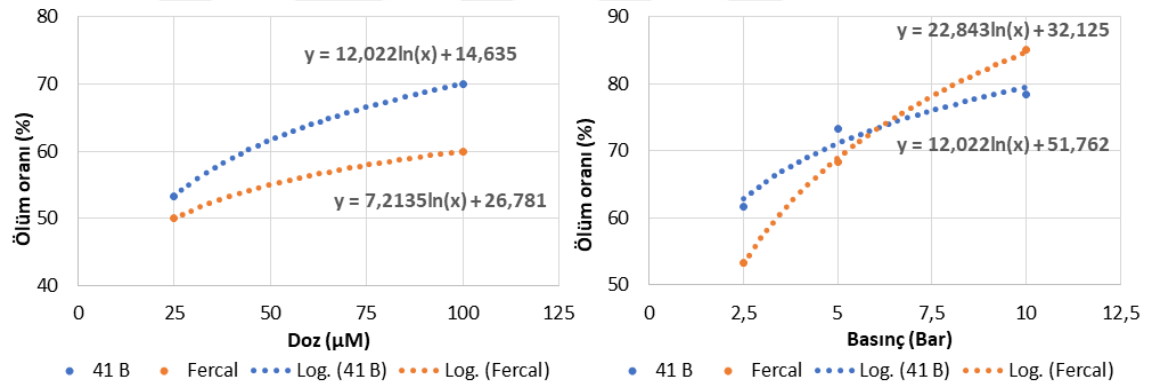
Şekil 3.8. İş akışı

3.2.1. Canlılık oranının tespiti

Orizalin ve N₂O gazı uygulanan 41 B ve Fercal çelik ve tohumlarından elde edilen fidelerin canlılık oranı, yaşayan bitkilerin tüm bitkiye oranlanmasıyla (%) belirlenmiştir (Tepe ve ark., 2002; Sinski ve ark., 2014).

3.2.2. Ortalama öldürücü doz (LD₅₀) tespiti

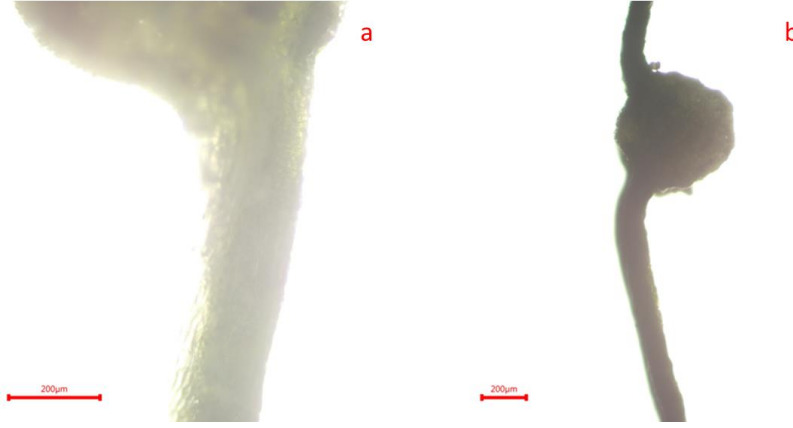
Ortalama öldürücü doz (LD₅₀) kimyasal mutajen için kritik bir parametre olarak genellikle kullanılmaktadır (Chen ve ark., 2020). Orizalin ve N₂O uygulamaları yapılan asma anaçlarında LD₅₀ değerleri, öldürücü orana dayalı doğrusal regresyonla tahmin edilmiştir (Wu ve ark., 1978; Predieri ve Di Virgilio, 2007; Chen ve ark., 2020).



Şekil 3.9. Uygulama yapılan bitkilerde doğrusal regresyonla LD₅₀ değerlerinin belirlenmesi

3.2.3. Yaprak kalınlığı

Tetraploid bitkilerin yaprakları diploidlerle kıyaslandığında daha geniş ve kalın olduğu bilinmektedir. Uygulama yapılan bitkilerin yaprakları arasındaki kalınlık farklılıkları sitolojik çalışmalar için bir ön veri olarak değerlendirilmek üzere, ×25 büyütme objektif ve ×10 büyütme ışık mikroskobu kullanılarak μm cinsinden ölçülmüştür (Rao ve ark., 2019).



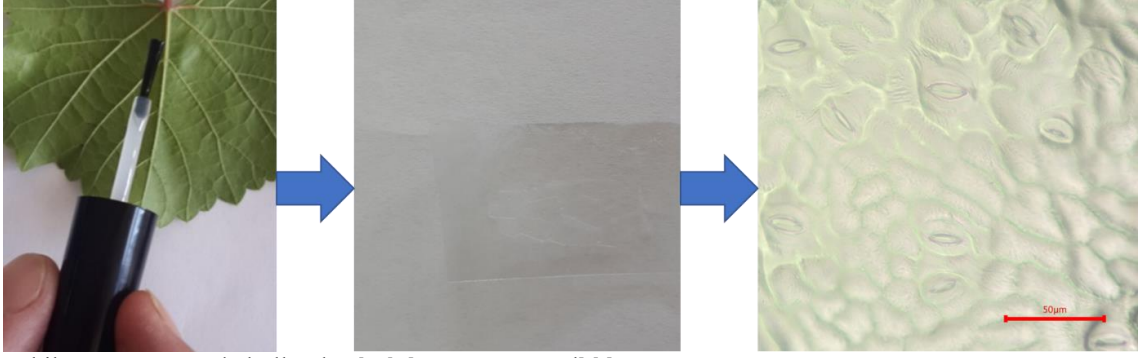
Şekil 3.10. Denemede kullanılan bitkilerin yaprak kalınlığı ölçümü (a,b)

3.2.4. Stoma yoğunluğu (adet mm⁻²) ve stoma boyutları (µm)

Bitkilerde uçtan 4-6. yaprağın alt yüzeyinden 3 farklı bölgeye şeffaf oje uygulanmasıyla yaprak epidermal izleri elde edilmiştir. Alt epidermis sıyrılıp lam üzerine yerleştirilerek örneklerde stoma genişliği ve uzunluğu, $\times 40$ büyütmeli objektif ve $\times 10$ büyütmeli oküler mikroskop ile belirlenmiştir (Moghbel ve ark., 2015). İşlem kolaylığı ve uygulanabilirliğine göre kloroplast sayımında da kullanılan bir diğer yöntem, Yuan ve ark. (2009) esas alınarak stoma sayımları yapılmıştır.

Kromozom katlamayı gösteren morfolojik ve anatomik gözlemler basit olmakla birlikte çoğu kez hataya neden olabilir. En çok kullanılan özelliklerden bazıları stoma ile ilgilidir. Stoma boyutlarının belirlenmesi basittir ve pahalı araçlar gerektirmez. Stoma boyutunun yanı sıra, stoma yoğunluğu ve stoma bekçi hücresi başına kloroplast sayısı da poliploidlerde değişebilir (Dhooghe ve ark., 2011).

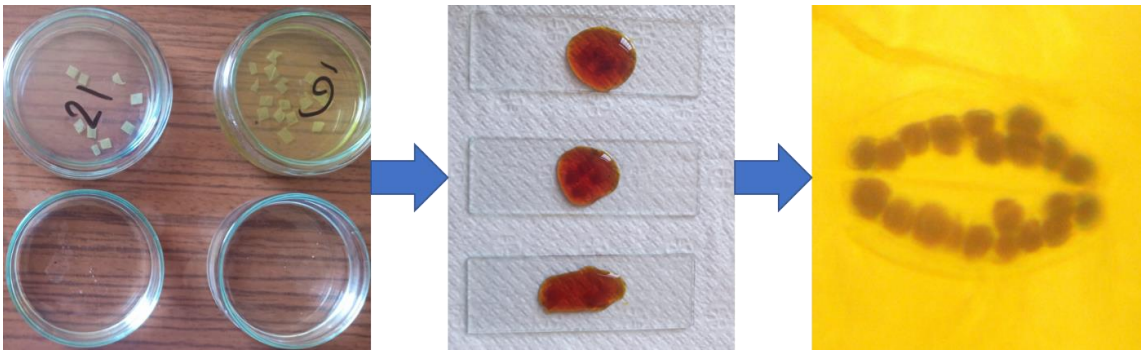
Poliploidlerin birincil seçim kriterleri olarak morfolojik parametreler kullanılabilir de teyit sıklıkla gereklidir. Morfolojik tarama ile poliploid olarak farz edilen seçilmiş bitkiler, miksploid de olabilir (Dhooghe ve ark., 2011). Bu nedenle stoma inceleme ve tespitleri FC analizi ve kromozom sayımları için ön veri olarak dikkate alınmıştır.



Şekil 3.11. Denemede kullanılan bitkilerin stoma özelliklerinin tespiti

3.2.5. Kloroplast sayımı (adet stoma⁻¹)

Orizalin ve N₂O gazı uygulaması yapılmış 41 B ve Fercal anaçlarında kloroplast sayımı yapılmıştır. Stoma bekçi hücrelerindeki kloroplast sayıları uçtan 4-6. yapraklardan alınan yaprak kesitlerinde tespit edilmiştir. İlk olarak, taze yaprakların Carnoy solüsyonunda (3 kısım etil alkol: 1 kısım glasiyal asetik asit) rengi açılmış, solüsyondan çıkartılan yaprak kesitleri 2-5 dakika steril suda bekletilmiş ve ardından 30 saniye %1 dozunda I-KI solüsyonunda boyanmıştır. Kloroplast sayıları mikroskopta $\times 400$ kat büyütülerek belirlenmiştir (Yuan ve ark., 2009). Orizalin ve N₂O ile muamele edilen örneklerin kloroplast sayıları tetraploit (4x) Kyoho üzüm çeşidi ile karşılaştırılmıştır. Kloroplast sayımları da FC analizi ve kromozom sayımları için ön veri olarak dikkate alınmıştır.



Şekil 3.12. Denemede kullanılan bitkilerin kloroplast özelliklerinin tespiti

3.2.6. Yaprak klorofil içeriği

Genel olarak, tetraploit bitkilerin klorofil SPAD değerleri, diploitinkinden anlamlı olarak daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Rao ve ark., 2019). Orizalin ve N₂O

gazı uygulanan bitkilerin tümünün sürgün ucundan itibaren 4. ve 6. yaprakların klorofil içeriği Minolta Spad Meter 520 modeli ile ölçülmüştür (Uddling ve ark., 2007; Rao ve ark., 2019). Yaprak klorofil içeriği tespitleri de FC analizi ve kromozom sayımları için ön veri olarak dikkate alınmıştır.

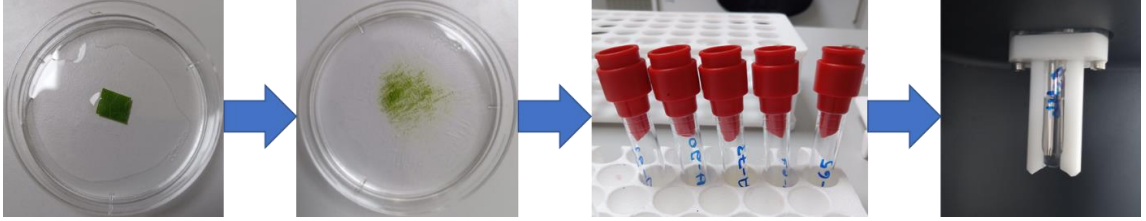
3.2.7. Flow sitometri (FC) yoluyla ploidi analizi

Orizalin ve N₂O uygulaması yapıp geliştirilen ve ploidi seviyesinin farklı olduğu kloroplast sayımları ile öngörülen bitkilerden FC analizi için (3-4 haftalık) taze yaprak örnekleri alınmıştır. Yaprak örneklerinden 0.5 cm² büyüklüğündeki kesitler alınarak petri kabına yerleştirilmiş ve 500 µL izolasyon buffer (Partec-Nuclei Extraction Buffer) ilave edilerek yaprak dokusu küçük parçalara ayrılncaya kadar jilet kullanılarak parçalanmıştır. İzolasyon buffer eklenerek yapılan parçalama işlemi sonucunda hücre çekirdeklerinin serbest kalması sağlanmış ve çekirdek zarı üzerinde açıklıklar oluşturulmuştur. Petri kabındaki örnekler 10-15 saniye süreyle çalkalanmış ve Partec-CellTrics 30 µm- green filtre ile süzülerek tüp içerisine (Partec-Sample Tubes, 3.5 ml, 55×12 mm) aktarılmıştır. Tüplere 1600 µL boyama solüsyonu [Partec-DAPI (4,6 diamidino-2-phenylindole) Staining Buffer] ilave edilerek ışık izolasyonu olan bir ortamda 5 dakika bekletilmiştir. Sonrasında örnekler FC cihazında analiz edilmiştir (Yazar, 2018). Örneklerin DNA içerikleri DNA içeriği bilinen domates ve 4x yapılı Kyoho üzüm çeşidi ile karşılaştırılmıştır.

FC, bitki ploidi analizi için yaygın ve hızlı bir tekniktir (Eeckhaut, 2003; Doležel ve ark., 2007). Numunelerle toplu olarak çalışılabilir ve on binlerce hücre tek bir seferde sayılabilir. Kromozom sayımı, hücrelerin heterojen bir popülasyonunu temsil eden bir tablo sunamazken (Doležel ve ark., 2007), FC farklı doku ve hücre katmanları tiplerinin analiz edilmesine olanak tanır (Leus ve ark., 2009). Bazen kromozom katlama farklı bitki hücrelerinde veya organlarında farklı ploidi seviyelerine sahip miksoploidlere neden olabilir. FC analizi, poliploidi ve miksoploidinin değerlendirilmesi için yararlı bir tekniktir (Dhooghe ve ark., 2011).

FC, bitkilerdeki DNA ploidi seviyesini ve nükleer DNA içeriğini tahmin etmek için en güvenilir tekniklerden biri olarak tanımlanmıştır. FC, Feulgen mikro densitometrisi ve kromozom sayımı gibi diğer yöntemlerle karşılaştırıldığında eşsiz kolaylık, hız ve doğruluk sağlar (Doležel ve Bartoš, 2005). Bitkilerde FC uygulaması son on yılda belirgin olarak artmış ve pamuk (Jin ve ark., 2008), asma (Leal ve ark.,

2006; Prado ve ark., 2010; Acanda ve ark., 2013; Kara ve Yazar, 2021) ve sahil çamı *Pinus pinaster* (Marum ve ark., 2009) gibi çeşitli bitki türlerinde somaklonal varyasyon analizinde başarılı bir şekilde uygulanmıştır (Acanda ve ark., 2015). FC analizleri IDA Yasam Teknolojileri firmasının Gebze kampüsündeki laboratuvarında uzman teknisyenlerle birlikte yürütülmüştür.



Şekil 3.13. Kloroplast sayımı sonucunda farklı olduğu düşünülen bitkilerde FC analizi

3.2.8. Kromozom sayımı

Orizalin ve N_2O uygulaması yapıp geliştirilen ve ploidi seviyesinin farklı olduğu FC analizleriyle öngörülen bitkilerin kök ucu hücrelerinde kromozom sayımları yapılmıştır. Bunun için kök uçları sabah erken saatlerde (10:30-11:00) alınmıştır. Kök örnekleri ön işlem uygulaması olarak, 0.002 M 8-hidroksikinolin solüsyonunda, +4°C’de 8 saat bekletilmiştir. 8-hidroksikinolin solüsyonundan çıkartılan kök uçları saf su ile temizlenmiş ve +4 °C’de 8 saat Carnoy çözeltisinde tespit edilmiştir. Hidroliz işlemi oda sıcaklığında 30 dakika boyunca 5 N HCl asit içerisinde bekletilerek gerçekleştirilmiştir. Hidroliz işleminden sonra kök uçları saf sudan geçirilmiştir. Boyama aşamasında; + 4 °C’de %2’lik aseto orsein içerisinde 1-2 gün süre ile bekletilerek kök dokularının boyanması sağlandıktan sonra, kök ucunun 0.5-1 mm’lik uç kısmı temiz lam üzerine alınarak, %45’lik asetik asit ile ezme preparat hazırlanmıştır (Uysal ve ark., 2009; Yazar, 2018). Uygun metafaz elde edildikten sonra kromozomların resimleri Zeiss Axio mikroskobu-Zeiss Axiocam 105 Color dijital kamerayla çekilmiştir.

Diğer sitolojik yöntemler, kesin kromozom sayıları hakkında daha fazla bilgi vermelidir, çünkü FC analizleri gerçek triploitler ve yakın-triploitler (anöploitler) arasında ayırım yapamaz, ancak sadece göreceli DNA içeriklerine yakın olarak ploidi düzeylerini sınıflandırabilir (Okazaki ve ark., 2005; Dewitte ve ark., 2010).

Etkili kromozom sayısını belirlediği için en somut yöntem kromozom sayımıdır (Doležel ve ark., 2007; Dhooghe ve ark., 2011). Bununla birlikte bu yöntem çok

zahmetlidir, yalnızca sınırlı sayıda hücre analiz edilebilir (Bohanec, 2003; Dhooghe ve ark., 2011). Dahası birçok küçük kromozom sayılırken hata yapma olasılığı çok yüksektir (Dhooghe ve ark., 2011).

Çalışmada orizalin ve N₂O gazı uygulanan 41 B ve Fercal anacı çelikleri ve tohumlarından elde edilen fidelerdeki makroskobik, mikroskobik ve sitolojik değişiklikler tespit edilmiş ve Kyoho çeşidi özellikleri ile karşılaştırılmıştır.

3.2.9. İstatistiksel analiz

41 B ve Fercal anacı çelikleri ve tohumlarına orizalin ve N₂O gazı muamelesi sonucunda elde edilen veriler SPSS 17.0 istatistik programında (SPSS Inc, Chicago, IL, USA) Duncan çoklu karşılaştırma testi, doz ve süre uygulamaları JMP 7 istatistik programında Student's t testi ile $p < 0.05$ önem seviyesinde karşılaştırılmıştır (Yue ve ark., 2017).

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

4.1. Canlılık Oranı

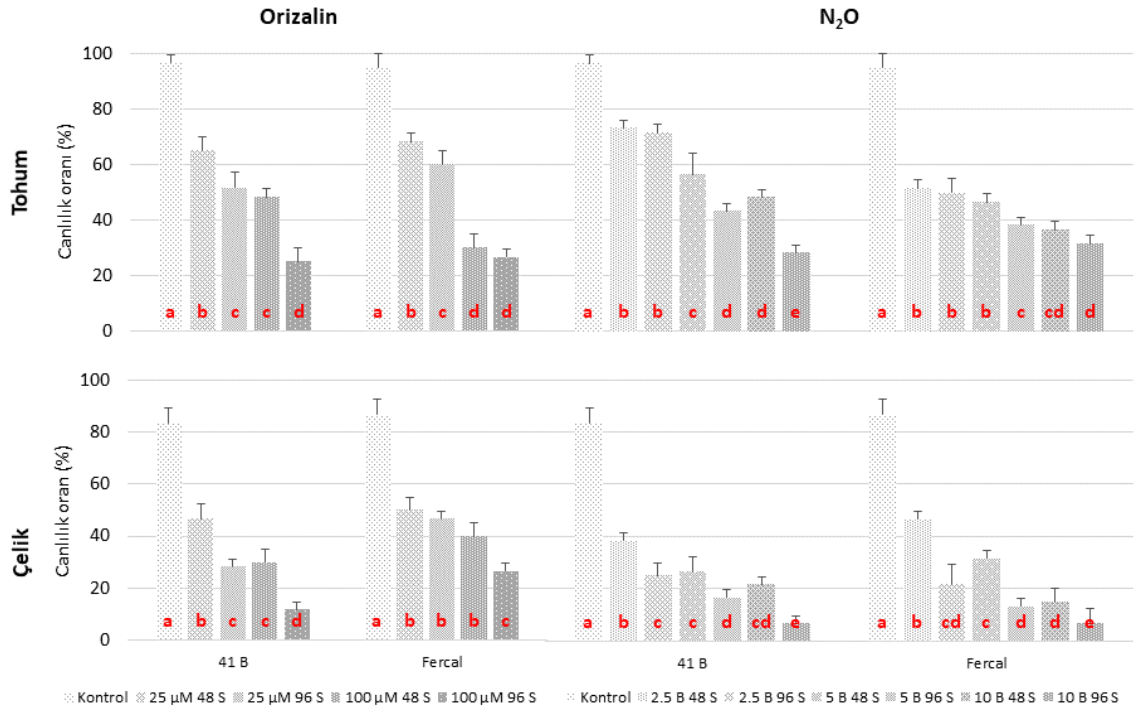
41 B ve Fercal asma anacı tohum ve çeliklerine yapılan orizalin ve N₂O uygulamalarının canlılık oranına etkileri önemlidir (Şekil 4.1). 41 B asma anacı tohumlarından elde edilen bitkilere kotiledon yapraklarının olduğu aşamada orizalin uygulamaları sonucunda elde edilen canlılık oranları kontrol, 25 µM 48 saat, 25 µM 96 saat, 100 µM 48 saat ve 100 µM 96 saat uygulamaları için sırasıyla %96.67±2.89, %65.00±5.00, %51.67±5.77, %48.33±2.89 ve %25.00±5.00 olurken Fercal asma anacı için bu değerler yine aynı sırayla %95.00±5.00, %68.33±2.89, %60.00±5.00, %30.00±5.00 ve %26.67±2.89 olarak tespit edilmiştir. Yapılan uygulamalar sonucunda her iki asma anacında da en yüksek canlılık oranı kontrolde belirlenirken en düşük canlılık oranı iki anaçta da 100 µM 96 saat uygulamasında kaydedilmiştir.

41 B asma anacı tek göz çelikleri sürdürüldükten sonra sürgün uçlarına kontrol, 25 µM 48 saat, 25 µM 96 saat, 100 µM 48 saat ve 100 µM 96 saat orizalin uygulamaları yapılmış ve canlılık oranları sırasıyla %83.33±5.77, %46.67±5.77, %28.33±2.89, %30.00±5.00 ve %11.67±2.89'dur. Fercal asma anacı çeliklerine yapılan uygulamalarda canlılık oranı sırayla %86.67±5.77, %50.00±5.00, %46.67±2.89, %40.00±5.00 ve %26.67±2.89 olarak tespit edilmiştir. 41 B ve Fercal asma anacı çeliklerine yapılan orizalin uygulamaları sonucunda en yüksek canlılık oranı kontrolde tespit edilirken en düşük canlılık oranı tohum uygulamasında olduğu gibi 100 µM 96 saat uygulamasında belirlenmiştir.

41 B asma anacı tohumlarının çim kökleri oluştuktan sonra N₂O gazının uygulaması sonucunda kontrol, 2.5 bar 48 saat, 2.5 bar 96 saat, 5 bar 48 saat, 5 bar 96 saat, 10 bar 48 saat ve 10 bar 96 saat basınç ve sürelerde canlılık oranları sırasıyla %96.67±2.89, %73.33±2.89, %71.67±2.89, %56.67±7.64, %43.33±2.89, %48.33±2.89 ve %28.33±2.89, Fercal asma anacında bu değerler sırasıyla %95.00±5.00, %51.67±2.89, %50.00±5.00, %46.67±2.89, %38.33±2.89 %36.67±2.89 ve %31.67±2.89 olarak belirlenmiştir. 41 B ve Fercal asma anacı tohumlarına yapılan N₂O uygulamaları sonucunda en yüksek canlılık oranı kontrolde belirlenirken en düşük canlılık oranı iki asma anacında da 10 bar 96 saat uygulamasında kaydedilmiştir.

Tek göz çelikleri sürdürüldükten sonra yapılan N₂O uygulamaları sonucunda 41 B asma anacında canlılık oranları kontrol, 2.5 bar 48 saat, 2.5 bar 96 saat, 5 bar 48 saat,

5 bar 96 saat, 10 bar 48 saat ve 10 bar 96 saat uygulamaları için sırasıyla 83.33 ± 5.77 , 38.33 ± 2.89 , 25.00 ± 5.00 , 26.67 ± 5.77 , 16.67 ± 2.89 , 21.67 ± 2.89 ve 6.67 ± 2.89 'dur. Fercal asma anacı çeliklerine yapılan uygulamalarda aynı sırayla 86.67 ± 5.77 , 46.67 ± 2.89 , 21.67 ± 7.64 , 31.67 ± 2.89 , 13.33 ± 2.89 , 15.00 ± 5.00 ve 6.67 ± 5.77 olarak saptanmıştır. N_2O uygulamaları sonucunda her iki asma anacı çeliklerinde en yüksek canlılık kontrolde tespit edilirken en düşük canlılık oranı 10 bar 96 saat uygulamasında belirlenmiştir. Canlılık oranı verileri tohum ve çeliklerde benzerlik göstermiştir.



Şekil 4.1. Orizalin ve N_2O uygulamalarının 41 B ve Fercal asma anacı tohum ve çeliklerinin canlılık oranına etkileri

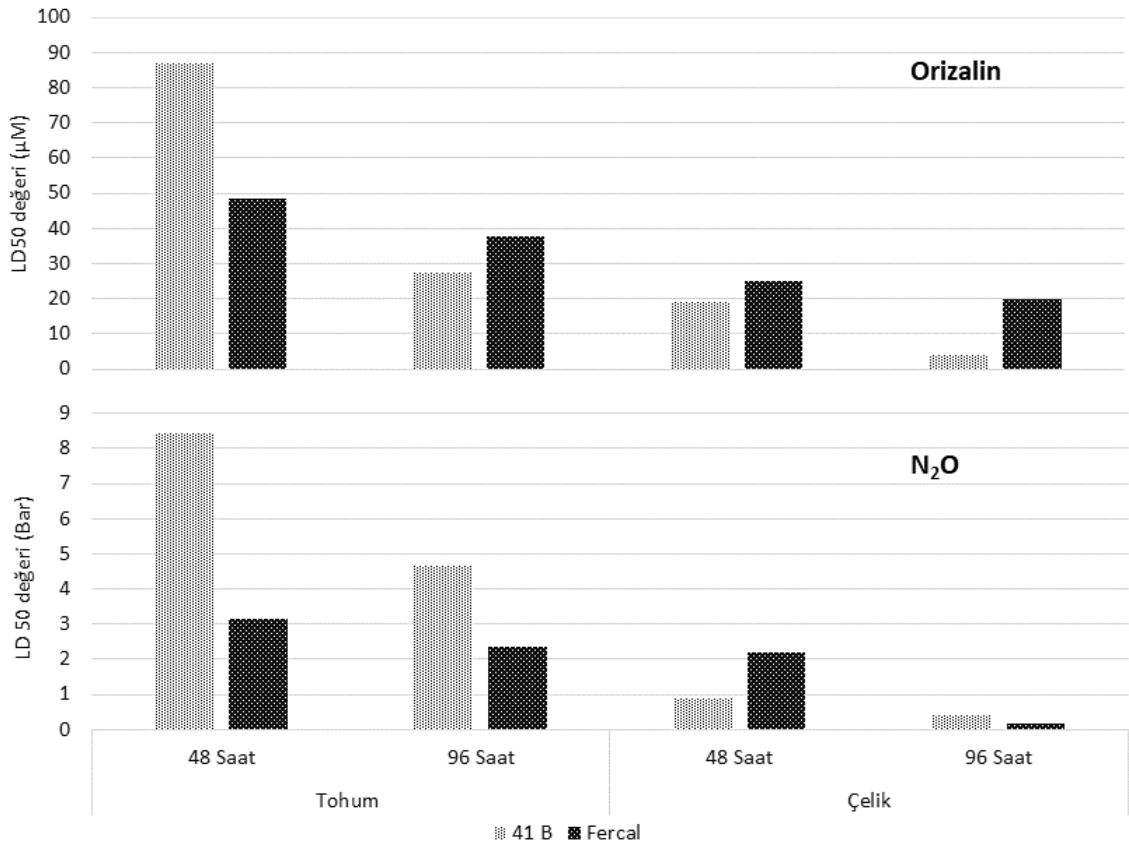
4.2. Ortalama Öldürücü Doz (LD_{50}) Değeri

Ortalama öldürücü doz (LD_{50}) kimyasal mutajen ajanlar için kritik bir parametre olarak genellikle kullanılmaktadır. Orizalin ve N_2O uygulamaları yapılan asma anaçlarında LD_{50} değerleri, öldürücü orana dayalı doğrusal regresyonla tahmin edilmiştir (Chen ve ark., 2020).

Yapılan uygulamaların süre ve doza bağlı LD_{50} değerleri tespit edilmiştir (Şekil 4.2 ve Şekil 4.3). 41 B asma anacı tohumlarından elde edilen fidelere kotiledon aşamasında yapılan orizalin uygulamalarında 48 ve 96 saat için LD_{50} değerleri sırasıyla

87.07 ve 27.26 μM olarak belirlenirken Fe çeliklerin LD_{50} değeri 18.95 ve 4.12 μM 'dür. Fercal asma anacı tohumlarına yapılan orizalin uygulamaları sonucunda ise LD_{50} değerleri 48 ve 96 saat için sırasıyla 48.51 ve 37.89 μM iken Fe çeliklere yapılan uygulamaların LD_{50} değerleri aynı sırayla 25.00 ve 19.84 μM olarak kaydedilmiştir. Her iki asma anacı tohum ve Fe çeliklerine yapılan uygulamalar sonucunda süre artışına bağlı olarak LD_{50} değerlerinde azalma saptanmıştır.

N_2O uygulamalarının LD_{50} değerleri 41 B asma anacı tohumlarına 48 ve 96 saat uygulamaları için sırasıyla 8.44 ve 4.66 bar olurken yine 41 B asma anacı Fe çeliklerine yapılan uygulamaların LD_{50} değerleri aynı sırayla 0.86 ve 0.39 bar olarak belirlenmiştir. Fercal asmana anacı tohumlarına yapılan N_2O uygulamalarının 48 ve 96 saat için LD_{50} değerleri sırasıyla 3.15 ve 2.35 bar olarak belirlenirken Fe çeliklere yapılan uygulamaların LD_{50} değerleri ise 48 ve 96 saat için sırasıyla 2.19 ve 0.18 bardır. Orizalin uygulamalarında olduğu gibi süre artışı LD_{50} değerinde azalmalara neden olmuştur.

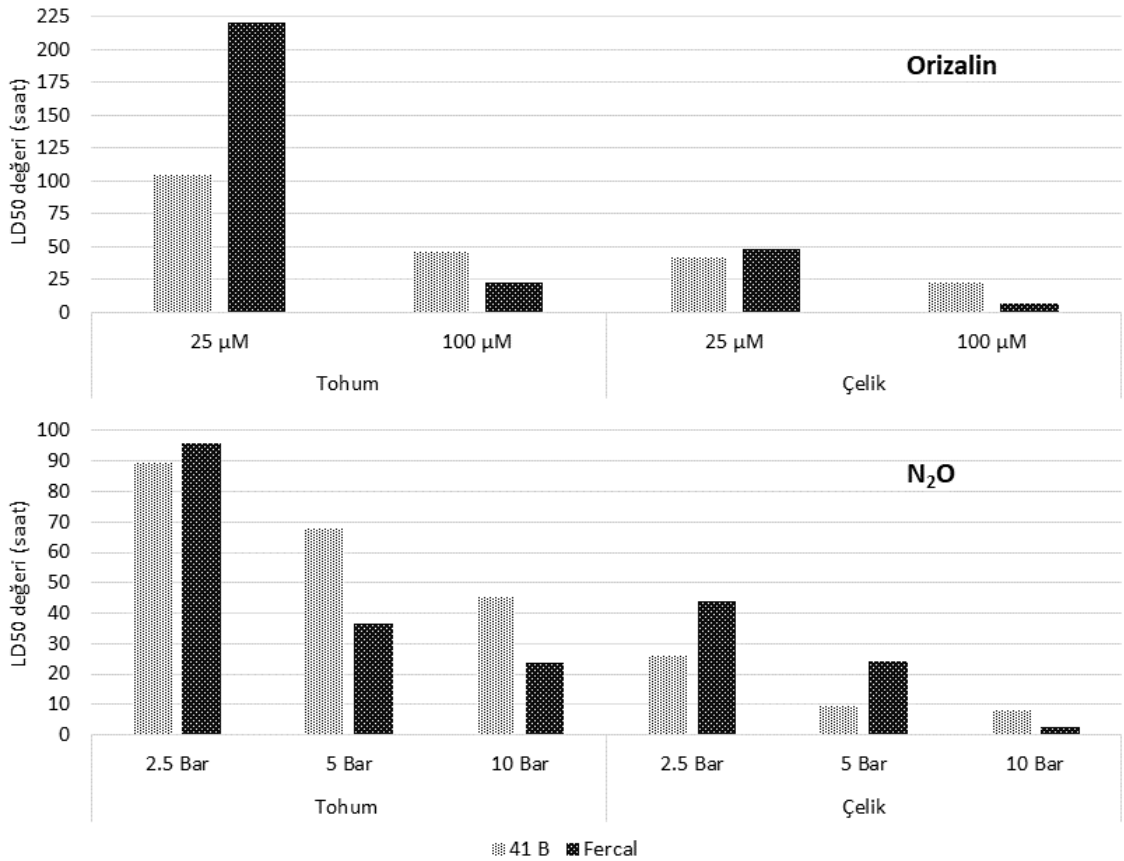


Şekil 4.2. 41 B ve Fercal asma anacı tohum ve Fe çeliklerine yapılan orizalin ve N_2O uygulamalarının LD_{50} değerine (Süre) etkileri

41 B asma anacı tohumlarından elde edilen fidelere yapılan orizalin uygulamalarının LD_{50} değerleri 25 ve 100 μM için sırasıyla 104.61 ve 45.7 saat olurken

eliklere yapılan uygulamaların LD₅₀ değerleri sırayla 42.32 ve 22.53 saattir. Fercal asma anacı tohumlarından elde edilen fidelere yapılan orizalin uygulamalarının LD₅₀ değerleri 25 ve 100 µM için sırasıyla 220.71 ve 23.05 saat olarak tespit edilirken aynı anacın çeliklerine yapılan uygulamaların LD₅₀ değerleri ise sırasıyla 48 ve 7.13 saattir. Orizalin uygulamaları sonucunda LD₅₀ değerlerinde doz artışına zıt bir şekilde sürelerde azalma görölmüştür.

41 B asma anacı tohumlarına N₂O uygulamaları sonucunda elde edilen LD₅₀ değerleri 2.5, 5 ve 10 bar için sırasıyla 89.43, 67.81 ve 45.33 saat olurken yine aynı anacın çeliklerine yapılan uygulamaların LD₅₀ değerleri aynı sırayla 26.16, 9.52 ve 7.96 saat olarak kaydedilmiştir. Fercal asma anacı tohumlarına yapılan uygulamaların LD₅₀ değerleri 2.5, 5 ve 10 bar için sırasıyla 96, 36.4 ve 23.95 saat olarak belirlenirken çeliklerine yapılan uygulamaların LD₅₀ değerleri ise aynı sırasıyla 43.75 ve 24 ve 2.61 saattir. Her iki asma anacı ve materyalde de N₂O dozunun artmasına zıt olarak sürelerdeki LD₅₀ değerlerinde azalma olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.3. 41 B ve Fercal asma anacı tohum ve çeliklerine yapılan orizalin ve N₂O uygulamalarının LD₅₀ değerine (Doz) etkileri

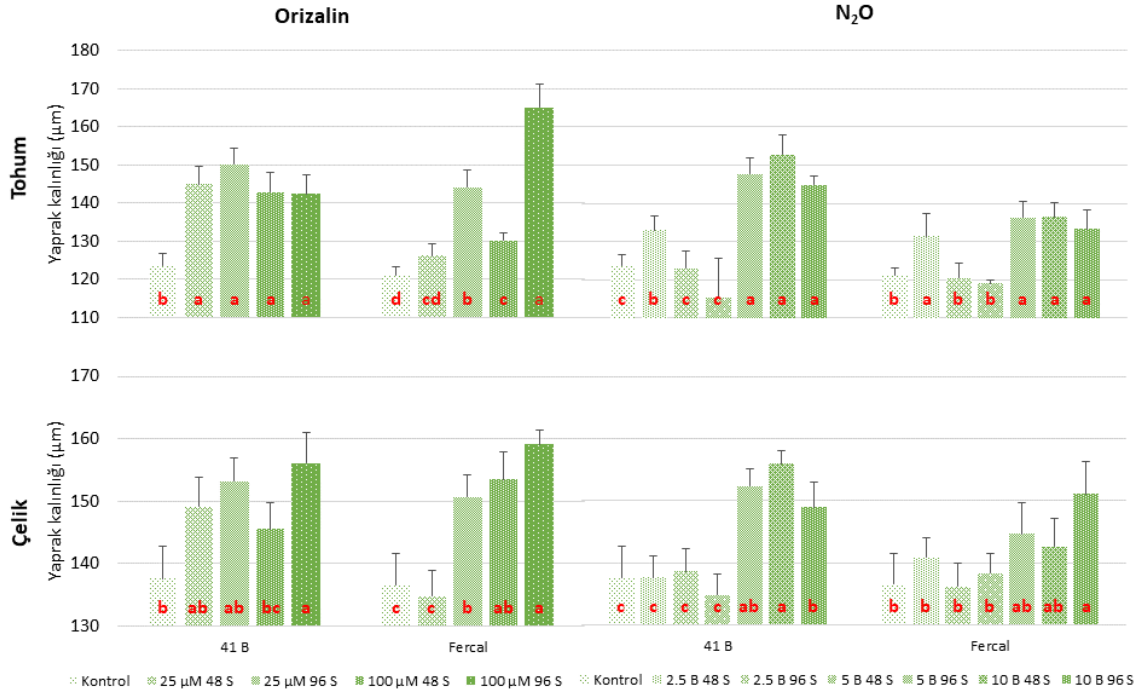
4.3. Yaprak Kalınlığı

41 B ve Fercal asma anaçları tohum ve çeliklerine farklı doz ve sürelerde orizalin ve N₂O uygulamalarının yaprak kalınlığına etkileri önemlidir (Şekil 4.4). 41 B asma anacı tohumlarına kotiledon yaprakların oluştuğu aşamada yapılan orizalin uygulamaları sonucunda kontrol, 25 µM 48 saat, 25 µM 96 saat, 100 µM 48 saat ve 100 µM 96 saat uygulamalarının yaprak kalınlık değerleri sırasıyla 123.61±3.02 µm, 145.00±4.51 µm, 150.11±4.35 µm, 142.89±5.19 µm ve 142.44±4.99 µm olarak kaydedilmiştir. Aynı süre ve dozlarda Fercal asma anacına yapılan orizalin uygulamalarında ise sırasıyla 121.16±1.97 µm, 126.22±3.02 µm, 144.11±4.72 µm, 130.22±1.90 µm ve 165.11±6.24 µm olarak ölçülmüştür. İki asma anacına da yapılan uygulamalar sonucunda en düşük yaprak kalınlığı kontrolde kaydedilmiştir. Diğer taraftan en kalın yapraklar 41 B asma anacında 25 µM 96 saat uygulamasında belirlenirken Fercal asma anacında 100 µM 96 saat uygulamasında tespit edilmiştir.

41 B asma anacı çelikleri sürdürüldükten sonra sürgün uçlarına yapılan farklı süre ve dozlardaki orizalin uygulamalarının yaprak kalınlıkları kontrol, 25 µM 48 saat, 25 µM 96 saat, 100 µM 48 saat ve 100 µM 96 saat için sırasıyla 137.54±5.13 µm, 149.09±4.64 µm, 153.20±3.64 µm, 145.54±4.19 µm ve 156.09±4.83 µm olarak tespit edilmiştir. Fercal asma anacı çeliklerine yapılan orizalin uygulamalarının sonuçları yine aynı sırayla 136.58±5.00 µm, 134.70±4.14 µm, 150.61±3.55 µm, 153.43±4.48 µm ve 159.12±2.25 µm olarak ölçülmüştür. Her iki çeşitte de en kalın yapraklar 100 µM 96 saat uygulamasında tespit edilirken en düşük yaprak kalınlıkları 41 B asma anacında kontrolde, Fercal asma anacında ise 25 µM 48 saat uygulamasında belirlenmiştir.

41 B asma anacı tohumlarının çim kökleri oluştuğu aşamada yapılan N₂O uygulamalarının yaprak kalınlıkları kontrol, 2.5 bar 48 saat, 2.5 bar 96 saat, 5 bar 48 saat, 5 bar 96 saat, 10 bar 48 saat ve 10 bar 96 saat uygulamaları için sırasıyla 123.61±3.02 µm, 133.00±3.79 µm, 123.00±4.67 µm, 115.44±10.28 µm, 147.67±4.37 µm, 152.78±5.19 µm ve 144.89±2.41 µm olarak tespit edilirken Fercal asma anacı verileri aynı sırayla 121.16±1.97 µm, 131.44±5.74 µm, 120.44±3.91 µm, 119.00±0.88 µm, 136.33±4.26 µm, 136.44±3.79 µm ve 133.33±4.98 µm olarak kaydedilmiştir. 41 B ve Fercal asma anacı tohumlarına yapılan N₂O uygulamaları sonucunda en kalın yaprak kalınlığı 10 bar 48 saat uygulamasında tespit edilirken en düşük yaprak kalınlığı iki asma anacında da 5 bar 48 saat uygulamasında kaydedilmiştir.

41 B asma anacı çelikleri sürdürüldükten sonra sürgün ucunda yapılan N₂O uygulamalarının yaprak kalınlıkları kontrol, 2.5 bar 48 saat, 2.5 bar 96 saat, 5 bar 48 saat, 5 bar 96 saat, 10 bar 48 saat ve 10 bar 96 saat uygulamaları için sırasıyla 137.54±5.13 µm, 137.68±3.47 µm, 138.60±3.69 µm, 134.80±3.38 µm, 152.35±2.73 µm, 155.91±2.13 µm ve 148.90±4.09 µm'dir. Fercal asma anacı verileri de yine aynı sırayla 136.58±5.00 µm, 140.88±3.24 µm, 136.18±3.75 µm, 138.33±3.22 µm, 144.65±5.04 µm, 142.60±4.58 µm ve 151.10±5.24 µm olarak saptanmıştır. N₂O uygulamaları sonucunda 41 asma anacında en kalın yapraklar 10 bar 48 saat uygulamasında belirlenirken en düşük yaprak kalınlığı ise 5 bar 48 saat uygulamasında tespit edilmiştir. Fercal asma anacında ise en kalın yapraklar 10 bar 48 saat uygulamasında saptanırken en düşük yaprak kalınlığı 2.5 bar 96 saat uygulamasında kaydedilmiştir.



Şekil 4.4. 41 B ve Fercal asma anacı tohum ve çeliklerine yapılan uygulamaların yaprak kalınlığına etkileri

4.4. Stoma Yoğunluğu (adet mm⁻²) ve Stoma Boyutları (µm)

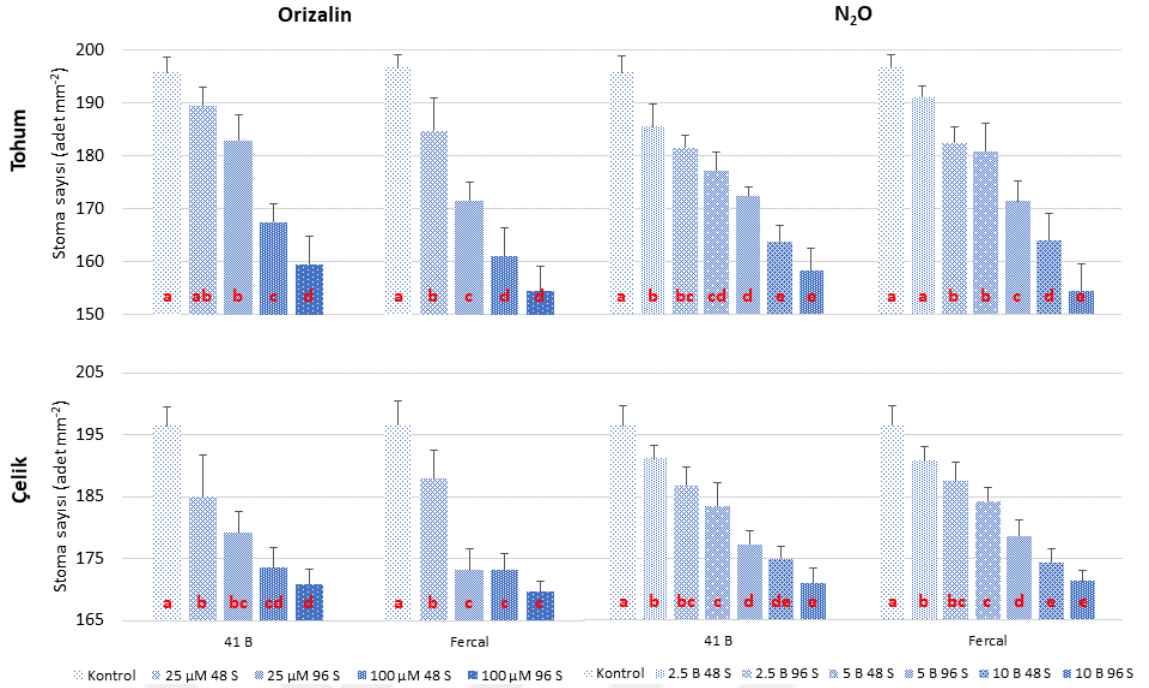
41 B ve Fercal asma anaçları tohum ve çeliklerine farklı doz ve sürelerde orizalin ve N₂O uygulanması sonucunda elde edilen stoma sayısı verileri önemlidir (Şekil 4.5). 41 B asma anacı tohumlarından elde edilen fidelere yapılan orizalin uygulamaları sonucunda kontrol, 25 µM 48 saat, 25 µM 96 saat, 100 µM 48 saat ve 100

μM 96 saat uygulamalarının stoma yoğunlukları (adet mm^{-2}) sırasıyla 195.65 ± 2.80 , 189.45 ± 3.52 , 182.81 ± 4.76 , 167.41 ± 3.40 ve 159.44 ± 5.37 adet olarak tespit edilirken Fercal asma anacı stoma sayıları da aynı sırayla 197.31 ± 3.01 , 184.62 ± 6.29 , 171.55 ± 3.49 , 161.10 ± 5.23 ve 154.36 ± 4.77 adettir. Yapılan uygulamalar sonucunda her iki çeşitte de en fazla stoma yoğunluğu kontrolde belirlenirken en düşük stoma yoğunluğu ise $100 \mu\text{M}$ 96 saat uygulamasında kaydedilmiştir.

Orizalinin 41 B asma anacı çeliklerinden elde edilen sürgünlere yapılan uygulamalar sonucunda stoma sayıları kontrol, $25 \mu\text{M}$ 48 saat, $25 \mu\text{M}$ 96 saat, $100 \mu\text{M}$ 48 saat ve $100 \mu\text{M}$ 96 saat için sırasıyla 196.46 ± 2.94 , 184.98 ± 6.69 , 179.11 ± 3.50 , 173.62 ± 3.14 , 170.92 ± 2.34 adet olarak belirlenirken Fercal asma anacı verileri aynı sırayla 196.62 ± 3.82 , 187.84 ± 4.63 , 173.08 ± 3.50 , 173.17 ± 2.71 ve 169.61 ± 1.62 adet olarak belirlenmiştir. Yapılan uygulamaların etkisi incelendiğinde en yoğun stomalar her iki çeşitte de kontrol grubunda belirlenirken en düşük yoğunluk ise $100 \mu\text{M}$ 96 saat uygulamasında tespit edilmiştir.

41 B asma anacı tohumlarından elde edilen fidelere yapılan N_2O uygulamalarının stoma sayıları kontrol, 2.5 bar 48 saat, 2.5 bar 96 saat, 5 bar 48 saat, 5 bar 96 saat, 10 bar 48 saat ve 10 bar 96 saat için sırasıyla 195.65 ± 3.03 , 185.46 ± 4.23 , 181.44 ± 2.32 , 177.14 ± 3.50 , 172.30 ± 1.79 , 163.75 ± 3.04 ve 158.20 ± 4.30 adet olarak belirlenirken Fercal asma anacı stoma sayıları yine aynı sırayla 196.65 ± 2.44 , 191.07 ± 2.16 , 182.41 ± 3.00 , 180.75 ± 5.29 , 171.32 ± 3.89 , 163.81 ± 5.27 ve 154.41 ± 4.98 adet olarak kaydedilmiştir. İki anaca da yapılan uygulamalar sonucunda en fazla stoma sayıları kontrolde tespit edilirken en düşük stoma sayıları 10 bar 96 saat uygulamasında belirlenmiştir.

N_2O gazının 41 B asma anacı çeliklerinin sürdürülmesiyle yapılan uygulamalar sonucunda elde edilen stoma yoğunluğu incelenmiştir. Elde edilen veriler kontrol, 2.5 bar 48 saat, 2.5 bar 96 saat, 5 bar 48 saat, 5 bar 96 saat, 10 bar 48 saat ve 10 bar 96 saat uygulamaları için sırasıyla 196.46 ± 3.17 , 191.22 ± 2.05 , 186.79 ± 2.90 , 183.49 ± 3.80 , 177.27 ± 2.23 , 174.92 ± 1.98 , 171.08 ± 2.43 adettir. Fercal asma anacı çeliklerine yapılan uygulamalardan elde edilen stoma sayıları ise yine aynı sırayla 196.62 ± 3.05 , 190.76 ± 2.28 , 187.62 ± 2.85 , 184.31 ± 2.16 , 178.65 ± 2.59 , 174.36 ± 2.13 ve 171.35 ± 1.61 adet olarak tespit edilmiştir. Asma anacı çeliklerine N_2O uygulamalarının stoma sayısına etkisi tohumlara yapılan uygulamalarla benzerlik göstermiştir. İki anaç çeşidinde de en yüksek stomalar kontrolde belirlenirken en düşük stomalar 10 bar 96 saat uygulamasında kaydedilmiştir.



Şekil 4.5. 41 B ve Fercal asma anacı tohum ve çeliklerine yapılan uygulamaların stoma sayısına etkileri

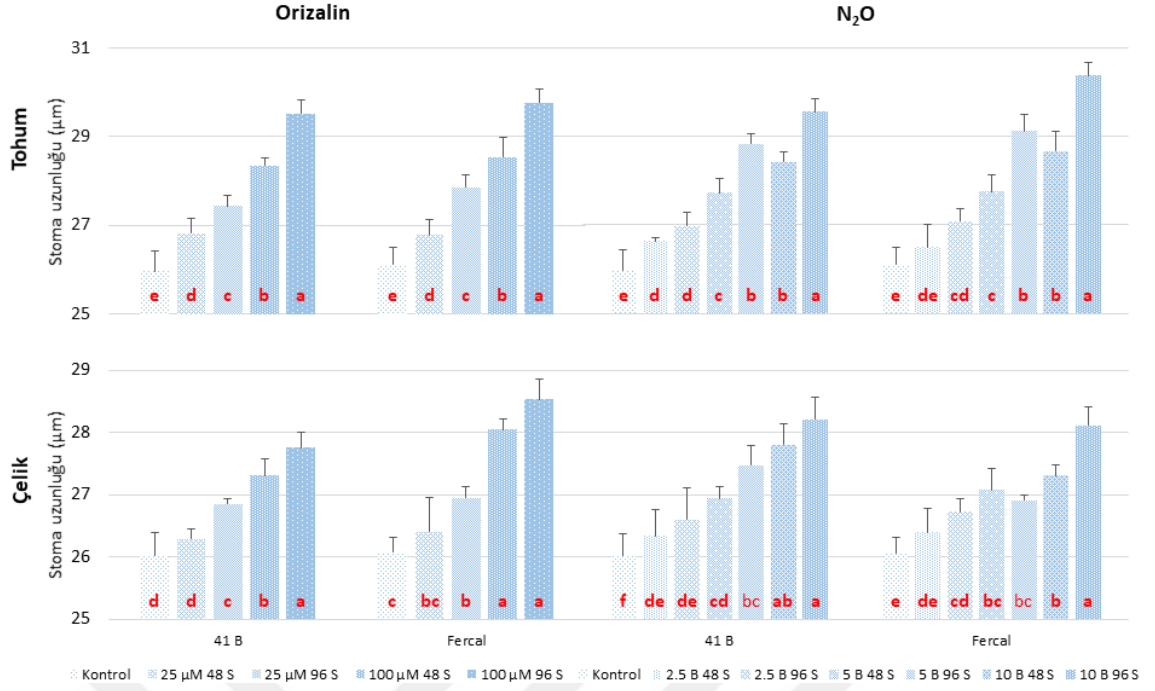
Orizalin ve N₂O uygulamaları sonucunda 41 B ve Fercal asma anacı tohum ve çeliklerinin stoma uzunluğu (µm) değerlerine etkileri önemlidir (Şekil 4.6). 41 B asma anacı tohumlarından elde edilen bitkilere kotiledon yaprakları arasındaki sürgün uçlarına yapılan orizalin uygulamalarının stoma uzunluğuna etkisi kontrol, 25 µM 48 saat, 25 µM 96 saat, 100 µM 48 saat ve 100 µM 96 saat için sırasıyla 25.97±0.46 µm, 26.82±0.33 µm, 27.43±0.25 µm, 28.34±0.17 µm ve 29.51±0.32 µm olarak tespit edilmiştir. Fercal asma anacı tohumlarından elde edilen bitkilere yapılan uygulamaların stoma uzunluğuna etkileri aynı sırayla 26.11±0.39 µm, 26.78±0.35 µm, 27.86±0.26 µm, 28.54±0.44 µm ve 29.77±0.30 µm'dir. İki asma anacında da en uzun stomalar 100 µM 96 saat uygulamasında belirlenirken en düşük stoma uzunluğu kontrol grubunda kayıt altına alınmıştır.

41 B asma anacı çeliklerinin sürdürülmesi sonucunda sürgün uçlarına yapılan orizalin uygulamaları sonucunda elde edilen stoma uzunluğu verileri kontrol, 25 µM 48 saat, 25 µM 96 saat, 100 µM 48 saat ve 100 µM 96 saat uygulamaları için sırasıyla 26.02±0.36 µm, 26.29±0.16 µm, 26.85±0.09 µm, 27.30±0.27 µm ve 27.75±0.25 µm olarak belirlenirken Fercal asma anacı çeliklerinden elde edilen stoma uzunlukları aynı sırayla 26.07±0.24 µm, 26.40±0.55 µm, 26.94±0.19 µm, 28.05±0.17 µm ve 28.53±0.33 µm'dir. 41 B ve Fercal asma anacı çeliklerine yapılan orizalin uygulamalarının stoma uzunluğuna etkisi tohumlardan elde edilen bitkilere yapılan uygulamalarla benzerlik

göstermiş ve en yüksek stoma uzunluğu 100 μM 96 saat, en düşük stoma uzunlukları ise kontrol grubunda tespit edilmiştir.

41 B asma anacı tohumlarına yapılan N_2O uygulamalarının stoma uzunluğuna etkileri kontrol, 2.5 bar 48 saat, 2.5 bar 96 saat, 5 bar 48 saat, 5 bar 96 saat, 10 bar 48 saat ve 10 bar 96 saat uygulamaları için sırasıyla $25.97 \pm 0.46 \mu\text{m}$, $26.63 \pm 0.08 \mu\text{m}$, $26.98 \pm 0.31 \mu\text{m}$, $27.73 \pm 0.32 \mu\text{m}$, $28.83 \pm 0.24 \mu\text{m}$, $28.42 \pm 0.23 \mu\text{m}$ ve $29.56 \pm 0.30 \mu\text{m}$ 'dir. Fercal asma anacı tohumlarına yapılan uygulamaların stoma uzunluğuna etkisi ise aynı sırayla $26.11 \pm 0.39 \mu\text{m}$, $26.50 \pm 0.53 \mu\text{m}$, $27.08 \pm 0.28 \mu\text{m}$, $27.75 \pm 0.36 \mu\text{m}$, $29.11 \pm 0.38 \mu\text{m}$, $28.66 \pm 0.45 \mu\text{m}$ ve $30.37 \pm 0.30 \mu\text{m}$ olarak tespit edilmiştir. Yapılan uygulamaların stoma uzunluğuna etkisi incelendiğinde iki asma anacında da en uzun stomalar 10 bar 96 saat uygulamasında belirlenirken en düşük stoma uzunluğu ise iki anaç çeşidinde de kontrol grubunda kayıt altına alınmıştır.

Çeliklerin sürdürülmesiyle sürgün uçlarına yapılan N_2O uygulamalarının stoma uzunluğuna etkisi 41 B asma anacında kontrol, 2.5 bar 48 saat, 2.5 bar 96 saat, 5 bar 48 saat, 5 bar 96 saat, 10 bar 48 saat ve 10 bar 96 saat uygulamaları için sırasıyla $26.02 \pm 0.36 \mu\text{m}$, $26.34 \pm 0.42 \mu\text{m}$, $26.61 \pm 0.50 \mu\text{m}$, $26.94 \pm 0.19 \mu\text{m}$, $27.48 \pm 0.33 \mu\text{m}$, $27.81 \pm 0.33 \mu\text{m}$ ve $28.22 \pm 0.36 \mu\text{m}$ olarak belirlenmiştir. Fercal asma anacı çeliklerine yapılan uygulamaların stoma uzunluğuna etkisi de aynı sırayla $26.07 \pm 0.24 \mu\text{m}$, $26.40 \pm 0.37 \mu\text{m}$, $26.73 \pm 0.22 \mu\text{m}$, $27.08 \pm 0.34 \mu\text{m}$, $26.91 \pm 0.09 \mu\text{m}$, $27.31 \pm 0.18 \mu\text{m}$ ve $28.12 \pm 0.31 \mu\text{m}$ 'dir. Çeliklere yapılan N_2O uygulamalarının stoma uzunluğuna etkisi tohumlara yapılan uygulamalarla benzerlik göstermiştir. En uzun stomalar iki asma anacında da 10 bar 96 saat uygulamasında belirlenirken en düşük stomalar kontrolde kaydedilmiştir.



Şekil 4.6. 41 B ve Fercal asma anacı tohum ve çeliklerine yapılan uygulamaların stoma uzunluğuna etkileri

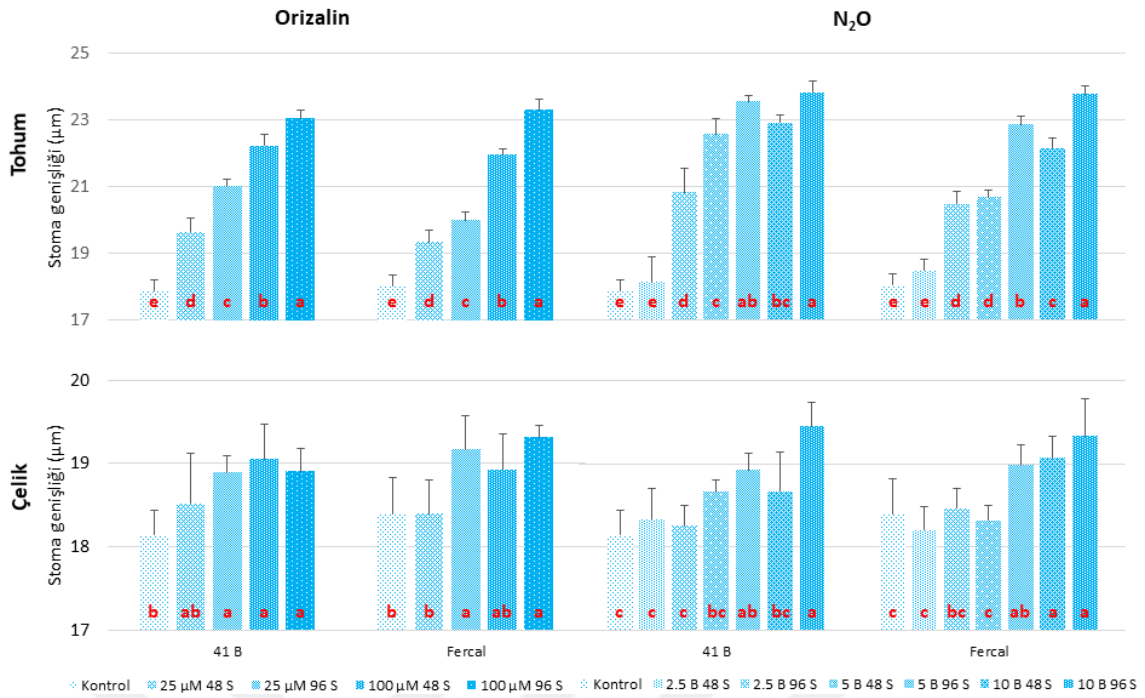
41 B ve Fercal asma anacı tohum ve çeliklerine orizalin ve N₂O uygulamaları sonucunda elde edilen stoma genişliği verileri önemli bulunmuştur (Şekil 4.7). 41 B asma anacı tohumları çimlendikten sonra kotiledon yaprakların oluştuğu dönemdeki fidelere orizalin uygulamaları sonucunda elde edilen stoma genişliği verileri kontrol, 25 µM 48 saat, 25 µM 96 saat, 100 µM 48 saat ve 100 µM 96 saat uygulamaları için sırasıyla 17.87 ± 0.34 µm, 19.64 ± 0.43 µm, 21.00 ± 0.20 µm, 22.22 ± 0.34 µm ve 23.04 ± 0.23 µm olarak tespit edilirken Fercal asma anacına yapılan uygulamalar sonucunda ise yine aynı sırayla 18.04 ± 0.32 µm, 19.34 ± 0.36 µm, 20.00 ± 0.22 µm, 21.94 ± 0.19 µm ve 23.29 ± 0.34 µm'dir. Yapılan orizalin uygulamalarının stoma genişliğine etkileri incelendiğinde en geniş stomalar hem 41 B hem de Fercal asma anacında 100 µM 96 saat uygulamasında belirlenirken en düşük stomalar ise her iki anaç çeşidinde de kontrol grubunda kaydedilmiştir.

Orizalinin 41 B asma anacı çelikleri sürdürüldükten sonra sürgün ucuna yapılan uygulamaları sonucunda elde edilen stoma genişliği verileri kontrol, 25 µM 48 saat, 25 µM 96 saat, 100 µM 48 saat ve 100 µM 96 saat için sırasıyla 18.15 ± 0.29 µm, 18.52 ± 0.61 µm, 18.90 ± 0.19 µm, 19.06 ± 0.42 µm ve 18.91 ± 0.27 µm olarak kaydedilirken Fercal asma anacında ise bu veriler aynı sırayla 18.40 ± 0.43 µm, 18.40 ± 0.41 µm, 19.17 ± 0.40 µm, 18.93 ± 0.43 µm ve 19.31 ± 0.14 µm'dir. 41 B ve Fercal asma anacı çeliklerine orizalin uygulamaları sonucunda en geniş stomalar 41 B asma

anacında 100 μM 48 saat uygulamasında tespit edilirken Fercal asma anacında ise 100 μM 96 saat uygulamasında belirlenmiştir. En düşük stoma genişliği ise her iki anaç çeşidinde de kontrol grubunda tespit edilmiştir.

41 B asma anacı tohumlarından elde edilen fidelere N_2O uygulamasının stoma genişliklerine etkileri kontrol, 2.5 bar 48 saat, 2.5 bar 96 saat, 5 bar 48 saat, 5 bar 96 saat, 10 bar 48 saat ve 10 bar 96 saat için sırasıyla $17.87 \pm 0.34 \mu\text{m}$, $18.13 \pm 0.75 \mu\text{m}$, $20.82 \pm 0.71 \mu\text{m}$, $22.57 \pm 0.46 \mu\text{m}$, $23.55 \pm 0.18 \mu\text{m}$, $22.92 \pm 0.20 \mu\text{m}$ ve $23.82 \pm 0.34 \mu\text{m}$ olurken Fercal asma anacında bu değerler aynı sırayla $18.04 \pm 0.32 \mu\text{m}$, $18.48 \pm 0.34 \mu\text{m}$, $20.48 \pm 0.36 \mu\text{m}$, $20.68 \pm 0.20 \mu\text{m}$, $22.87 \pm 0.22 \mu\text{m}$, $22.15 \pm 0.29 \mu\text{m}$ ve $23.77 \pm 0.26 \mu\text{m}$ 'dir. Yapılan N_2O uygulamaları sonucunda en geniş stomalar her iki anaçta da 10 bar 96 saat uygulamasında belirlenirken en düşük stoma genişlikleri yine iki anaçta da kontrolde tespit edilmiştir.

N_2O gazının 41 B asma anacı çelikleri sürdürüldükten sonra sürgün ucuna uygulanmasıyla elde edilen stoma genişlikleri kontrol, 2.5 bar 48 saat, 2.5 bar 96 saat, 5 bar 48 saat, 5 bar 96 saat, 10 bar 48 saat ve 10 bar 96 saat için sırasıyla $18.15 \pm 0.29 \mu\text{m}$, $18.33 \pm 0.37 \mu\text{m}$, $18.26 \pm 0.24 \mu\text{m}$, $18.66 \pm 0.15 \mu\text{m}$, $18.93 \pm 0.20 \mu\text{m}$, $18.67 \pm 0.48 \mu\text{m}$ ve $19.45 \pm 0.28 \mu\text{m}$ 'dir. Fercal asma anacı çeliklerine yapılan uygulamalar sonucunda ise yine aynı sırayla $18.40 \pm 0.43 \mu\text{m}$, $18.20 \pm 0.29 \mu\text{m}$, $18.46 \pm 0.25 \mu\text{m}$, $18.32 \pm 0.18 \mu\text{m}$, $18.98 \pm 0.24 \mu\text{m}$, $19.07 \pm 0.26 \mu\text{m}$ ve $19.33 \pm 0.45 \mu\text{m}$ olarak kaydedilmiştir. Bu uygulamalar sonucunda en düşük stoma genişliği 41 B asma anacında kontrolde belirlenirken Fercal asma anacında 2.5 bar 48 saat uygulamasında kaydedilmiştir. En geniş stomalar ise her iki asma anacında 10 bar 96 saat uygulamasında tespit edilmiştir.



Şekil 4.7. 41 B ve Fercal asma anacı tohum ve çeliklerine yapılan uygulamaların stoma genişliğine etkileri

4.5. Kloroplast Sayısı

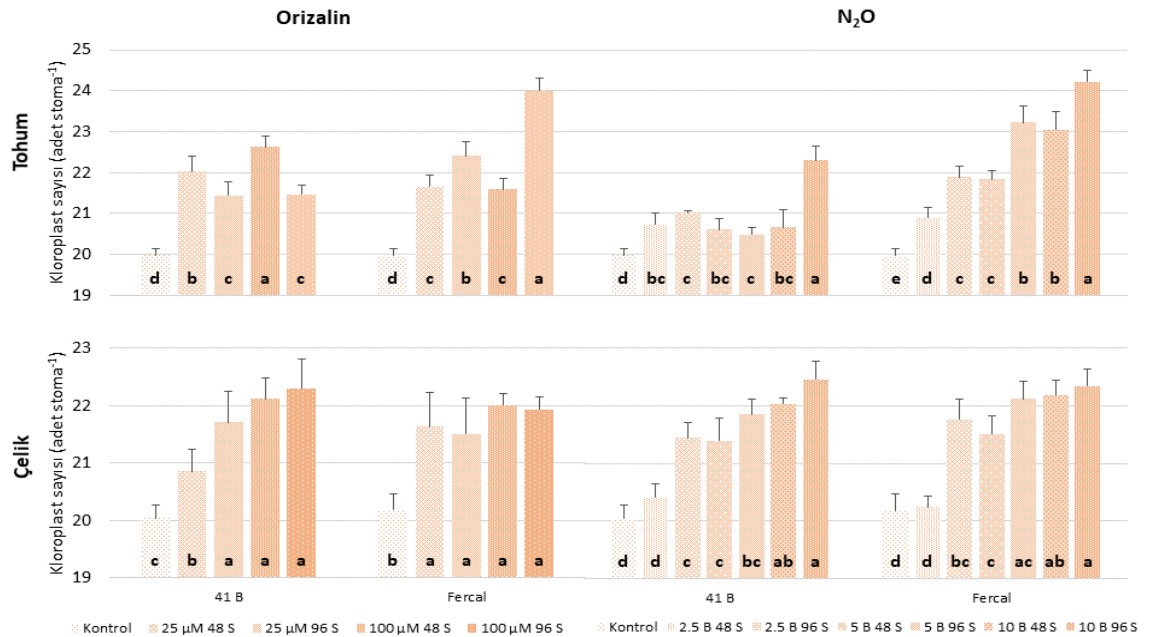
41 B ve Fercal asma anacı çelik ve tohumlarına yapılan orizalin ve N₂O uygulamalarının kloroplast sayıları üzerine etkileri tüm doz ve sürelerde önemli bulunmuştur (Şekil 4.8). 41 B asma anacı tohumları çimlendikten sonraki kotiledon yaprakları arasındaki büyüme bölgesine yapılan orizalin uygulamalarının kloroplast sayısına etkileri kontrol, 25 µM 48 saat, 25 µM 96 saat, 100 µM 48 saat ve 100 µM 96 saat için sırasıyla 19.98±0.16, 22.03±0.37, 21.44±0.33, 22.63±0.26 ve 21.46±0.22 adet olarak belirlenirken aynı uygulamaların Fercal asma anacına etkileri yine aynı sırayla 19.96±0.18, 21.66±0.27, 22.40±0.36, 21.60±0.25 ve 24.00±0.32 adettir. Orizalin uygulamasıyla en az kloroplast sayısı her iki asma anacında da kontrolde belirlenmiştir. 41 B asma anacında en fazla kloroplast sayıları 100 µM 48 saat uygulamasında kaydedilirken Fercal asma anacında ise 100 µM 96 saat uygulamasında tespit edilmiştir.

Orizalin uygulamalarının çeliklere olan etkileri incelendiğinde 41 B asma anacı çelikleri kloroplast sayıları kontrol, 25 µM 48 saat, 25 µM 96 saat, 100 µM 48 saat ve 100 µM 96 saat için sırasıyla 20.04±0.23, 20.85±0.40, 21.71±0.53, 22.11±0.36 ve 22.30±0.50 adet olarak kaydedilirken Fercal asma anacında bu değerler sırayla 20.18±0.29, 21.63±0.59, 21.50±0.64, 22.01±0.20 ve 21.93±0.22 adettir. Çeliklere yapılan uygulamalar sonucunda en düşük kloroplast sayıları iki asma anacında da

kontrolde belirlenmiştir. 41 B asma anacında 100 μ M 96 saat, Fercal asma anacında ise 100 μ M 48 saat uygulamaları en fazla kloroplast artışına neden olan uygulamalar olmuştur.

41 B asma anacı tohumlarının çimlenmesiyle oluşan fidelere yapılan N₂O uygulaması sonucunda elde edilen kloroplast verileri kontrol, 2.5 bar 48 saat, 2.5 bar 96 saat, 5 bar 48 saat, 5 bar 96 saat, 10 bar 48 saat ve 10 bar 96 saat için sırasıyla 19.98 $\pm$ 0.16, 20.73 $\pm$ 0.28, 21.02 $\pm$ 0.05, 20.60 $\pm$ 0.26, 20.48 $\pm$ 0.17, 20.66 $\pm$ 0.44 ve 22.31 $\pm$ 0.34 adet olarak belirlenmiştir. Fercal asma anacı tohumlarına yapılan uygulamalar sonucunda ise yine sırasıyla 19.96 $\pm$ 0.18, 20.89 $\pm$ 0.25, 21.89 $\pm$ 0.25, 21.83 $\pm$ 0.22, 23.23 $\pm$ 0.41, 23.05 $\pm$ 0.45 ve 24.22 $\pm$ 0.27 adettir. Her iki asma anacında da en düşük kloroplast sayıları kontrolde kaydedilirken en fazla kloroplast artışı meydana gelen uygulamalar ise iki anaçta da 10 bar 96 saat uygulamasında olmuştur.

N₂O gazının 41 B asma anacı çelikleri sürdürüldükten sonra sürgün ucuna yapılan uygulamaların kloroplast sayısına etkileri kontrol, 2.5 bar 48 saat, 2.5 bar 96 saat, 5 bar 48 saat, 5 bar 96 saat, 10 bar 48 saat ve 10 bar 96 saat için sırasıyla 20.04 $\pm$ 0.23, 20.41 $\pm$ 0.25, 21.45 $\pm$ 0.27, 21.40 $\pm$ 0.38, 21.85 $\pm$ 0.26, 22.03 $\pm$ 0.11 ve 22.46 $\pm$ 0.31 adettir. Fercal asma anacında ise bu değerler sırasıyla 20.18 $\pm$ 0.29, 20.24 $\pm$ 0.18, 21.76 $\pm$ 0.35, 21.51 $\pm$ 0.32, 22.11 $\pm$ 0.32, 22.18 $\pm$ 0.25, 22.34 $\pm$ 0.28 adet olarak kaydedilmiştir. Her iki asma anacında da en düşük kloroplast sayıları kontrolde belirlenirken en fazla kloroplast artışı 10 bar 96 saat uygulamasında tespit edilmiştir.



Şekil 4.8. 41 B ve Fercal asma anacı tohum ve çeliklerine yapılan uygulamaların kloroplast sayısına etkileri

4.6. Yaprak Klorofil İçeriği (SPAD)

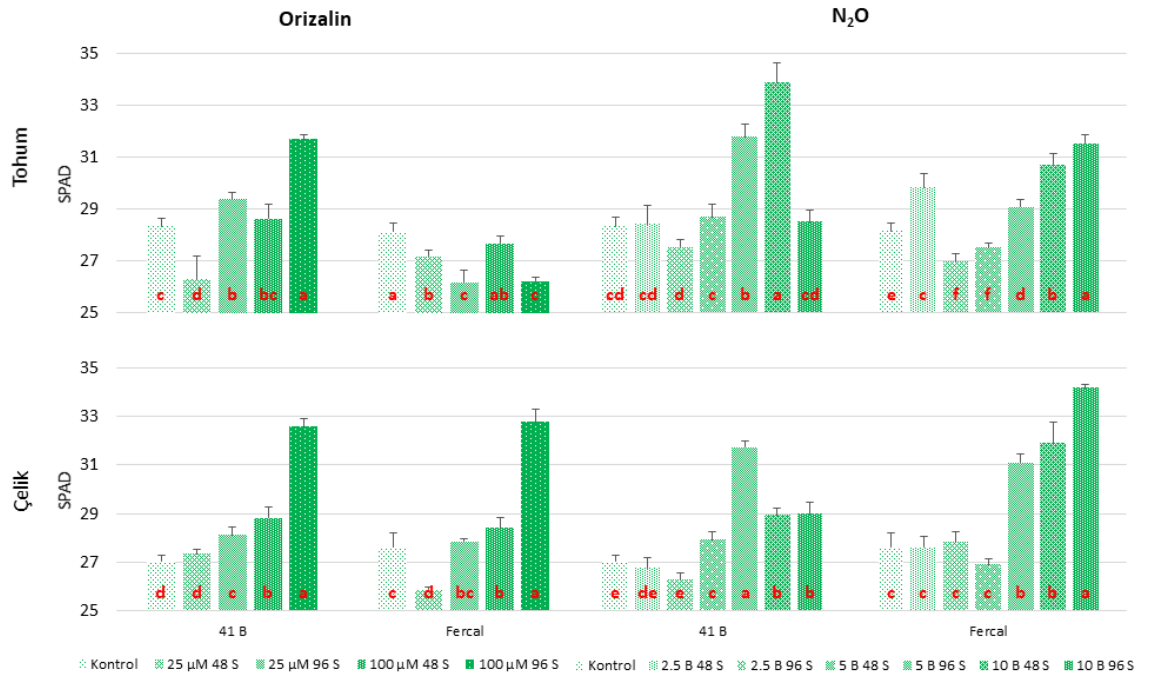
Orizalin ve N₂O'nun 41 B ve Fercal asma anacı tohum ve çeliklerine uygulanmasıyla elde edilen klorofil içeriği verilerinin tamamı önemli bulunmuştur (Şekil 4.9). 41 B asma anacı tohumlarından elde edilen bitkilere kotiledon yapraklarının olduğu aşamada yapılan uygulamaların etkileri kontrol, 25 µM 48 saat, 25 µM 96 saat, 100 µM 48 saat ve 100 µM 96 saat için sırasıyla 28.32±0.33, 26.29±0.90, 29.38±0.26, 28.63±0.53 ve 31.69±0.14 SPAD değeri olarak tespit edilmiştir. Fercal asma anacı için bu değerler aynı sırayla 28.13±0.31, 27.18±0.23, 26.18±0.46, 27.67±0.31 ve 26.22±0.15 SPAD değeridir. Klorofil içeriği en fazla olan uygulama 41 B asma anacında 100 µM 96 saat olurken Fercal asma anacında en yüksek klorofil içeriği kontrolde tespit edilmiştir. En düşük klorofil içerikleri 41 B asma anacında 25 µM 48 saat uygulamasında belirlenirken Fercal asma anacında 25 µM 96 saat uygulamasında kaydedilmiştir.

Orizalinin 41 B asma anacı çeliklerinin sürgün ucuna yapılan uygulamalarından elde edilen klorofil içeriği verileri kontrol, 25 µM 48 saat, 25 µM 96 saat, 100 µM 48 saat ve 100 µM 96 saat için sırasıyla 27.02±0.26, 27.35±0.16, 28.13±0.30, 28.83±0.46 ve 32.59±0.33 SPAD değeridir. Fercal asma anacında ise bu değerler yine aynı sırayla 27.62±0.57, 25.87±0.12, 27.87±0.10, 28.42±0.42, ve 32.78±0.52 SPAD değeri olarak tespit edilmiştir. Her iki asma anacında da en yüksek klorofil içeriği 100 µM 96 saat uygulamasında belirlenmiştir. En düşük klorofil içerikleri 41 B asma anacında kontrolde tespit edilirken Fercal asma anacında 25 µM 48 saat uygulamasında kaydedilmiştir.

41 B asma anacı tohumlarının çim köklerinin olduğu aşamada yapılan N₂O uygulamaları sonucunda elde edilen klorofil miktarları kontrol, 2.5 bar 48 saat, 2.5 bar 96 saat, 5 bar 48 saat, 5 bar 96 saat, 10 bar 48 saat ve 10 bar 96 saat için sırasıyla 28.32±0.33, 28.40±0.71, 27.52±0.29, 28.68±0.50, 31.78±0.49, 33.86±0.79 ve 28.50±0.43 SPAD değeri olarak belirlenmiştir. Fercal asma anacında ise bu değerleri 28.13±0.31, 29.82±0.52, 26.95±0.31, 27.49±0.18, 29.07±0.27, 30.71±0.39 ve 31.52±0.34 SPAD değeridir. Uygulamaların klorofil içeriğine etkileri incelendiğinde en yüksek klorofil içeriği 41 B asma anacında 10 bar 48 saatte, Fercal asma anacında ise 10 bar 96 saat uygulamasında kaydedilmiştir. En düşük klorofil içerikleri iki asma anacında da 2.5 bar 96 saat uygulamasında tespit edilmiştir.

Çeliklerin sürdürülmesiyle sürgün uçlarına yapılan N₂O uygulamaları sonucunda 41 B asma anacı klorofil içerikleri kontrol, 2.5 bar 48 saat, 2.5 bar 96 saat, 5 bar 48 saat,

5 bar 96 saat, 10 bar 48 saat ve 10 bar 96 saat için sırasıyla 27.02 ± 0.26 , 26.77 ± 0.40 , 26.29 ± 0.27 , 27.93 ± 0.32 , 31.73 ± 0.27 , 28.95 ± 0.27 ve 28.98 ± 0.48 SPAD değeridir. Fercal asma anacında ise bu değerler 27.62 ± 0.57 , 27.61 ± 0.43 , 27.82 ± 0.42 , 26.91 ± 0.22 , 31.09 ± 0.34 , 31.90 ± 0.86 ve 34.16 ± 0.16 SPAD değeri olarak tespit edilmiştir. Çeliklere yapılan uygulamalar sonucunda en yüksek klorofil içeriği 41 B asma anacında 5 bar 96 saat uygulamasında belirlenirken Fercal asma anacında ise 10 bar 96 saat uygulamasında kaydedilmiştir. En düşük klorofil içerikleri 41 B asma anacında 2.5 bar 96 saatte kaydedilirken Fercal asma anacında ise 5 bar 48 saat uygulamasında tespit edilmektedir.



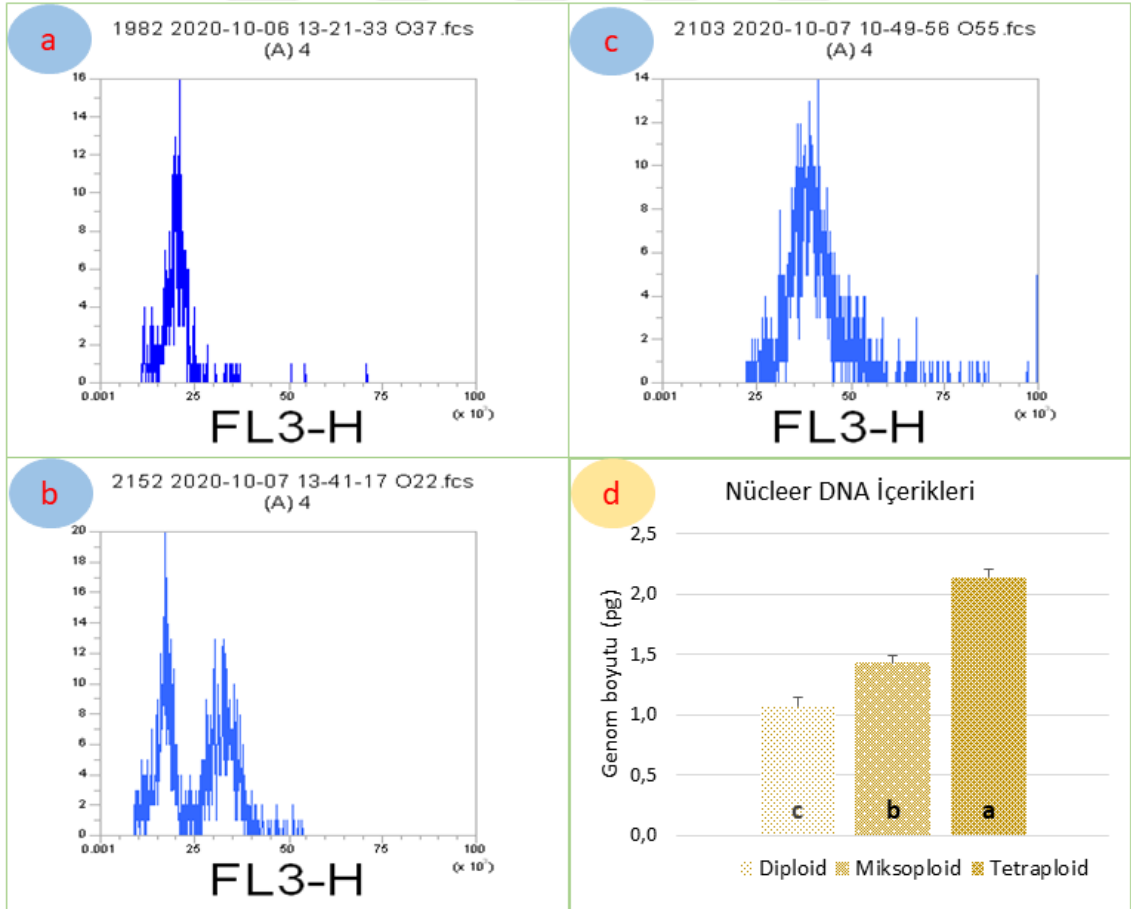
Şekil 4.9. 41 B ve Fercal asma anacı tohum ve çeliklerine yapılan uygulamaların klorofil içeriğine etkileri

4.7. Flow Sitometri (FC) Analizi ve Nükleer DNA İçeriği

FC analizi, ploidi seviyesini belirlemek ve poliploidi teşvik başarısını doğrulamak için hızlı, güvenilir ve basit bir yöntemdir ve kısa sürede çok sayıda hedef bitkinin analizini mümkün kılar (Roy ve ark., 2001). Yine, FC analizi, teşvik edilen poliploidizasyonu değerlendirmede en önde gelen yöntemdir (Dhooghe ve ark., 2011). FC analizinde, ploidi seviyesi, nispi veya mutlak DNA içeriği-DNA ploidi seviyesi ile olan korelasyonuyla anlaşılır. Bu nedenle, DNA içeriğindeki bir artışın kromozom sayısındaki artışlara karşılık geldiği varsayılırsa, bilinen bir ploidi düzeyine sahip bir

örneğin DNA içeriği, bilinmeyen bir örneğin DNA ploidi düzeyini belirlemek için bir referans standardı olarak kullanılabilir (Dolezel ve ark., 2007). Yaptığımız kloroplast sayımları sonucunda tüm uygulamalardan toplam 55 adet fidede poliploidi bulgularına rastlanmıştır ve bu örneklerin ploidi seviyesini doğrulamak için FC analizi yapılmıştır. FC analizi sonucunda 5 adet miksploit ve 1 adet tetraploit (10 bar-96 saat) bitki tespit edilmiştir. Miksploit bitkilerin 4 tanesi Fercal, 1 tanesi de 41 B asma anacı tohumlarına yapılan uygulamalardan olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen 1 adet Fercal fidesinin tetraploit olduğu FC analiziyle doğrulanmıştır (Şekil 4.10).

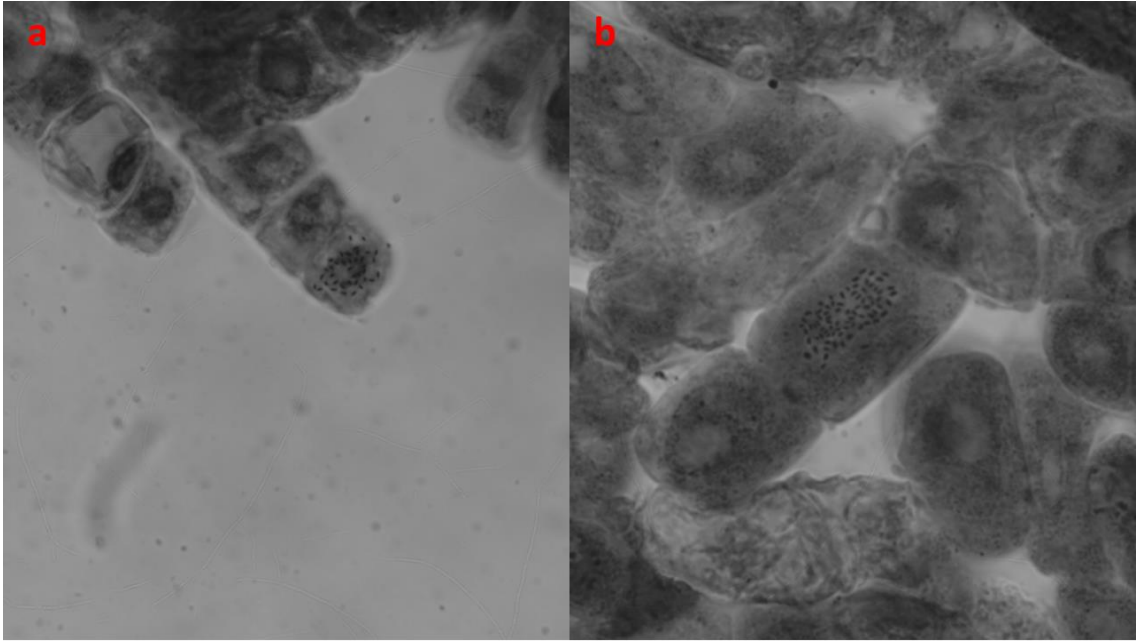
Ploidi düzeyi farklı olduğu FC analizleriyle de doğrulanmış asma anacı fidelerinin nükleer DNA içeriklerinin önemli düzeyde farklı olduğu belirlenmiştir. Diploit, miksploit ve tetraploit olduğu FC analiziyle doğrulanmış bitkilerin nükleer DNA içerikleri sırasıyla 1.07, 1.43 ve 2.14 pg olarak belirlenmiştir (Şekil 4.10). Tetraploit bitkinin nükleer DNA içeriği diploitlere kıyasla iki kat olarak tespit edilirken miksploit bitkilerde yaklaşık 1.34 katı olduğu kaydedilmiştir.



Şekil 4.10. FC ve Nükleer DNA içerikleri (a: Diploit 41 B, b: miksploit 41 B c: tetraploid Fercal ve d: farklı ploidi seviyesine sahip bitkilerin nükleer DNA içerikleri)

4.8. Kromozom Sayısı

Poliploidi çalışmalarında genotiplerin ploidi düzeyini belirlemede kullanılan en güvenilir ve doğru yöntemin kromozom sayımı olduğu bildirilmiştir (Ochatt ve ark., 2011). Ploidi düzeyi FC analizi sonucunda belirlenen diploit ve tetraploit Fercal (10 bar 96 saat uygulamasıyla elde edilmiştir) asma anaçlarının kromozom sayıları kök ucu ezme tekniğiyle hazırlanan preparatlarda tespit edilmiştir (Şekil 4.11). Kromozom sayımı için FC analiziyle farklı olduğu tespit edilen tetraploit Fercal genotipinin doku kültürü ile çoğaltılması sonucunda elde edilen bitkiden taze kök uçları alınmıştır. Ayrıca diploit Fercal asma anacının da doku kültürü yöntemiyle taze kök uçları elde edilmiştir. Diploit Fercal asma anacının kromozom sayısı $2n=38$ olarak belirlenirken tetraploit Fercal genotipinin kromozom sayıları ise $2n=4x=76$ olarak tespit edilmiştir. Yapılan kromozom sayımları FC analizlerini doğrulamıştır.

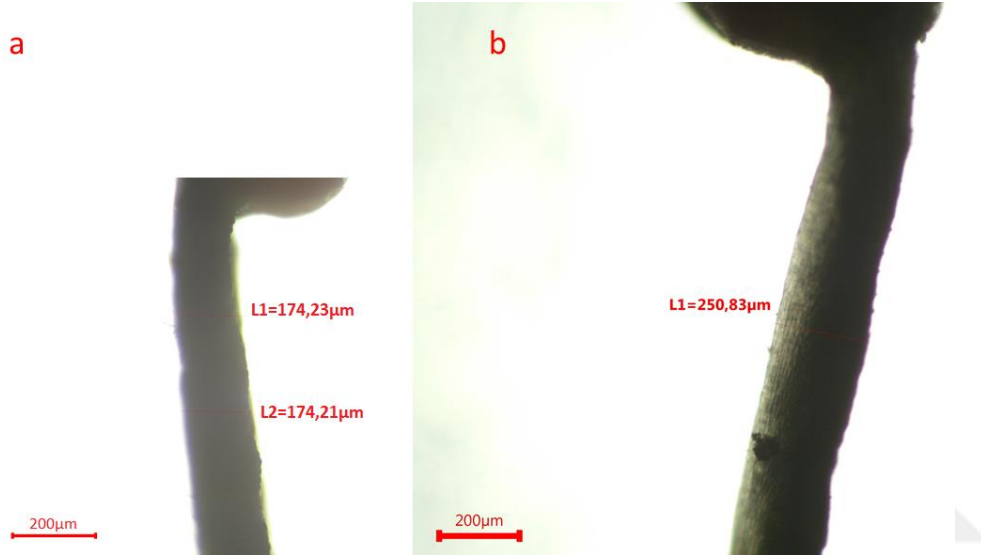


Şekil 4.11. Diploit Fercal (a: $2n=38$) ve tetraploit Fercal (b: $2n=4x=76$) asma anaçlarının kromozom sayımları

4.9. Seçilmiş Bitkilerden Elde Edilen Sonuçlar

Yapılan uygulamalar sonucunda farklı olduğu FC analiziyle tespit edilen seçilmiş asma anacı fidelerimizle kontrol bitkileri (diploit ebeveyn ve 4x Kyoho) arasındaki yaprak kalınlığı, SPAD, kloroplast sayısı, stoma sayısı, stoma uzunluğu ve stoma genişliği verileri önemli bulunmuştur. Seçilmiş bitkiler ile kontrol bitkilerinin yaprak kalınlığı verileri diploit, miksploit, tetraploit ve Kyoho üzüm çeşidi için

sırasıyla $190.05 \pm 4.78 \mu\text{m}$, $215.02 \pm 4.75 \mu\text{m}$, $226.38 \pm 4.65 \mu\text{m}$ ve $229.50 \pm 8.08 \mu\text{m}$ olarak tespit edilmiştir. Elde edilen poliploit fidelerin yaprak kalınlıkları diploit kontrol bitkisinden önemli ölçüde fazladır. SPAD değerlerini incelediğimizde ise diploit, miksploit, tetraploit ve Kyoho üzüm çeşidi için sırasıyla 26.61 ± 0.56 , 29.64 ± 0.34 , 34.20 ± 0.60 ve 34.31 ± 0.91 SPAD olarak tespit edilmiştir. Ploidi seviyesi arttıkça SPAD değerleri de artmıştır. En yüksek SPAD değeri Kyoho üzüm çeşidinde belirlenirken en düşük değer diploit bitkilerde tespit edilmiştir (Tablo 4.1).



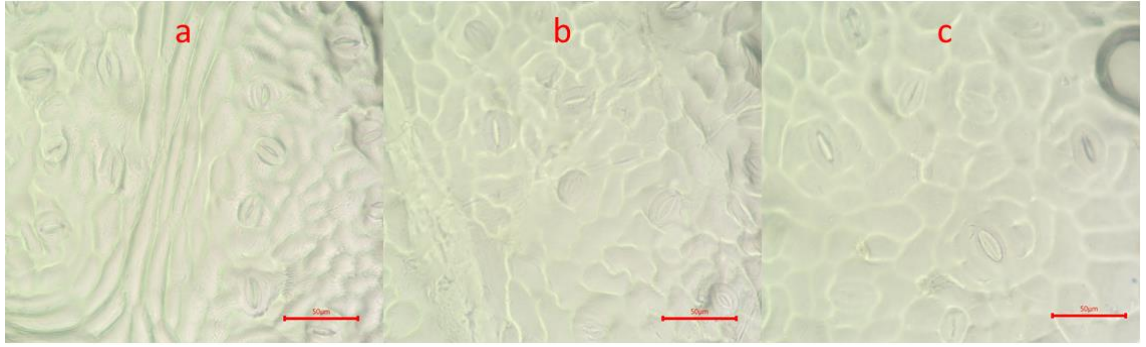
Şekil 4.12. Diploit Fercal (a) ve tetraploit Fercal (b) asma anaçlarının yaprak kalınlıkları

Seçilmiş fideler ve kontrol bitkilerinin stoma bekçi hücrelerindeki kloroplast sayıları diploit, miksploit, tetraploit ve Kyoho üzüm çeşidi için sırasıyla 20.09 ± 0.18 , 31.87 ± 0.28 , 39.93 ± 0.14 ve 40.03 ± 0.12 adet stoma⁻¹ olarak belirlenmiştir. En düşük kloroplast sayısı diploit bitkilerde belirlenirken en yüksek kloroplast sayısı ise Kyoho üzüm çeşidinde tespit edilmiştir. Miksploit bitkilerin kloroplast sayıları diploidlere kıyasla yaklaşık 1.5 kat fazla olurken tetraploit bitkiler ise yaklaşık 2 kat fazladır (Tablo 4.1).



Şekil 4.13. Diploit 41 B (a: 20 adet), miksploit Fercal (b: 30 adet) ve tetraploit Fercal (c: 39 adet) asma anaçlarının kloroplast sayıları

Birim alana (mm^2) düşen stoma sayılarını incelediğimizde diploit, miksploit, tetraploit ve Kyoho üzüm çeşidi için veriler sırasıyla 194.58 ± 5.92 , 153.61 ± 3.82 , 145.33 ± 4.05 ve 140.24 ± 4.99 adet olarak belirlenmiştir. En düşük stoma sayısı Kyoho üzüm çeşidinde belirlenirken en yüksek stoma sayıları ise diploit 41 B kontrol bitkisinde tespit edilmiştir. Ploidi seyisi artışı ile stoma sayısı arasında negatif bir ilişki vardır. Seçilmiş bitkiler ve kontrol bitkilerinin stoma uzunluğu verileri diploit, miksploit, tetraploit ve Kyoho üzüm çeşidi için sırasıyla 26.03 ± 0.5 μm , 29.12 ± 0.40 μm , 33.25 ± 0.94 μm ve 35.72 ± 0.60 μm olarak belirlenirken stoma genişlikleri ise sırasıyla 19.01 ± 0.75 μm , 21.79 ± 0.40 μm , 26.20 ± 0.78 μm ve 27.45 ± 1.25 μm 'dir. En düşük stoma uzunluğu ve genişliği diploit 41 B kontrol bitkisinde belirlenirken en yüksek veriler Kyoho üzüm çeşidinde tespit edilmiştir. Ploidi seviyesi artışı stoma uzunluğu ve genişliğini de arttırmıştır (Tablo 4.1).



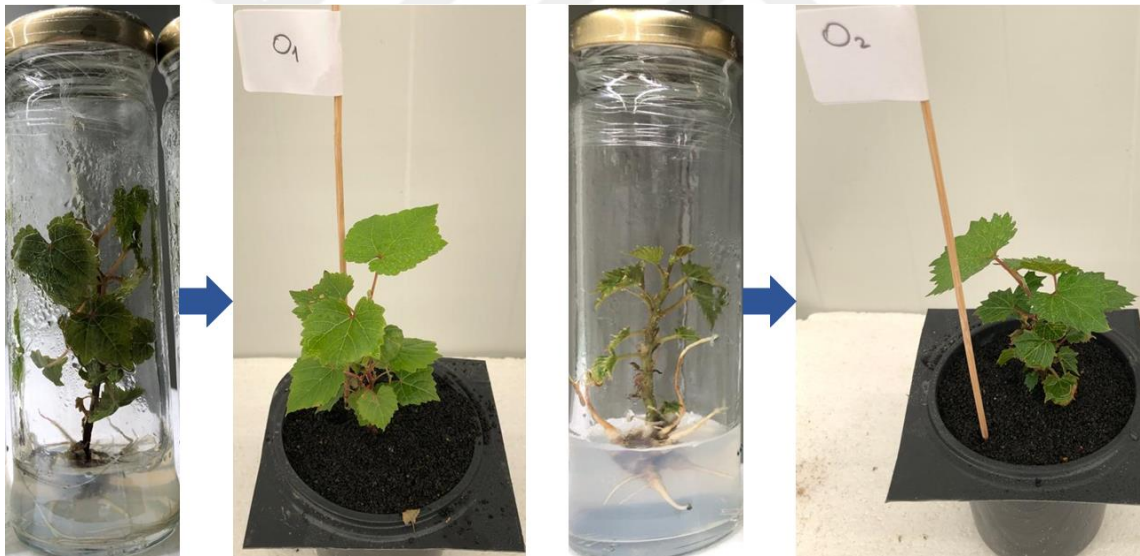
Şekil 4.14. Diploit 41 B (a), miksploit Fercal (b) ve tetraploit Fercal (c) asma anaçlarının stoma boyutları

Tablo 4.1 Seçilmiş bitkiler ve kontrol bitkilerinin sitolojik ve morfolojik özellikleri

	Yaprak kalınlığı (μm)	SPAD	Kloroplast sayısı (adet stoma ⁻¹)	Stoma sayısı (adet mm^{-2})	Stoma uzunluğu (μm)	Stoma genişliği (μm)
Diploit (41 B)	190.05 ± 4.78 c	26.61 ± 0.56 c	20.09 ± 0.18 b	194.58 ± 5.92 a	26.03 ± 0.59 d	19.01 ± 0.75 c
Miksploit (41 B ve Fercal)	215.02 ± 4.75 b	29.64 ± 0.34 b	31.87 ± 0.28 b	153.61 ± 3.82 b	29.12 ± 0.40 c	21.79 ± 0.40 b
Tetraploit (Fercal)	226.38 ± 4.65 a	34.20 ± 0.60 a	39.93 ± 0.14 a	145.33 ± 4.05 bc	33.25 ± 0.94 b	26.20 ± 0.78 a
Kyoho	229.50 ± 8.08 a	34.31 ± 0.91 a	40.03 ± 0.12 a	140.24 ± 4.99 c	35.72 ± 0.60 a	27.45 ± 1.25 a
Aöf %5	12.61	1.41	0.41	10.30	1.43	1.64



Şekil 4.15. Uygulamalar sonucunda elde edilen miksploit ve tetraploit bitkilerin dinlenme ve gelişme dönemindeki görüntüleri



Şekil 4.16. Uygulamalar sonucunda elde edilen miksploit (O₁) ve tetraploit (O₂) bitkilerin doku kültüründe çoğaltılması

4.10. Tartışma

Mutagen uygulamaları kromozom setlerini katlayamadığı durumlarda DNA hasarlarına neden olabilmektedirler. DNA hasarları kalıcı olduğunda, hasar hücresel işlevi bozma ve mutasyona neden olma riskini barındırır. Bununla başa çıkmak için canlı organizmalar çok etkili onarım mekanizmaları geliştirmiştir (Markkanen, 2017).

DNA hasarı, genetik varyasyon hattındaki ana mutajenik süreçler arasındadır ve erken gelişime eşlik eder (Tubbs ve Nussenzweig, 2017; Sasani ve ark., 2019). Bu nedenle, mutasyonlar potansiyel olarak dokulardaki hücrelerin çoğuna geçebilir ve hasarlı bölgeler embriyonik gelişimi de etkileyebilir (Martincorena ve Campbell, 2015).

DNA hasarı ve onarımı, bir bütün olarak biyokimyası hakkında derin bilgiler içerir ve onlarca yıldır yüksek ilgi görmüştür (Markkanen, 2017). Ancak, dizileme tabanlı teknikleri kullanan yeni yaklaşımlar sayesinde, DNA hasarının (Ding ve ark., 2017; Park ve ark., 2019), onarım ara ürünlerinin (Poetsch ve ark., 2018) ve ilgili mutajenezin (Pich ve ark., 2018; Poetsch ve ark., 2018; Tomkova ve ark., 2018) genom üzerinde çoklu çözünürlük seviyelerinde heterojen bir şekilde dağıldığı ortaya çıkmıştır.

DNA hasarını ele almada çalışılan en iyi baz guanindir. Düşük oksidasyon potansiyeli (Cadet ve ark., 2006; Margolin ve ark., 2006) onu özellikle singlet oksijene (Cadet ve ark., 2017; Di Mascio ve ark., 2019) duyarlı hale getirerek 8-okso-7,8-dihidroguanin (8-oxoG) oluşumuna yol açar. 8-oxoG daha sonra replikasyon sırasında DNA'ya dahil edilebilir (Poetsch, 2020).

8-oxoG ve diğer baz modifikasyonlarını onarmak için, 8-oxoG DNA glikosilaz (OGG1) tarafından bir apuritik bölge (AP bölgesi) bırakarak kesilir (Hamilton ve ark., 2001). AP bölgeleri daha sonra AP-endonükleaz 1'in (APE1) omurga insizyonu yoluyla tek zincirli kırılmalar halinde işlenir. Uzun yama bazlı eksizyon onarımında, çoğalan hücre nükleer antijeniyle (PCNA) polimeraz delta (Pold) ve epsilon (Pole) aktivitesine bağlı olarak baz ve bazı ek nükleotidler değiştirilir. Eski zincir, ligaz I (LigI) omurgayı tekrar birbirine bağlamadan önce Flap-endonükleaz 1 (FEN1) tarafından çıkarılır. Kısa yama bazlı eksizyon onarımı, tek eksik bazın yerini alan polimeraz beta (Polb), DNA omurgasını tekrar bir araya getiren ligaz III (LigIII) ve X-ışını onarımı çapraz tamamlayıcı protein 1 (XRCC1) bu süreçte yardımcı olarak ek faktörler için bir iskele görevi görür. Bu yolun biyokimyası genel olarak iyi anlaşılmıştır (Poetsch, 2020).

Birçok baz modifikasyonu, başlangıçta bazı kesip çıkaran çeşitli glikosilazlarla BER yoluyla benzer şekilde onarılır. Bu nedenle, AP bölgeleri, onarım ara ürünleri olarak diğer baz modifikasyonlarından da türetilir. Ek olarak, AP bölgeleri spontan pirimidinasyonun giderilmesi ve pürinasyonun giderilmesinin bir ürünü olabilir (Lindahl ve Nyberg, 1972).

Farklı tekrar türleri, büyük miktarlarda 8-oxoG, telomerler (Poetsch ve ark., 2018; Wu ve ark., 2018) ve belirli dizi içeriğine sahip mikro satellitler (Ding ve ark., 2017; Poetsch ve ark., 2018) biriktirir. Tekrarlanan telomerik dizi TTAGGG guanin

uzantıları açısından zengin ve 50 guanin oksidasyona özellikle eğilimliyen (Senthilkumar ve ark., 2003; Margolin ve ark., 2008), mikro satellitlerden etkilenen diziler, örn. (TG)_n ve (TGGA)_n, mutlaka Gs sıraları gerektirmez. Hem G-dörtlü kıvrımlarda hem de mikro satellitlerde 8-oxoG birikimi DNA ikincil yapısına bağlanabilir, bu da muhtemelen telomerlerdeki bazı ikincil yapılar için gösterildiği gibi baz modifikasyonuna veya OGG1 tarafından bozulmuş eksizyona karşı daha yüksek duyarlılığa yol açar (Rhee ve ark., 2011). Potansiyel olarak dengeleyici bir mekanizma, ilave glikosilazlar, NEIL1 ve NEIL3 glikosilazları gibi G-dörtlü kıvrımlarda 8-oxoG eksizyonunu kapsayabilir (Zhou ve ark., 2013). Ayrıca, 8-oxoG'nin G-dörtlü yapılarını destabilize ettiği gözlenmiştir (Cogoi ve ark., 2018). Öte yandan, G-dörtlü kıvrımlar, konformasyonel bir değişiklikle DNA hasarıyla stabilize edilebilir; bu, 5. G izindeki 8-oxoG'nin bir AP bölgesine dönüştürülmesi ve ardından APE1 bağlanmasıyla stabilize edilir (Broxson ve ark., 2014).

AP-seq veri setinde, AP bölgeleri genellikle ökromatine karşı heterokromatinde azalır (Poetsch ve ark., 2018) ve bunların spesifik birikimi tekrarlarında, özellikle DNA hasarına ve iyonize radyasyona yanıt olarak aktive olma potansiyeline sahip olan (Farkash ve ark., 2006; Liu ve ark., 2018) retrotranspozonlarda (Poetsch ve ark., 2018) bulunabilir.

Çift sarmal kopma onarımı, kromatin yapı döngü ankrajlarından yayılan sinyaller aracılığıyla yönetilir (Natale ve ark., 2017). AP bölgesi konumu, ilgili döngünün baskın işaretine bağlı olarak kromatin yapısıyla da ilgili olduğundan, kodlama dizisindeki azaltılmış DNA hasar kalıpları, benzer bir tohumlama ilkesini izleyen DNA onarım organizasyonunu da yansıtabilir (Poetsch ve ark., 2018).

Fonksiyonel olarak önemli genom elementleri ve genler üzerindeki onarımın spesifik alımı ve düzenlenmesi, onarıma karşı hasar risklerinin dengelenmesine ve esnek bir şekilde öncelik verilmesine olanak tanır. Genomun bu dinamik bölgeleri özellikle iplik kopması oluşumuna yatkın olduğundan (Kim ve Jinks-Robertson, 2012) ve genomun bu alanlarında güçlü seçici mutasyon baskısı olduğu (Sondka ve ark., 2018) bilinmektedir.

Genomun işlevsel olarak ilgili alanlarının nasıl korunduğu düzenleyici mekanizmalar ve yollar olarak bilinmemektedir, ancak BER ile etkileşime girdiği bilinen bazı işlevsel genomik süreçler bulunmaktadır. İlk olarak, 8-oxoG ve OGG1 düzeyindeki sitozin metilasyonu (Kasymov ve ark., 2013; Jiang ve ark., 2017), kromatin yeniden şekillenmesi (Xia ve ark., 2017), transkripsiyonla eşleştirilmiş onarım süreçleri

(Kamenisch ve ark., 2010), poli-ADP-riboz polimeraz 1 (Noren Hooten ve ark., 2011), CUX1 ve CUX2 (Ramdzan ve ark., 2014; Pal ve ark., 2015) ve RNA birleştirme makinesinin bileşenleridir (Ewing ve ark., 2007). İkincisi, AP bölgeleri ve APE1 düzeyinde, epigenetik değiştiricilerin APE1 konumunu, özellikle SET kompleksini, histon deasetilazları (HDAC'ler) ve sirtuin'i (SIRT1) etkilediği gösterilmiştir (Bhakat ve ark., 2003; Yamamori ve ark., 2010). APE1'in lokalizasyonuna nükleofosmin (NPM1) aracılık ettiği bilinmektedir (Vascotto ve ark., 2009). APE1 ayrıca ekleme düzenleyicileri (HNRNPL) (Kuninger ve ark., 2002) ve transkripsiyon faktörleri (AP1) (Hirota ve ark., 1997) ile etkileşime girer ve aktif transkripsiyona bir bağlantı sağlayarak DNA-RNA hibritlerine ve R-döngülerine (Berquist ve ark., 2008) alınır.

Son olarak, doğrudan dizi bağlamıyla ilgili olarak, tek nükleotid çözünürlüğü ile 8-oxoG'yi ölçmek için tek yöntem, kimyasal dizi yatkınlığı ile açıklanabilen (Senthilkumar ve ark., 2003; Margolin ve ark., 2008) 30 ila 8-oxoG guaninine doğru bir sapma bulunmasıdır. Bu nedenle genom üzerindeki dinükleotid dağılımı da 8-oxoG'nin yerini etkiler (Wu ve ark., 2018).

DNA hasarının genom-özellikliğini ve çoklu çözünürlük katmanlarında birkaç onarım adımını potansiyel olarak etkilemede yer alan DNA dizisi özelliklerinin yanı sıra çoklu yollar vardır. Her bir katmanın göreceli katkısı ve kesin mekanizmalar tam olarak anlaşılamamıştır, ancak DNA'nın sıkı nükleotit paketlenme ve heterokromatin tarafından engellenen baz eksizyon onarımına erişilebilirliğinde güçlü bir hasar dağılımı belirleyicisi bulunabilir. Bununla birlikte, özellikle genomun düzenleyici ve kodlayıcı bölgelerinde, etkileşimli katkıların, DNA hasarının nihai dağılımına yol açması beklenir, bu nedenle belirli bir hücre tipindeki her bir faktörün nispi aktivitesine bağlıdır (Poetsch, 2020).

DNA hasarının epigenetik işlevi, DNA metilasyon mekanizması ve diğer epigenetik işaretlerin metabolizması ile uyum içinde hareket edebilir. 8-oxoG'nin onarımı, mekanik olarak DNA metilasyonu ile bağlantılıdır, ancak DNA metilasyonunun DNA hasar onarımını nasıl etkilediğinin mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır (Tomkova ve Schuster-Böckler, 2018).

Fizyolojik koşullar altında hücrelerde ortalama olarak meydana geldiği tahmin edilen yaklaşık 20.000 baz lezyonun (Lindahl, 1993) çoğu mutasyona dönüşmez çünkü bunlar replikasyon sırasında genetik bilgi kaybı veya değişikliği olmaksızın onarılır veya tolere edilir. Bununla birlikte, onarılmamış DNA hasarı ve onarım ara ürünleri, mutajenez risklerini barındırır. Bu, DNA replikasyonu sırasında meydana gelebilen 8-

oxoG'nin adenin ile yanlış eşleşmesi yoluyla gerçekleşir (Shibutani ve ark., 1991). Ancak bu uyumsuzluğun kendi güvenlik mekanizması vardır. Susturulmuş MUTYH koşulları altında veya tanınmaması durumunda S-A mutasyonu olarak ortaya çıkabilecek durumları düzeltmekten sorumlu olan atanmış MUTYH, adeninin tanınmasından ve çıkarılmasından sorumludur (Markkanen ve ark., 2013). Bununla birlikte, S-A mutasyonu, 8-oxoG'nin yanlış eşleşmesi yoluyla değil, bir onarım aracı olarak AP bölgelerini oluşturarak bilgi kaybı yoluyla DNA hasarı ile de teşvik edilebilir. Çoğaltma sırasında, AP bölgeleri uygun şekilde eşleştirilemez, tipik olarak A kuralı (Loeb, 1985; Shibutani ve ark., 1997) olarak adlandırılan şekilde boşluğun karşısına bir adenin dahil edilmesine yol açar. Her iki yolun sonucu da ayırt edilemez bir şekilde bir S-A mutasyonudur. Ek olarak, DNA hasarı, nükleotid havuzunun hasardan kaynaklanan 8-oxoG'nin uyumsuzluklarının aracılık ettiği T-G mutasyonlarına yol açabilir veya onarılmamış 8-oxoG, sitozin ile eşleşme yoluyla bir sonraki replikasyon turunda mutasyona yol açarak sonuçta T-G mutasyonuna neden olabilir (Maki ve Sekiguchi, 1992; Satou ve ark., 2007; Suzuki ve Kamiya, 2017).

Genom üzerindeki mutasyon oranlarının değişkenliği, mutajenezi incelemek için mevcut büyük miktarda yeni algoritmaların, istatistiksel ve hesaplama yaklaşımlarının geliştirilmesi nedeniyle artık giderek daha iyi anlaşılmaktadır (Pich ve ark., 2018; Gonzalez-Perez ve ark., 2019; Supek ve Lehner, 2019). Genom üzerindeki mutasyon dağılımının değişkenliği, DNA hasar mekanizmalarının, onarım yollarının ve replikasyon doğruluğunun nispi katkılarının toplamı olarak, anlık dizi içeriğinden megabazlara kadar çoklu çözünürlük ölçeklerinde meydana gelir. Her bir katmanın mekanik detayları ve mutajenik mekanizmaların genom bağlamında nasıl hareket ettiği, mekanizmaların çoğu için hala tam olarak anlaşılamamıştır. Ancak, geliştirilen mutasyon imzalarının yardımıyla hangi sistemlerde hangi mutajenik mekanizmaların aktif olduğunu değerlendirebilmekteyiz (Alexandrov ve ark., 2013; Alexandrov ve ark., 2018). Bunlar, kendi trinükleotid bağlamındaki mutasyonların parmak izleridir. Belirli modellerin birlikte ortaya çıkması, aktif olan mutajenik mekanizmaların ayrılmasına izin verir. Geriye dönük olarak, mutasyon imzaları biyolojik mekanizmalarla bağlantılıdır (Connor ve ark., 2018; Zou ve ark., 2018; Kucab ve ark., 2019), ancak çoğunun etiyolojisi hala tam olarak anlaşılmamıştır (Helleday ve ark., 2014; Alexandrov ve ark., 2018).

Mutasyon imzaları yardımıyla, DNA hasarı kaynaklı mutasyonların genomda nasıl dağıldığı belirlenebilir. Genel olarak, geç kopyalanan DNA'daki daha yüksek

mutasyon oranları, hataya meyilli polimerazların artan aktivitesi (Lujan ve ark., 2014) ve ribonükleotitlerin artan katılımı (Reijns ve ark., 2015) ile açıklanabilir, bu da heterokromatinde mutasyon birikiminin artmasına neden olur (Schuster-Böckler ve Lehner, 2012; Polak ve ark., 2014).

Mutasyonların dağılımına ilişkin mevcut veriler birçok açık soru bırakmaktadır. DNA hasarı nedeniyle oluşan mutasyonların genom üzerinde çeşitli ayrışma seviyelerinde heterojen bir şekilde dağıldığını ve DNA'nın baz eksizyon onarımına erişilebilirliğinin, nükleozom ve kromatin alanı seviyelerindeki hasar dağılımının ana belirleyicisi olarak ortaya çıktığını anlıyoruz. Genler ve düzenleyici unsurlar düzeyinde dağılıma yol açan kesin mekanizmalar ve bunların etkileşimi büyük ölçüde hala belirsizdir. Mutasyonlar genellikle 8-oxoG'ye benzer dağılımları takip eder, ancak hasar dağılımının ne kadarının hasar etkisinin özgüllüğünden kaynaklandığı ve ne kadarının BER yoluyla hasarın onarımına aracılık ettiği büyük ölçüde belirsizdir. Ayrıca, DNA hasarı yoluyla mutasyonları teşvik eden hedeflenmiş mekanizmalar, LSD1'in enzimatik işlevi gibi bölgeye özgü bir şekilde izlerini bırakabilir (Poetsch, 2020).

Yapılan uygulamalar sonucunda morfolojik ve sitolojik farklılıklar meydana gelmesine rağmen FC analizleri sonucunda birçok bitkide farklılık oluşmamış, bunun da asmanın DNA hasar onarımıyla ilişkili olduğu düşünülmektedir.

4.10.1. Canlılık oranı

Tarafımızdan yapılan 41 B ve Fercal asma anacı çimlenmiş tohum, fide ve çeliklerine orizalin ve N₂O uygulamaları canlılık oranlarını tüm uygulamalarda azaltmıştır. İki asma anacı tohum ve çeliklerine yapılan orizalin uygulamaları sonucunda en düşük canlılık oranı 100 µM 96 saat uygulamasında belirlenirken N₂O uygulamaların da en düşük canlılık oranı iki anaçta da 10 bar 96 saat uygulamasında tespit edilmiştir. Uygulanan materyal tipleri bazında bakıldığında orizalin ve N₂O uygulamalarına asma anacı çeliklerinin tohum ve fidelerden daha hassas etki gösterdiği belirlenmiştir. Mutajenler karşılaştırıldığında, tohumların orizaline karşı N₂O'ya göre daha hassas tepki verdiği belirlenirken çeliklerin N₂O'ya daha hassas olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.1). Özellikle yüksek konsantrasyonlarda uygulanan antimitotik ajanlar genellikle bitki canlılığını engellemektedir (Zakizadeh ve ark., 2020). Önceki çalışmalarda da orizalin (Xie ve ark., 2015) ve N₂O (Molenaar ve ark., 2018) uygulamalarının canlılık oranını azalttığı bildirilmiştir. Bazı araştırmacılar, orizalinin,

özellikle yüksek konsantrasyonlarda ve daha uzun uygulama sürelerinde bitkiler için oldukça toksik olduğunu göstermiştir (Dunn ve Lindstrom, 2007; Dhooghe ve ark., 2009). Genel olarak, daha düşük konsantrasyon ve daha kısa uygulama süreleri, hayatta kalma oranını arttırırken, tetraploit bitkilerin elde etme frekansını azaltmaktadır (Chakraborti ve ark., 1998; Väinölä, 2000; Zhang ve ark., 2008). Bizim çalışmamızda elde edilen tetraploit (10 bar 96 saat N₂O uygulaması) ve miksoiploit (100 µM 96 saat orizalin uygulaması) bitkilerde en yüksek doz ve süre uygulamalarında belirlenmiştir.

Mutajenik etkiye sahip herbisitler yaprak klorozu, yapraklarda solma ve nekroz oluşturmaktadır. Ayrıca herbisitler kök dokusunda ACC (Asetil CoA Karboksilaz) sentez aktivitesinin uyarılmasını içerir. Bu da ACC oksidaz aktivitesi ile yüksek seviyelerde etilen ve siyanüre dönüştürüldüğü sürgünlerde ACC birikmesine yol açar. Bu siyanür, hücre ve bitki ölümüne neden olan toksik ajandır (Dayan ve Watson, 2011).

Poliploidi çalışmalarında kullanılan mutajenlerin canlılık oranını azalttığı ve yapılan uygulamaların poliploidiyi teşvik etmesi durumunda düşük canlılık oranının dezavantaj olmayacağı ileri sürülmüştür (Väinölä, 2000).

Kara ve ark. (2021), Ekşi Kara ve Gök Üzüm çeşitlerine N₂O, orizalin ve bunların kombinasyonu sonucunda tüm uygulamalarda canlılık oranının kontrole göre önemli düzeyde azaldığını belirlemişlerdir. Zakizadeh ve ark. (2020) *in vitro* koşullarda elde edilen bitkiciklere 4 gün boyunca 0.00, 14.14 ve 28.90 µM dozunda orizalin uyguladıklarında canlılık oranlarını sırasıyla 98.00±4.65, 82.00±3.36 ve 0 olarak bildirmişlerdir. Farklı orizalin doz ve maruz kalma sürelerinin canlılık oranına etkilerinde önemli farklılıklar gözlenmemesine rağmen, tüm bu oranlar, kontrollerden daha düşük olduğunu belirlemişlerdir (Zeng ve ark., 2019). Wongprichachan ve ark. (2013b) ise 5 bar N₂O gazını 0, 24 ve 48 saat uygulaması yapmışlar ve elde ettikleri tohumların canlılık oranını sırasıyla %85.7, 80.9 ve 59.7 olarak belirlemişlerdir. Bizim çalışmamızda da mutajen uygulamalarının canlılık oranını düşürmesi önceki çalışmalarla benzerlik göstermektedir.

4.10.2. Ortalama öldürücü doz (LD₅₀) değeri

Tarafımızca yapılan orizalin ve N₂O uygulamalarının LD₅₀ değerleri doza ve süreye göre belirlenmiştir. Süreye bağlı LD₅₀ değerleri incelendiğinde hem asma anaçlarında hem de kullanılan bitki materyalinde uygulama süresinin artmasına ters orantılı olarak LD₅₀ değerlerinde azalma belirlenmiştir. Diğer taraftan Doza bağlı LD₅₀

değerlerinde de mutajen dozu artışına zıt yönde LD₅₀ değerleri azalmıştır. Ayrıca süre ve doza göre hesaplanan LD₅₀ değeri iki mutajende de çeliklerde daha düşük olmuştur. Doza göre yapılan LD₅₀ hesaplamalarında iki mutajende de doz artışına ters orantılı olarak LD₅₀ değerlerinde azalma belirlenmiştir. Uygulama süresi artıkça LD₅₀ değerlerinde düşüş kaydedilmiştir (Şekil 4.2 ve Şekil 4.3).

Özellikle herbisitler, karotenoid biyosentez yolunun engellenmesi, renkli karotenoid konsantrasyonunun azaltılması ve klorofil moleküllerinin fotodinamik yıkımına neden olarak yeşil dokuların beyazlaşmasına (foto ağartma) neden olmaktadır (Boger ve Sandmann, 1998). Hücre sel sızıntı üzerinde orizalin ışığa maruz kaldığında daha belirgin olan zar bütünlüğünün bir miktar kaybına neden olur (Dayan ve Watson, 2011). Herbisitlerin bitki hücreleri üzerindeki etkisi, sadece mitoz sırasında değil, aynı zamanda interfazda da mikrotübüllerin tamamen kaybıyla sonuçlanır ve sonuçta hücre ölümüne yol açabilmektedir (Yemets ve Blume, 2008).

Ortalama öldürücü doz (LD₅₀) kimyasal mutajen ajanlar için kritik bir parametre olarak genellikle kullanılmaktadır (Chen ve ark., 2020). LD₅₀ çalışmaları, belirli bir çeşidin mutajen uygulanan bitki kısmının bir mutajene duyarlılığını değerlendirir (Jain, 2010; Cabahug ve ark., 2020). Bu nedenle, hangi konsantrasyonun rejenerasyon sağ kalımını %50 oranında sağlayacağını belirlemek için bir dizi doz test edilir. Verilerin incelenmesiyle bir doz-yanıt eğrisinin oluşturulmasında uygulanan bir dizi doz, LD₅₀ dozu ve yararlı mutantların bildirildiği "optimal" olarak adlandırılan dozları belirlenir (Szarejko, 2012).

Pehlivan (2020), Sultani Çekirdeksiz ve Uslu üzüm çeşitlerinin koltuk meristemi ve kallus eksplantına sıvı ve katı MS besin ortamında orizalin (0, 20, 30, ve 40 µM dozunda 24, 36, 48 saat) uygulamıştır. Sultani Çekirdeksiz çeşidinde koltuk meristemi eksplantı için 30 µM × 48 saat, kallus eksplantı için 40 µM × 24 saat uygulamasını LD₅₀ değeri olarak belirlemiştir. Uslu çeşidinde ise koltuk meristemi eksplantı ve kallus eksplantı için 30 µM × 48 saat uygulamasını LD₅₀ değeri olarak önermiştir.

Asoko ve ark. (2020) krizanteme %0, 0.05, 0.1, 0.15 ve 0.2 kolhisin dozlarını 12 ve 24 saat uygulamışlar ve 12 saat uygulamasının %0.2 dozunu LD₅₀ değeri olarak belirlemişlerdir.

Cabahug ve ark. (2020) kolhisin (%0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0), NaN₃ (%0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1), EMS (Etil Metan Sülfonat) (%0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5) ve MMS (Metil Metan Sülfonat) (%0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5) gibi mutajenleri kullandıkları bir çalışmada üç *Echeveria* çeşidinde mutajenlerin LD₅₀ değerini belirlemeyi amaçlamışlardır. *Echeveria*

Brave çeşidinde %0.80 kolhisin dozunun 3 saat, %0.06 NaN₃ dozunun 6 saat, %0.50 EMS dozunun 9 saat ve %0.5 MMS dozunun 3 saat uygulamasını LD₅₀ değeri olarak belirlemişlerdir. *Echeveria* Viyand çeşidinde %1.00 kolhisin dozunun 12 saat, %0.02 NaN₃ dozunun 3 saat, %0.30 EMS dozunun 12 saat ve %0.2 MMS dozunun 3 saat uygulaması LD₅₀ değeri verirken *Echeveria* Snow bunny çeşidinde %1.00 kolhisin dozunun 6 saat, %0.01 NaN₃ dozunun 3 saat, %0.50 EMS dozunun 3 saat ve %0.2 MMS dozunun 3 saat uygulamasını LD₅₀ değeri olarak tespit etmişlerdir.

Chen ve ark. (2020), iki yer fıstığı çeşidine Etil Metil Sülfonat (EMS): %0.3, 0.6, 0.9 ve 1.2 dozlarını 1, 3, 5 ve 7 saat süreyle uygulamışlardır. LD₅₀ değerleri Huayu 22 çeşidi; 1, 3, 5 ve 7 saat uygulamaları için sırasıyla %0.51, %0.41, %0.27 ve %0.19, Yueyou 45 çeşidi; 1, 3, 5 ve 7 saat uygulamaları için sırasıyla %0.63, %0.40, %0.33 ve %0.31 olarak tespit etmişlerdir. Mutajen uygulama sürelerindeki artışa ters orantılı olarak LD₅₀ değerlerinde azalma kaydedilmesi bizim çalışmamızla paralellik göstermektedir.

Jyot sana, Agni ve Glory of India yıldız çiçeği çeşitlerine Gama ışınları (⁶⁰Co) (0.0, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 ve 3.0 kR) uygulanması yapmışlardır. Yapılan uygulamalar sonucunda Jyot sana, Agni ve Glory of India çeşitleri için LD₅₀ değerlerini sırasıyla 2.07 kR, 1.91 kR, ve 1.87 kR olarak tespit etmişlerdir (Pal ve ark., 2017).

Önceki çalışmalar göz önüne alındığında LD₅₀ değerleri iki şekilde hesaplanmaktadır. Birinci yöntemde %50 ölüm oranının görüldüğü uygulamalar LD₅₀ değeri olarak verilmiştir (Cabahug ve ark., 2020; Asoko ve ark. 2020; Pehlivan, 2020). İkinci yöntemde ise öldürücü doza dayalı doğrusal regresyon kullanılmıştır (Pal ve ark., 2017; Chen ve ark. 2020). Çalışmamızda süreye ve doza bağlı LD₅₀ değeri öldürücü doza dayalı doğrusal regresyon yöntemiyle tespit edilmiştir. Çalışmamız sonucunda sürenin veya dozun artışına zıt olarak LD 50 değerleri azalmış, bu sonuçlarımız önceki çalışmaları desteklemiştir (Kerdsuwan ve Te-chato, 2012; Mahajan ve ark., 2015; Pal ve ark., 2017; Chen ve ark., 2020; Hasim ve ark., 2021).

4.10.3. Yaprak kalınlığı

41 B asma anacı tohum ve çeliklerine yapılan orizalin uygulamaları sonucunda kontrole göre yaprak kalınlığında artış gözlenirken Fercal asma anacı çeliğine yapılan 25 µM dozunun 48 saat uygulaması dışındaki tüm uygulamalardaki yaprak kalınlığında artış tespit edilmiştir. N₂O uygulamaları sonucunda 41 B asma anacı tohum ve

eliklerinde en kalın yapraklar 10 bar 48 saat uygulamasında belirlenirken Fercal asma anacında en kalın yapraklar tohumlardan elde edilen fidelere 10 bar 48 saat, çeliklerde ise en yüksek değer 10 bar 96 saat uygulamasında belirlenmiştir. Yapılan tüm uygulamalarda en kalın yapraklar Fercal asma anacı tohumlarından elde edilen fidelere 100 μM dozunun 96 saat uygulamasında belirlenmiştir. Genel olarak yapılan uygulamalar yaprak kalınlığını arttırmıştır (şekil 4.4).

Poliploit bitkilerin yaprakları diploit orijinallerine göre daha kalın (Rameshsing ve ark., 2015; Zhou ve ark., 2017), daha koyu yeşil (Chen ve ark., 2011; He ve ark., 2012), daha geniş (Ishfaq ve ark., 2012; Zhou ve ark., 2017), kenarları dişli ve yuvarlak (Tang ve ark., 2010), daha büyük (Dudits ve ark., 2016; Xu ve ark., 2016) ve anormal spata (gonca yaprağı) ve pedisel (Chen ve ark., 2011) olmak üzere değişen şekil ve yapıya sahiptirler.

Tetraploit bitkiler, diploitlerden daha geniş ve kalın yapraklara sahip olduğu bilinmektedir (Rao ve ark., 2019). nceki alışmalarda (Lu ve ark., 2014; Zeng ve ark., 2019) orizalin uygulamalarıyla elde edilen tetraploit bitkilerin yaprak kalınlığının diploit orijinlerine göre arttığı bildirilmiştir. Bae ve ark. (2020) ise tetraploit bitkilerin yapraklarının diploitlerine göre daha küçük, kalın ve buruşuk bir yapı gösterdiğini bildirmiştir. Çalışmamızda elde edilen yaprak kalınlıklarının bazı uygulamalarda kontrolden nispeten düşük olmasının nedeni şekil 4.4'te sunulan değerlerin poliploitlerle kromozom katlanması gerekleşmeyenlerin bir arada değerlendirilip uygulama ortalamaları halinde sunulmasından kaynaklanmakta fakat uyarılmış bitkilerimizin yaprak kalınlıkları önceki çalışmaları doğrular niteliktedir.

4.10.4. Stoma yoğunluğu (adet mm^{-2}) ve stoma boyutları (μm)

İki asma anacı tohum ve çeliklerine yapılan tüm uygulamalar kontrole göre stoma sayısında azalmaya, stoma boyutlarında ise artışa neden olmuştur. Tohum ve çeliklere yapılan orizalin uygulamalarında en düşük stoma yoğunluğu ve en yüksek stoma uzunlukları iki asma anacında da 100 μM 96 saat uygulamasında belirlenirken N_2O uygulamalarında 10 bar 96 saat uygulamasında tespit edilmiştir. Stoma genişliği verileri de stoma uzunluğu verileri ile benzerlik gösterirken yalnızca 41 B asma anacı çeliklerine orizalin uygulamalarında en geniş stomalar 100 μM 48 saat uygulamasında belirlenmiştir. Tohumlara yapılan mutajen uygulamaları çeliklere yapılan uygulamalara kıyasla stoma sayısını daha fazla azaltmıştır (şekil 4.5).

Poliploitlerin tanımlanmasında stoma boyutları dolaylı bir yöntem olarak bilinmektedir (Moghbel ve ark., 2015). Genel olarak stoma özellikleri, poliploitlerin hızlı ve erken tanımlanması için kullanılır (Cohen ve Yao, 1996; Gu ve ark., 2005; Tang ve ark., 2010). Ayrıca stoma özelliklerini tespit için kullanılan yöntem basit olup pahalı aletler gerektirmez. Xie ve ark. (2015), ploidi seviyesini belirlemede en ekonomik ve verimli yöntemlerin stoma boyutları ve kloroplast sayılarının tespiti olduğunu ancak (Huy ve ark., 2019) daha kesin sonuçlar elde edebilmek için bu yöntemin diğer modern yöntemlerle birlikte uygulanması gerektiğini bildirmişlerdir. Yaptığımız stoma ve kloroplast analizleri sonucunda farklı olduğunu düşündüğümüz bitkilerin FC analizini yaparak bitkilerin ploidi düzeyi tespit edilmiştir.

Kara ve ark. (2018c), 41B asma anacına N₂O uygulamalarının stoma yoğunluğunu %28 azalttığını tespit etmiştir. Bae ve ark. (2020) da benzer stoma yoğunluğundaki azalmayı orizalin uygulamalarında belirlemişlerdir. Önceki çalışmalarda orizalin ve N₂O uygulamalarıyla elde edilen sonuçlar bizim bulgularımızla da desteklenmiştir. Kara ve ark. (2021) tarafından Ekşi Kara ve Gök Üzüm çeşidine orizalin, N₂O ve bunların kombinasyonundan oluşan poliploidi çalışmalarında yapılan tüm uygulamalarda stoma yoğunluğu azalırken stoma uzunluğunda artış belirlenmiştir. Çalışmamızda mutajen uygulamalarının stoma sayısını azalttığı, bu sonuçların da literatürle benzerlik gösterdiği belirlenmiştir.

Kromozom katlamayı tanımlamak için stoma boyutu ölçümleri sıklıkla kullanılmaktadır (Stanys ve ark., 2006; Dhooghe ve ark., 2011). Yaptığımız çalışmada stoma yoğunluğundaki azalmaya karşın stoma boyutlarında artış tespit edilmiştir. En uzun stomalar her iki asma anacının çelik ve fidelerine 100 µM orizalin ve 10 bar N₂O dozunun 96 saat uygulamasında tespit edilmiştir. Uygulamaların stoma genişliğine etkileri incelendiğinde ise en geniş stomalar 41 B asma anacı çeliklerine orizalin uygulamaları dışında stoma uzunluğu verileri ile benzerdir. 41 B asma anacı çeliğine yapılan orizalin uygulamalarında ise en geniş stomaları 100 µM dozunun 48 saat uygulanmasından elde edilmiştir. Tohumdan elde edilen materyallere yapılan mutajen uygulamalarının çeliklere yapılan uygulamalara göre stoma uzunluğu ve genişliğini artırmıştır (Şekil 4.6 ve Şekil 4.7).

Benzer bir çalışmada Omezzine ve ark. (2012) miksploit bitkilerin stoma uzunluğunun diploitlerden önemli ölçüde fazla olduğunu bildirmişlerdir. Zeng ve ark. (2019) da orizalin uygulaması sonucunda oluşan poliploit bitkilerin orijinallerine göre stoma boyutlarında önemli bir artış bildirmiştir. Diploit, miksploit ve tetraploit

bitkilerin stoma genişliklerinin önemli düzeyde farklılaştıkları bilinmektedir (Cimen, 2020). Daha önceki çalışmalarda da orizalin uygulamalarının stoma genişliğini arttırdığı tespit edilmiştir (Pliankong ve ark., 2017; Bae ve ark., 2020).

Tetraploit bitkilerin en dikkate değer gelişmiş agronomik özelliklerinden biri stoma boyutundaki değişimdir (Kosonoy-González ve ark., 2019). Poliploit bitkilerin stoma boyutları diploit bitkilere göre daha büyük ve birim alana düşen stoma yoğunluğu daha düşüktür (Yang ve ark., 2006; Lu ve ark., 2014; Kara ve ark., 2018c; Bae ve ark., 2020). Bu farklılık muhtemelen poliploit bireylerdeki hücre boyutundaki artış (Marinho ve ark., 2014) ve/veya yaprak mezofil boşluğunun azalmasından kaynaklanmaktadır (Lundgren ve ark., 2019). Bu çalışmamızda elde edilen poliploit bitkilerin stoma özellikleri önceki çalışmalarla (Kara ve ark., 2018a; Zeng ve ark., 2019; Bae ve ark., 2020) benzerdir.

4.10.5. Kloroplast sayısı

Yaptığımız tüm uygulamalarda kloroplast sayıları kontrole göre artmıştır. Orizalin uygulamalarında en fazla kloroplast Fercal asma anacı tohumlarına 100 μ M 96 saat uygulamasında belirlenirken N_2O uygulamalarında en fazla kloroplast yine Fercal asma anacı tohumlarına 10 bar 96 saat uygulamasında tespit edilmiştir.

Çeliklere yapılan orizalin uygulamalarında en fazla kloroplast sayısı 41 B asma anacına 100 μ M 96 saat uygulamasında kaydedilirken N_2O uygulamalarında bu değer yine 41 B asma anacına 10 bar 96 saat uygulamasında saptanmıştır. Fercal asma anacı tohum ve çeliklerine N_2O uygulamasının kloroplast sayısına etkisi incelendiğinde tohumlara yapılan uygulamaların ortalama kloroplast sayısını daha fazla etkilediği gözlenirken 41 B asma anacında çeliklere yapılan uygulamaların ortalama kloroplast sayılarını arttırdığı saptanmıştır (Şekil 4.8).

Bitkilerde ploidi seviyesindeki artışla hücre boyutundaki artışla ilişkili olan yaprakların anatomik özelliklerindeki değişiklikler (Dwivedi ve ark., 1986), poliploidi teşvikini değerlendirmek ve izlemek için yaygın olarak kullanılır (Zhang ve ark., 2010). Bazı çalışmalarda ploidi seviyelerini stoma uzunluğu, genişliği, alanı ve yoğunluğuna göre değerlendirilmiştir (Dwivedi ve ark., 1986; de Carvalho ve ark., 2005; Yang ve ark., 2006). Birçok araştırmacı stoma bekçi hücre başına kloroplast sayısının ploidi seviyelerini belirlemede daha etkili olduğunu bildirmekle (Compton ve ark., 1996; Chakraborti ve ark., 1998; Zhang ve ark., 2005) birlikte, stoma bekçi hücreesindeki

kloroplast sayılarının diploit ve tetraploit bitkilerde benzer olduğunu tespit edilmiştir (de Carvalho ve ark., 2005). Bu farklılıklar muhtemelen çalışmalarında kullanılan farklı bitki türlerinden kaynaklanmaktadır (Zhang ve ark., 2010).

Kara ve ark. (2021), Ekşi Kara ve Gök Üzüm çeşitlerine orizalin, N₂O ve bunların kombinasyonu uygulamalarında kloroplast sayılarının arttırdığını tespit etmişlerdir.

Stoma bekçi hücrelerindeki kloroplast sayıları ploidi düzeyini belirlemede etkili bir yöntemdir (Zhang ve ark., 2005). Tetraploit bitkilerin kloroplast sayılarının diploitlerin iki katı olduğu bildirilmiştir (Rêgo ve ark., 2011; Rao ve ark., 2019). Ayrıca stoma bekçi hücrelerindeki kloroplast sayılarının ploidi ile ilişkili olduğu bilinmektedir (Zhang ve ark., 2010). Ayrıca Sinski ve ark. (2014), stoma bekçi hücresindeki kloroplast yoğunluğunun kromozom sayısı ile doğru orantılı olduğunu bildirmişlerdir. Tüm uygulamalarımız kloroplast sayılarını arttırmış olup sonuçlarımız önceki çalışmalarla da (Ewald ve ark., 2009; Rêgo ve ark., 2011; Rao ve ark., 2019) benzerlik göstermiştir.

4.10.6. Yaprak klorofil içeriği (SPAD)

Orizalin uygulamaları sonucunda en yüksek klorofil içeriği Fercal asma anacı çeliklerine 100 µM 96 saat orizalin uygulamasında belirlenirken N₂O uygulamalarında da yine Fercal asma anacı çeliklerine 10 bar 96 saat uygulamasında tespit edilmiştir. Uygulamaların klorofil içeriğine etkisi düzensizdir. Çalışmamız verilerinde oluşan bu düzensiz klorofil içeriği sonuçları (Şekil 4.9) uygulama yapılan tüm bitkilerin ortalamasını yansıtmaması ve bu bitkiler içindeki zayıf gelişen bitkilerden kaynaklanmakta veya klasik tek değişkenli ve çok değişkenli istatistikler, bitki ıslahı çalışmalarında veri analizi için kullanılan en yaygın yöntemler olmakla birlikte öğrenen makine tekniklerinin kullanılması, büyük miktarlarda karmaşık ve belirleyici olmayan bilgilerin işlenmesinde klasik istatistiksel modellerden daha etkilidir (Niazian ve Niedbała, 2020). Yaptığımız çalışmada yaprak klorofil içeriği verilerinin düzensiz olması klasik tek yönlü ve çok yönlü varyans analizinin kullanılmasından da kaynaklanabilmektedir. Ayrıca herbisitlerin klorofil moleküllerinin fotodinamik yıkımına neden olarak yeşil dokuların beyazlaşmasına (foto ağartma) neden olan mutajen uygulamaları klorofil moleküllerine zarar vermektedir (Boger ve Sandmann, 1998). Tetraploit bitkilerin diploidlere kıyasla daha yüksek klorofil içeriğine sahip olduğunun ve yüksek klorofil

içeriğinin yüksek fotosentetik kapasiteler oluşturabileceği bilinmektedir (Eng ve Ho, 2019).

Poliploidi çalışmalarında tetraploit bitkilerin klorofil içeriği diploitlere göre arttığı önceki çalışmalarda (Rao ve ark., 2019; Mo ve ark., 2020) bildirilmekle birlikte, Atichart ve Bunnag (2007) poliploit *Dendrobium secundum* (Bl.) Lindl'in yaprağındaki klorofil içeriği orijinal diploitlerinkinden önemli ölçüde daha az olduğunu belirlemişlerdir. Literatür bu yönüyle farklılıklar arz etmektedir.

Sabzehzari ve ark. (2019), kimyasal mutajen uygulamasıyla elde ettikleri tetraploit bitkilerin diploit orijinlerine kıyasla klorofil a içeriğinin 1.06, klorofil b içeriğinin 1.28, toplam klorofil içeriğinin ise 1.13 kat arttığını bildirmişlerdir. Fu ve ark. (2019a), tetraploit bitkilerin klorofil içeriğinin diploitlerden 1.76 kat fazla olduğunu belirlemişlerdir. Başka bir çalışmada ise tetraploit bitkilerin yapraklarındaki klorofil içeriği diploitlerin 1.40 kat daha fazla olduğunu belirlemişlerdir (Li ve ark., 2021). Uyarılmış bitkilerdeki klorofil içeriği verilerimiz artış bildiren literatürle benzerdir.

4.10.7. Flow sitometri ve nükleer DNA içeriği

FC analizi, ploidi seviyesini belirlemek ve poliploidi teşvik başarısını doğrulamak için hızlı, güvenilir ve basit bir yöntemdir ve kısa sürede çok sayıda hedef bitkinin analizini mümkün kılar (Roy ve ark., 2001). Yine, FC, teşvik edilen poliploidizasyonu değerlendirmede en önde gelen yöntemlerden biridir (Dhooghe ve ark., 2011). Bazı araştırmacılar poliploidi analizine yönelik tüm yöntemler arasında, ploidi seviyesindeki değişiklikleri tespit etmek için en etkili ve kesin yöntemin FC analizi olduğunu bildirmişlerdir (Dolezel, 1997; Loureiro ve ark., 2005; Sakhanokho ve ark., 2009).

FC analizi biyomedikal uygulamada biyolojik müdahaleler yapılan hücreleri gözlemlemek için Gucker Jr ve ark. (1947) tarafından geliştirilmiştir. 1973'te Heller, bitkilerde FC analizinin ilk uygulamasının yapıldığı bir makale yayınladı (Heller, 1973). FC analizi, günümüzde yerleşik protokolü ve daha uygun maliyeti nedeniyle yaygın olarak kullanılır ve poliploidi çalışmalarında vazgeçilmez hale gelmiştir (Eng ve Ho, 2019). FC analizi olmadan, tüm numunenin her çekirdeğinde yer alan genomun homojenliği tespit edilemez (Bohanec, 2003; Doležel ve ark., 2012). Bu nedenle, FC analizi miksploitleri poliploitlerden ayırt edebilmek için poliploidizasyon

çalışmalarında kullanılmaktadır (Chen ve ark., 2011; Carmona-Martin ve ark., 2015; Rameshsing ve ark., 2015; Tavan ve ark., 2015; Zhou ve ark., 2017).

FC analizinde, ploidi seviyesi, nispi veya mutlak DNA içeriği-DNA ploidi seviyesi ile olan korelasyonuyla anlaşılır. Bu nedenle, DNA içeriğindeki bir artışın kromozom sayısındaki artışlara karşılık geldiği varsayılırsa, bilinen bir ploidi düzeyine sahip bir örneğin DNA içeriği, bilinmeyen bir örneğin DNA ploidi düzeyini belirlemek için referans olarak kullanılabilir (Doležel ve ark., 2007).

Kloroplast sayımı sonucunda tüm uygulamalardan toplam 55 adet fidede poliplodi bulgularına rastlandı ve bu örneklerin ploidi seviyesini doğrulamak için FC analizi yapılmıştır. FC analizi sonucunda 5 adet miksoplit (100 µM 96 saat) ve 1 adet tetraploit (10 bar-96 saat) bitki tespit edilmiştir. Miksoplit bitkilerin 4 tanesi Fercal, 1 tanesi de 41B asma anacı fidesiydi. 1 adet Fercal fidesinin tetraploit olduğu doğrulanmıştır (Şekil 4.10).

FC, bitkilerin nükleer DNA içeriğini belirlemede kullanılan hızlı ve kesin bir yöntemdir (Galbraith ve ark., 1983). Ayrıca arazide, serada ve *in vitro* olarak yetiştirilen bitkilerde ploidi tayini için verimli bir şekilde kullanılabilir (Sliwinska ve Steen, 1995; Joachimiak ve ark., 2001; Thiem ve Śliwińska, 2003). Bu teknik, stoma ölçümleri gibi geleneksel yöntemlerden daha kesindir ve kromozom sayımından da hızlıdır (Sgorbati ve ark., 1986; Ollitrault-Sammarcelli ve ark., 1994; Tosca ve ark., 1995; O'Brien ve ark., 1996; Väinölä, 2000; Thao ve ark., 2003).

Ploidi düzeyi farklı olduğu FC analizleriyle de doğrulanan asma anacı fidelerinin nükleer DNA içerikleri diploit, miksoplit ve tetraploit bitkiler için sırasıyla 1.07, 1.43 ve 2.14 pg olarak belirlenmiştir (Şekil 4.10). Tetraploit bitkinin nükleer DNA içeriği diploidlere kıyasla iki kat olarak tespit edilirken miksoplit bitkilerde yaklaşık 1.34 katı olduğu tespit edilmiştir.

Viteceae familyasının nükleer DNA içeriği 0.62 ile 1.24 pg aralığında (Chu ve ark., 2018), dokuz farklı diploit *Vitis vinifera* çeşidinin 1.17 ile 1.26 aralığında (Leal ve ark., 2006), diploit Tekirdağ Misketi ve Michele Palieri çeşitlerinin sırasıyla 1.10 ve 1.20 (Ergönül ve ark., 2018), diploit 41B asma anacında ise 1.028 pg (Kara ve ark., 2018a) ve *vitis* cinslerinin ise 0.80 ve 1.20 aralığında olup ortalamasının 0.98 olduğu (Kewscience, 2022) bildirilmişti. Gordej ve ark. (2019), N₂O uygulaması sonucunda elde ettikleri tetraploit bitkilerin nükleer DNA içeriğinin diploidlere kıyasla 1.7 ila 1.82 kat arttığını bildirmişti. Benzer başka bir çalışmada Cimen (2020), 2.01 kat arttığını

tespit etmiştir. Çalışmamızın asmanın nükleer DNA içeriği sonuçları önceki çalışmaları desteklemektedir.

4.10.8. Kromozom sayısı

Yaptığımız çalışmada 55 adet örneğin poliploid özellik gösterdiği stoma ve kloroplast ölçümleriyle tahmin edilmiştir. Bu örneklerle FC analizi yapılmış ve 1 adet tetraploid (Fercal) ve 5 adet de miksploid genotip seçilmiştir. Elde ettiğimiz tetraploid Fercal asma anacı neslinin kromozomları sayılmış ve diploid Fercal asma anacı ile karşılaştırılmıştır. Tetraploid Fercal genotipinin kromozom sayısı $2n=4x=76$ olduğu diploid Fercal kontrol bitkisinin ise $2n=2x=38$ olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlara dayanarak stoma ve kloroplast ölçümlerinin poliploid bitki tespitinde kullanılabileceği fakat kesin sonuç vermediği belirlenirken FC analizlerinin poliploidi çalışmalarında ploidi düzeyi ön tespitlerinde sınırlı düzeyde de kullanılabileceği sonucuna varılmıştır. Ayrıca kromozom sayımı sonuçları literatürle (Chen ve ark., 2009; Noh ve ark., 2010; Chen ve ark., 2014; Sinski ve ark., 2014; Xie ve ark., 2015) de benzerlik göstermiştir.

FC gerçek triploidler ve yakın-triploidler (anöplitler) arasında ayırım yapamaz, ancak sadece göreceli DNA içeriklerine yakın olarak ploidi düzeylerine sınıflandırabilir (Okazaki ve ark., 2005; Dewitte ve ark., 2010). Poliploidi çalışmalarında ploidi düzeyini belirlemek için en somut yöntem kromozom sayımıdır (Doležel ve ark., 2007; Dhooghe ve ark., 2011). Bununla birlikte bu yöntem çok zahmetlidir, yalnızca sınırlı sayıda hücre analiz edilebilir (Bohanec, 2003; Dhooghe ve ark., 2011; Xie ve ark., 2015). Ayrıca birçok küçük kromozom sayılırken hata yapma olasılığı çok yüksektir (Dhooghe ve ark., 2011). Yine asma kromozomlarının son derece küçük olması nedeniyle oldukça az sayıda kromozom morfolojisine yönelik çalışma bulunmaktadır (Karataş ve Kunter, 2012).

Kromozom sayımı ve FC analizlerinin ploidi düzeyini belirlemede doğruluk oranlarının yüksek olduğu ve sonuçlar arasında anlamlı bir korelasyon bulunduğu da bilinmektedir (Allum ve ark., 2007; Zhang ve ark., 2010).

Daha önce yapılan araştırmalarda, kromozom sayıları (Doležel ve ark., 2007), FC analizi (Eeckhaut ve ark., 2005; Doležel ve ark., 2007) ve stoma parametrelerini değerlendirerek (Tal, 1980; Cohen ve Yao, 1996) bitkilerin ploidi seviyesini belirlerken Xie ve ark. (2015) kromozom sayımı ve FC analizlerinin her ikisinin de ploidi

seviyesini belirlemek için doğru yöntemler olduğu ve iki yöntemden elde edilen sonuçlar arasında önemli bir korelasyon olduğunu bildirmişlerdir.

Dokulara mutajenin etkisini arttırmak ve poliploidiyi teşvik etmek için bitkiler yüksek seviyelerde ve doğru zamanlarda antimitotik ajanlara maruz bırakılmalıdır (Allum ve ark., 2007).

Uzun süre boyunca kolhisin, agronomik ve çiçekçilik ürünlerinde köprü türleri üretmenin bir yolu olarak faydalı kabul edilmekteydi ancak kolhisinin bitki hücreleri için yüksek toksisitesi, bitki tübüline düşük bağlanma etkinliğinden dolayı poliploidizasyon için daha güçlü ajanlara ihtiyaç duyulmakta (Yemets ve Blume, 2008) ve bu maksatla yaptığımız *in vivo* orizalin ve N₂O uygulamalarının kolhisine kıyasla düşük toksiditesi ve bitki tübüline yüksek bağlanma özelliği göstermesi nedeniyle kromozom katlanma için kolhisine uygun alternatifler olabileceği ve yüksek poliploidizasyon potansiyellerinin bitki tübülün molekülü ile spesifik etkileşime dayandığı düşünülmektedir.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1 Sonuçlar

41 B ve Fercal asma anaçlarına *in vivo* orizalin ve N₂O uygulamalarının poliploit birey elde etmede başarıyla uygulanabileceği anlaşılmış fakat uygulama yapılan bitki materyali başarı oranını etkilemiştir. Yapılan uygulamaların canlı bitki oranına önemli etkisi olmuş ve canlılık oranları kontrole göre tüm uygulamalarda önemli düzeyde azalmıştır. Bu yönüyle önceki çalışmalara benzer sonuçlar elde edilmiştir. Poliploidiyi tanımlamada dolaylı bir yöntem olan stoma özellikleri kesin sonuç vermese de çok sayıda bitkiyle çalışırken ploidi seviyesini tahminde değişim olmadığı düşünülen bitkileri ön eleme fırsatı vermiştir.

Mutajen uygulamaları sonucunda elde edilen LD₅₀ değerleri öldürücü doza dayalı doğrusal regresyon yöntemiyle tespit edilmiştir. LD₅₀ değerleri hem doz hem de süreye bağlı değerleri hesaplanmıştır. Mutajen dozunun ve uygulama süresinin artışına zıt bir şekilde LD₅₀ değerlerinde azalmalar tespit edilmiştir. Dolayısıyla doz ve süre artışı canlılık oranını azaltmıştır. Bu yönüyle literatüre (Kerdsuwan ve Te-chato, 2012; Mahajan ve ark., 2015; Pal ve ark., 2017; Chen ve ark., 2020; Hasim ve ark., 2021) benzer sonuçlar elde edilmiştir.

Orizalin ve N₂O uygulamalarıyla uyardığımız poliploit bireylerin yaprak kalınlığı ve klorofil içeriklerinde diploidlere kıyasla önemli artışlar belirlenmiştir. Stoma boyutları diploit orijinallerine kıyasla önemli ölçüde artmasına ve stoma yoğunluklarında azalmalar tespit edilmiştir. Uyarılan bitkilerin kloroplast sayılarında da stoma boyutlarında olduğu gibi önemli artışlar kaydedilmiştir.

Yapılan uygulamaların kloroplast ve stoma özelliklerine etkileri incelenmiş ve bu incelemeler sonucunda farklı olduğu düşünülen 55 adet örnekte FC analizleriyle Fercal neslinden 1 adet tetraploit, 4 adet miksoiploit ve 41 B neslinden ise 1 adet miksoiploit fide seçilmiştir. Stoma özellikleri ve kloroplast sayılarının poliploidi belirleme yöntemlerinde kesin sonuç vermeyeceği, bu sonuçların FC analiziyle doğrulanması gerektiği görüşü (Väinölä, 2000; Thao ve ark., 2003; Chen ve ark., 2011; Carmona-Martin ve ark., 2015; Rameshsing ve ark., 2015; Tavan ve ark., 2015; Zhou ve ark., 2017; Yazar, 2018) desteklenmiştir. Bu poliploit bitkilerden tetraploit olanı Fercal asma anacı tohumlarına N₂O gazının 10 bar 96 saat uygulaması ile elde edilirken miksoiploit bitkiler 41 B ve Fercal asma anaçları tohumlarına orizalin uygulamaları

sonucunda belirlenmiştir. Miksoploit ve tetraploit bireylerin nükleer DNA içeriği diploit bitkilerle karşılaştırıldığında sırasıyla 1.34 ve 2.00 kat artmıştır. Çalışmamız N₂O gazının tetraploit asma anacı elde etmede ilk başarılı rapordur.

FC analizleriyle tetraploit olduğu tespit edilen 1 adet Fercal asma anacı neslinde poliploidinin doğrulanması amacıyla kök ucu örneklerinde kromozom sayılmış ve ebeveyn diploit Fercal asma anacı ile karşılaştırılmıştır. Kromozom sayımı sonucunda tetraploit Fercal asma genotipinin kromozom sayısı diploit orijinaline kıyasla 2 kat arttığı bu yöntemle doğrulanmıştır. Bu sonuçlar FC analizinin poliploidiyi doğrulamada önemli bir araç olduğunu kanıtlamıştır.

5.2 Öneriler

Bu çalışmada 41 B ve Fercal asma anaçlarında farklı dozlardaki orizalin ve N₂O uygulamaları poliploit genotipler elde etmede etkili bulunmuştur. Bundan sonra yapılacak asma genotiplerindeki poliploidi çalışmalarında tarafımızdan tespit edilen uygulama doz ve sürelerinin kullanılabileceği anlaşılmıştır. Çalışmamızda asma anacı çelikleriyle katlanarak çimlenmesi uyarılmış asma anacı tohumları kullanılmış olmakla birlikte sadece tohumdan gelişen fidelerde poliploit bireyler elde edilmiştir. Çeliklere yapılan mutajen uygulamalarında poliploit kararlılığı tespit edilememiştir. Bundan sonraki çalışmalarda tarafımızca tespit edilen mutajen protokollerinin uygulanması başarılı sonuçlar için tavsiye edilmektedir. Bununla birlikte asma genotiplerinde vejetatif materyalden poliploit bireyler elde etmek için büyük boyutlu çelikler yerine daha küçük vejetatif aşamalar olan nodal boğum parçaları, sürgün ve kök uçları veya somatik embriyogenesisle geliştirilen somatik embriyoların denenmesinin uygun olacağı düşünülmektedir.

Uygulamaların poliploidinin doğrulanması, poliploit bireylerin tespitinde ön veriler olarak kullanılan stoma özellikleri ve kloroplast sayımları kısmen başarılı bulunmuş ancak kesin doğrulama için FC analizi ve kromozom sayımlarının gerekliliği tespit edilmiştir. FC analizinin her araştırma biriminde bulunmaması veya örneklerin analize hazırlanması sürecinin gereksinimleri ve ayrıca kromozom sayımı sürecinin kompleks oluşu nedeniyle stoma gözlemleri ve kloroplast sayımlarıyla örnek sayısının azaltılması uygun olacaktır. Özellikle FC analizi miksoploit genotiplerin tespitinde vazgeçilmez olarak görülmektedir.

FC analizi sonucunda tetraploit olduğu belirlenen bitkilerin kök ucu kromozom sayımları yapılmış ve kromozom sayımı sonuçlarının FC analizlerini doğruladığı belirlenmiştir. Poliploidi çalışmalarında stoma gözlemlerinin yanı sıra FC analizleri ve kromozom sayımları kesin sonuç için vazgeçilmez görölmektedir. Kromozom sayımlarına örnek hazırlamak için poliploit olduğu FC analiziyle tespit edilen bitkilerin ikinci vejetatif generasyonlarını üretilerek analog kromozom sayımının yapılması işlem sürecini kısıltacaktır.



KAYNAKLAR

- Abbate, L., Panno, S., Mercati, F., Davino, S. ve Del Bosco, S. F., 2019, Citrus rootstock breeding: response of four allotetraploid somatic hybrids to *Citrus tristeza* virus induced infections, *EUR J PLANT PATHOL*, 153 (3), 837-847.
- Abbott, R. J., Ireland, H. E. ve Rogers, H. J., 2007, Population decline despite high genetic diversity in the new allopolyploid species *Senecio cambrensis* (*Asteraceae*), *MOL ECOL*, 16 (5), 1023-1033.
- Abdel Aziz, H., Abdrabboh, G., El-Boghdady, A. ve Ismail, A., 2018, Salinity stress responses in some grape rootstocks, *Ann. Agric. Sci. Moshtohor*, 56 (4th ICBA), 137-144.
- Acanda, Y., Prado, M. J., González, M. V. ve Rey, M., 2013, Somatic embryogenesis from stamen filaments in grapevine (*Vitis vinifera* L. cv. Mencía): changes in ploidy level and nuclear DNA content, *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 49 (3), 276-284.
- Acanda, Y., Martínez, Ó., González, M. V., Prado, M. J. ve Rey, M., 2015, Highly efficient *in vitro* tetraploid plant production via colchicine treatment using embryogenic suspension cultures in grapevine (*Vitis vinifera* cv. Mencía), *PCTOC*, 123 (3), 547-555.
- Ağaoğlu, Y., 2002, Asma Fizyolojisi, *Kavaklıdere Eğitim Yayınları* (5), 445.
- Ahloowalia, B. ve Garber, E., 1961, The genus *Collinsia*. XIII. Cytogenetic studies of interspecific hybrids involving species with pediceled flowers, *Bot. gaz.*, 122 (3), 219-228.
- Ahmadi, B., Ebrahimzadeh, H. ve Zarifi, E., 2021, Genome re-diploidization occurs spontaneously just prior to anthesis in artificially induced auto-tetraploid maize (*Zea mays* L.) inbred lines, *PCTOC*, 1-12.
- Akutsu, M., Kitamura, S., Toda, R., Miyajima, I. ve Okazaki, K., 2007, Production of 2n pollen of Asiatic hybrid lilies by nitrous oxide treatment, *Euphytica*, 155 (1), 143-152.
- Alexandrov, L. B., Nik-Zainal, S., Wedge, D. C., Aparicio, S. A., Behjati, S., Biankin, A. V., Bignell, G. R., Bolli, N., Borg, A. ve Børresen-Dale, A.-L., 2013, Signatures of mutational processes in human cancer, *Nature*, 500 (7463), 415-421.
- Alexandrov, L. B., Kim, J., Haradhvala, N. J., Huang, M. N., Tian Ng, A. W., Wu, Y., Boot, A., Covington, K. R., Gordenin, D. A. ve Bergstrom, E. N., 2018, The repertoire of mutational signatures in human cancer, *Nature*, 578 (7793), 94-101.
- Aleza, P., Juárez, J., Ollitrault, P. ve Navarro, L., 2009, Production of tetraploid plants of non apomictic *Citrus* genotypes, *Plant Cell Rep.*, 28 (12), 1837-1846.
- Allum, J., Bringloe, D. ve Roberts, A., 2007, Chromosome doubling in a *Rosa rugosa* Thunb. hybrid by exposure of *in vitro* nodes to oryzalin: the effects of node length, oryzalin concentration and exposure time, *Plant Cell Rep.*, 26 (11), 1977-1984.
- Alston, J. M. ve Sambucci, O., 2019, Grapes in the world economy, In: The grape genome, Eds: Springer, p. 1-24.
- Amos, L. A., 2000, Focusing-in on microtubules, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 10 (2), 236-241.
- Anssour, S., Krügel, T., Sharbel, T., Saluz, H., Bonaventure, G. ve Baldwin, I., 2009, Phenotypic, genetic and genomic consequences of natural and synthetic

- polyploidization of *Nicotiana attenuata* and *Nicotiana obtusifolia*, *Ann. Bot.*, 103 (8), 1207-1217.
- Anthony, R. G. ve Hussey, P. J., 1999, Dinitroaniline herbicide resistance and the microtubule cytoskeleton, *Trends Plant Sci.*, 4 (3), 112-116.
- Ascough, G. D., Van Staden, J. ve Erwin, J. E., 2008, Effectiveness of colchicine and oryzalin at inducing polyploidy in *Watsonia lepidota* NE Brown, *HortScience*, 43 (7), 2248-2251.
- Asoko, N., Ruamrungsri, S., Yoosumran, V. ve Saetiew, K., 2020, Improvement of *Dendranthemum grandiflora* cv. canter with colchicine *in vitro*, *IJAT*, 16 (2), 237-246.
- Atichart, P. ve Bunnag, S., 2007, Polyploid induction in *Dendrobium secundum* (Bl.) Lindl. by *in vitro* techniques, *Thai J. Agric. Sci.*, 40 (1-2), 91-95.
- Atwood, S., 1936, Tetraploid and aneuploid *Melilotus alba* resulting from heat treatment, *Am. J. Bot.*, 674-677.
- Bae, S.-J., Islam, M. M., Kim, H.-Y. ve Lim, K.-B., 2020, Induction of Tetraploidy in Watermelon with Oryzalin Treatments, *Hortic. Sci. Technol.*, 38 (3), 385-393.
- Baird, V., Blume, Y. B. ve Wick, S. M., 2000, Microtubular and cytoskeletal mutants, In: *Plant microtubules*, Eds: Springer, p. 159-191.
- Bajer, A. ve Mole-Bajer, J., 1986, Drugs with colchicine-like effects that specifically disassemble plant but not animal microtubules, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 466, 767-784.
- Barba-Gonzalez, R., Miller, C. T., Ramanna, M. S. ve Van Tuyl, J. M., 2006, Nitrous oxide (N₂O) induces 2 n gametes in sterile F1 hybrids between Oriental× Asiatic lily (*Lilium*) hybrids and leads to intergenomic recombination, *Euphytica*, 148 (3), 303-309.
- Bartish, I. V. ve Weeden, N. F., 1996, The use of interspecific crosses in *Malus* to map the genes of characters important for apple rootstock breeding, *Eucarpia Symposium on Fruit Breeding and Genetics 484*, 319-324.
- Bartlett, M., Sinclair, G., Fontanesi, G., Knipfer, T., Walker, M. ve McElrone, A., 2021, Root pressure–volume curve traits capture rootstock drought tolerance, *Ann. Bot.*, 1-14.
- Belling, J. ve Blakeslee, A. F., 1924a, The distribution of chromosomes in tetraploid *Daturas*, *Am. Nat.*, 58 (654), 60-70.
- Belling, J. ve Blakeslee, A. F., 1924b, The configurations and sizes of the chromosomes in the trivalents of 25-chromosome *Daturas*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 10 (3), 116-120.
- Benelli, C., De Carlo, A. ve Engelmann, F., 2013, Recent advances in the cryopreservation of shoot-derived germplasm of economically important fruit trees of *Actinidia*, *Diospyros*, *Malus*, *Olea*, *Prunus*, *Pyrus* and *Vitis*, *Biotechnol. Adv.*, 31 (2), 175-185.
- Bennett, M. D., 2004, Perspectives on polyploidy in plants—ancient and neo, *Biol. J. Linn. Soc.*, 82 (4), 411-423.
- Benson, E. E., 2008, Cryopreservation of phytodiversity: a critical appraisal of theory & practice, *Crit Rev Plant Sci*, 27 (3), 141-219.
- Berdahl, J. ve Barker, R., 1991, Characterization of autotetraploid Russian wildrye produced with nitrous oxide, *Crop Sci.*, 31 (5), 1153-1155.
- Berquist, B., McNeill, D. ve Wilson, D., 2008, Characterization of abasic endonuclease activity of human Ape1 on alternative substrates, as well as effects of ATP and sequence context on AP site incision, *J Mol Biol*, 379, 17–27.

- Bettoni, J. C., Kretzschmar, A. A., Bonnart, R., Shepherd, A. ve Volk, G. M., 2019, Cryopreservation of 12 *Vitis* species using apical shoot tips derived from plants grown *in vitro*, *HortScience*, 54 (6), 976-981.
- Bettoni, J. C., Marković, Z., Bi, W., Volk, G. M., Matsumoto, T. ve Wang, Q.-C., 2021, Grapevine shoot tip cryopreservation and cryotherapy: Secure storage of disease-free plants, *Plants*, 10 (10), 2190.
- Bhakat, K. K., Izumi, T., Yang, S.-H., Hazra, T. K. ve Mitra, S., 2003, Role of acetylated human AP-endonuclease (APE1/Ref-1) in regulation of the parathyroid hormone gene, *EMBO J.*, 22 (23), 6299-6309.
- Bhattacharyya, B., Panda, D., Gupta, S. ve Banerjee, M., 2008, Anti-mitotic activity of colchicine and the structural basis for its interaction with tubulin, *Med. Res. Rev.*, 28 (1), 155-183.
- Bianchi, D., Caramanico, L., Grossi, D., Brancadoro, L. ve Lorenzis, G. D., 2020, How do novel M-rootstock (*Vitis* spp.) genotypes cope with drought?, *Plants*, 9 (10), 1385.
- Bianchi, D. ve Brancadoro, L., 2021, Water use efficiency and nutritional status of a new grapevine rootstock selection, *Horticulturae*, 7 (11), 503.
- Blakeslee, A. ve Every, A., 1937, Methods of inducing doubling of chromosomes in plants: by treatment with colchicine, *J. Hered.*, 28 (12), 393-411.
- Blume, Y. B., Yemets, A., Nyporko, A. Y. ve Baird, W., 2003, Structural modelling of plant α -tubulin interaction with dinitroanilines and phosphoroamidates, *Cell Biol. Int.*, 27 (3), 171-174.
- Boger, P. ve Sandmann, G., 1998, Carotenoid biosynthesis inhibitor herbicides-mode of action and resistance mechanisms, *Pestic Outlook*, 9, 29-35.
- Bohanec, B., 2003, Ploidy determination using flow cytometry, In: Doubled haploid production in crop plants, Eds: Springer, p. 397-403.
- Bosco, D., Sinski, I., Maia, J., Ritschel, P. ve Quecini, V., 2017, Artificially induced autopolyploidy increases genome-wide methylation in grapevine, *Embrapa Uva e Vinho-Resumo em anais de congresso (ALICE)*, Águas de Lindóia.
- Boubals, D., 1966, Hérité de la résistance au phylloxéra radicicole chez la vigne, *Ann. Amélior. Plantes*, 16, 327-347.
- Bouvier, L., Fillon, F. ve Lespinasse, Y., 1994, Oryzalin as an efficient agent for chromosome doubling of haploid apple shoots *in vitro*, *Plant Breed.*, 113 (4), 343-346.
- Breslavetz, L., 1939, Polyploids in rye induced by X-rays. , *Dokl. Akad. Nauk*, 22, 354-357.
- Breviario, D. ve Nick, P., 2000, Plant tubulins: a melting pot for basic questions and promising applications, *Transgenic Res.*, 9 (6), 383-393.
- Brinkley, B. ve Rao, P. N., 1973, Nitrous oxide: effects on the mitotic apparatus and chromosome movement in HeLa cells, *J. Cell Biol.*, 58 (1), 96-106.
- Broxson, C., Hayner, J. N., Beckett, J., Bloom, L. B. ve Tornaletti, S., 2014, Human AP endonuclease inefficiently removes abasic sites within G4 structures compared to duplex DNA, *Nucleic Acids Res.*, 42 (12), 7708-7719.
- Brummer, E. C., Cazarro, P. M. ve Luth, D., 1999, Ploidy determination of alfalfa germplasm accessions using flow cytometry, *Crop Sci.*, 39 (4), 1202-1207.
- Bulgarelli, D., Schlaeppi, K., Spaepen, S., Van Themaat, E. V. L. ve Schulze-Lefert, P., 2013, Structure and functions of the bacterial microbiota of plants, *Annu. Rev. Plant Biol.*, 64, 807-838.

- Cabahug, R. A. M., Ha, M. K. T. T., Lim, K.-B. ve Hwang, Y.-J., 2020, LD 50 determination and phenotypic evaluation of three *Echeveria* varieties induced by chemical mutagens, *Toxicol. Environ. Health Sci.*, 1-9.
- Cadet, J., Douki, T. ve Ravanat, J.-L., 2006, One-electron oxidation of DNA and inflammation processes, *Nat. Chem. Biol.*, 2 (7), 348-349.
- Cadet, J., Davies, K. J., Medeiros, M. H., Di Mascio, P. ve Wagner, J. R., 2017, Formation and repair of oxidatively generated damage in cellular DNA, *Free Radic. Biol. Med.*, 107, 13-34.
- Calvez, L., Sivager, G., Andypain, S., Bruyère, S., Gros, O., Brat, P. ve Morillon, R., 2019, Evaluation of the adaptation of citrus polyploid (rootstocks/varieties Associations) to water deficit, *Caribbean Science and Innovation Meeting*, Fouillole, Pointe-à-Pitre, Guadeloupe, 22.
- Campbell, C., 2006, The botanist and the vintner: how wine was saved for the world, 3, Algonquin Books, p. 200-201.
- Campos, J., Davide, L., Salgado, C., Santos, F., Costa, P., Silva, P., Alves, C., Viccini, L. ve Pereira, A., 2009, In vitro induction of hexaploid plants from triploid hybrids of *Pennisetum purpureum* and *Pennisetum glaucum*, *Plant Breed.*, 128 (1), 101-104.
- Carimi, F., Panis, B., Pathirana, R. ve Carra, A., 2014, Strategies for conservation of endangered wild grapevine (*Vitis vinifera* L. subsp. *sylvestris* (CC Gmel.) Hegi), *XXIX International Horticultural Congress on Horticulture: Sustaining Lives, Livelihoods and Landscapes (IHC2014): IV 1115*, 81-86.
- Carmona-Martin, E., Regalado, J., Raghavan, L. ve Encina, C., 2015, In vitro induction of autooctoploid *asparagus* genotypes, *PCTOC*, 121 (1), 249-254.
- 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, *J Cell Sci*, 34, 247-278.
- Chakraborti, S., Vijayan, K., Roy, B. ve Qadri, S., 1998, In vitro induction of tetraploidy in mulberry (*Morus alba* L.), *Plant Cell Rep.*, 17 (10), 799-803.
- Chauvin, J., Label, A. ve Kermarrec, M., 2005, In vitro chromosome-doubling in tulip (*Tulipa gesneriana* L.), *J. Hortic. Sci. Biotechnol.*, 80 (6), 693-698.
- Chen, C., Hou, X., Zhang, H., Wang, G. ve Tian, L., 2011, Induction of *Anthurium andraeanum* "Arizona" tetraploid by colchicine in vitro, *Euphytica*, 181 (2), 137-145.
- Chen, J., Tang, X., Ma, X., Zhao, Q. ve Liang, F., 2009, Identification of the ploidy structure of bud sport of Red Globe grape cultivar, *Int. J. Fruit Sci.*, 26 (5), 619-622.
- Chen, J., Tang, X., Ma, X., Zhao, Q. ve Dong, Z., 2014, Generation of a new polyploid grape cultivar by using hybrid seeds induced with colchicine, *Acta Hortic.*, 1046, 251-258.
- Chen, T., Huang, L., Wang, M., Huang, Y., Zeng, R., Wang, X., Wang, L., Wan, S. ve Zhang, L., 2020, Ethyl Methyl Sulfonate-Induced Mutagenesis and Its Effects on Peanut Agronomic, Yield and Quality Traits, *Agronomy*, 10 (5), 655.
- Chen, Z. J., 2010, Molecular mechanisms of polyploidy and hybrid vigor, *Trends Plant Sci.*, 15 (2), 57-71.
- Cheng, Z.-M. ve Korban, S. S., 2011, In vitro ploidy manipulation in the genomics era, *PCTOC*, 104 (3), 281-282.
- Cho, W.-Y., Deepo, D. M., Islam, M. M., Nam, S.-C., Kim, H.-Y., Han, J.-S., Kim, C.-K., Chung, M.-Y. ve Lim, K.-B., 2021, Induction of polyploidy in *Cucumis melo*

- ‘chammel’ and evaluation of morphological and cytogenetic changes, *Hortic. Sci. Technol.*, 39 (5), 625-636.
- Chu, Z. F., Wen, J., Yang, Y. P., Nie, Z. L. ve Meng, Y., 2018, Genome size variation and evolution in the grape family *Vitaceae*, *J Syst Evol*, 56 (4), 273-282.
- Chung, M. Y., Kim, C. Y., Min, J. S., Lee, D.-J., Naing, A. H., Chung, J. D. ve Kim, C. K., 2014, *In vitro* induction of tetraploids in an interspecific hybrid of *Calanthe* (*Calanthe discolor* × *Calanthe sieboldii*) through colchicine and oryzalin treatments, *Plant Biotechnol. Rep.*, 8 (3), 251-257.
- Cimen, B., 2020, Induction of Polyploidy in C35 Citrange through in Vitro Colchicine Treatments of Seed-Derived Explants, *Int. J. Fruit Sci.*, 1-13.
- Cogoi, S., Ferino, A., Miglietta, G., Pedersen, E. B. ve Xodo, L. E., 2018, The regulatory G4 motif of the Kirsten ras (KRAS) gene is sensitive to guanine oxidation: implications on transcription, *Nucleic Acids Res.*, 46 (2), 661-676.
- Cohen, D. ve Yao, J.-L., 1996, In vitro chromosome doubling of nine *Zantedeschia* cultivars, *PCTOC*, 47 (1), 43-49.
- Colmenero-Flores, J. M., Arbona, V., Morillon, R. ve Gómez-Cadenas, A., 2020, Salinity and water deficit, In: *The Genus Citrus*, Eds: Elsevier, p. 291-309.
- Comai, L., 2005, The advantages and disadvantages of being polyploid, *Nat. Rev. Genet.*, 6 (11), 836-846.
- Compton, M. E., Gray, D. ve Elmstrom, G., 1996, Identification of tetraploid regenerants from cotyledons of diploid watermelon cultured *in vitro*, *Euphytica*, 87 (3), 165-172.
- Connor, F., Rayner, T. F., Aitken, S. J., Feig, C., Lukk, M., Santoyo-Lopez, J. ve Odom, D. T., 2018, Mutational landscape of a chemically-induced mouse model of liver cancer, *J. Hepatol.*, 69 (4), 840-850.
- Cousin, A., Heel, K., Cowling, W. ve Nelson, M., 2009, An efficient high-throughput flow cytometric method for estimating DNA ploidy level in plants, *Cytom.*, : j. *Int. Soc. Anal. Cytol.*, 75 (12), 1015-1019.
- Çoban, H., 1998, Yuvarlak çekirdeksiz üzüm çeşidinde farklı dozlarda uygulanan ⁶⁰Co kaynaklı gamma ışınlarının meydana getirdiği değişimler üzerinde araştırmalar, Doktora, *Ege Üniversitesi*, Fen Bilimleri Enstitüsü, 102.
- D’Amico, F., Candela, M., Turrone, S., Biagi, E., Brigidi, P., Bega, A., Vancini, D. ve Rampelli, S., 2018, The rootstock regulates microbiome diversity in root and rhizosphere compartments of *Vitis vinifera* cultivar Lambrusco, *Front. Microbiol.*, 9, 2240.
- Dalbó, M. A. ve Souza, A., 2018, Rootstock breeding for resistance to grapevine decline and dieback in southern Brazil, *XII International Conference on Grapevine Breeding and Genetics 1248*, 123-128.
- Dang, J., Liang, G., Li, C., Wu, D., Guo, Q., Liang, S. ve Wang, P., 2019, Polyploid rootstock of fruit tree: research status and prospects, *Acta Hortic. Sin.*, 46 (9), 1701-1710.
- Dar, T. H., Agrawal, R., Mir, B. A. ve Dar, G., 2013, Polyploidy: A Tool That Plants Use To Survive Climate Changes, *J. Exp. Biol.*, 1, 1.
- Davidis, U. ve Olmo, H., 1964, The *Vitis vinifera* × *V. rotundifolia* hybrids as phylloxera resistant rootstocks, *Vitis*, 4, 129-143.
- Dayan, F. E. ve Watson, S. B., 2011, Plant cell membrane as a marker for light-dependent and light-independent herbicide mechanisms of action, *Pestic Biochem Physiol*, 101 (3), 182-190.
- de Carvalho, J. F. R. P., de Carvalho, C. R. d. P. ve Otoni, W. C., 2005, *In vitro* induction of polyploidy in annatto (*Bixa orellana*), *PCTOC*, 80 (1), 69-75.

- De Nettancourt, D., Dijkhuis, P., Van Gastel, A. ve Broertjes, C., 1971, The combined use of leaf irradiation and of the adventitious bud technique for inducing and detecting polyploidy, marker mutations and self-compatibility in clonal populations of *Nicotiana glauca* Link and Otto, *Euphytica*, 20 (4), 508-520.
- de Oliveira, G. L., de Souza, A. P., de Oliveira, F. A., Zucchi, M. I., de Souza, L. M. ve Moura, M. F., 2020, Genetic structure and molecular diversity of Brazilian grapevine germplasm: Management and use in breeding programs, *PloS one*, 15 (10), e0240665.
- De Rosa, V., Vizzotto, G. ve Falchi, R., 2021, Cold hardiness dynamics and spring phenology: climate-driven changes and new molecular insights into grapevine adaptive potential, *Front. Plant Sci.*, 12.
- Deans, L. E., Palmer, I. E., Touchell, D. H. ve Ranney, T. G., 2021, *In Vitro* induction and characterization of polyploid *Hydrangea macrophylla* and *H. serrata*, *HortScience*, 56 (6), 709-715.
- Dewey, D. R., 1980, Some applications and misapplications of induced polyploidy to plant breeding, In: Polyploidy, Eds: Springer, p. 445-470.
- Dewitte, A., Eeckhaut, T., Van Huylenbroeck, J. ve Van Bockstaele, E., 2009, Occurrence of viable unreduced pollen in a Begonia collection, *Euphytica*, 168 (1), 81-94.
- Dewitte, A., Eeckhaut, T., Van Huylenbroeck, J. ve Van Bockstaele, E., 2010, Induction of 2n pollen formation in Begonia by trifluralin and N₂O treatments, *Euphytica*, 171 (2), 283-293.
- Dhooghe, E., Denis, S., Eeckhaut, T., Reheul, D. ve 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. ve Van Huylenbroeck, J., 2011, Mitotic chromosome doubling of plant tissues in vitro, *PCTOC*, 104 (3), 359-373.
- Di Mascio, P., Martinez, G. R., Miyamoto, S., Ronsein, G. E., Medeiros, M. H. ve Cadet, J., 2019, Singlet molecular oxygen reactions with nucleic acids, lipids, and proteins, *Chem. Rev.*, 119 (3), 2043-2086.
- Ding, Y., Fleming, A. M. ve Burrows, C. J., 2017, Sequencing the mouse genome for the oxidatively modified base 8-oxo-7, 8-dihydroguanine by OG-Seq, *J. Am. Chem. Soc.*, 139 (7), 2569-2572.
- Dolezel, J., 1997, Application of flow cytometry for the study of plant genomes, *J. Appl. Genet.*, 38 (3), 285-302.
- Doležel, J., Lucretti, S. ve Schubert, I., 1994, Plant chromosome analysis and sorting by flow cytometry, *Crit Rev Plant Sci*, 13 (3), 275-309.
- Doležel, J. ve Bartoš, J., 2005, Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size, *Ann. Bot.*, 95 (1), 99-110.
- Doležel, J., Greilhuber, J. ve Suda, J., 2007, Flow cytometry with plant cells: analysis of genes, chromosomes and genomes, In: Flow cytometry with plants: an overview, Eds, p. 41-65.
- Doležel, J., Vrána, J., Šafář, J., Bartoš, J., Kubaláková, M. ve Šimková, H., 2012, Chromosomes in the flow to simplify genome analysis, *Funct. Integr. Genomics*, 12 (3), 397-416.
- Dorsey, E., 1936, Induced polyploidy in wheat and Rye: Chromosome doubling in *Triticum*, *Secale* and *Triticum-Secale* hybrids produced by temperature changes, *J. Hered.*, 27 (4), 155-160.

- Doyle, J., Doyle, J., Rauscher, J. ve Brown, A., 2004, Evolution of the perennial soybean polyploid complex (*Glycine subgenus Glycine*): a study of contrasts., *Biol. J. Linn. Soc.*, 82 (4), 583-597.
- Dries, L., Bussotti, S., Pozzi, C., Kunz, R., Schnell, S., Löhnertz, O. ve Vortkamp, A., 2021, Rootstocks shape their microbiome-bacterial communities in the rhizosphere of different grapevine rootstocks, *Microorganisms*, 9 (4), 822.
- Dudits, D., Török, K., Cseri, A., Paul, K., Nagy, A. V., Nagy, B., Sass, L., Ferenc, G., Vankova, R. ve Dobrev, P., 2016, Response of organ structure and physiology to autotetraploidization in early development of energy willow *Salix viminalis*, *Plant Physiol.*, 170 (3), 1504-1523.
- Dunn, B. L. ve Lindstrom, J. T., 2007, Oryzalin-induced chromosome doubling in *Buddleja* to facilitate interspecific hybridization, *HortScience*, 42 (6), 1326-1328.
- Dvorak, J., Harvey, B. ve Coulman, B., 1973, The use of nitrous oxide for producing euployploids and aneuploids in wheat and barley, *Can J Genet Cytol*, 15 (1), 205-214.
- Dwivedi, N., Sikdar, A., Dandin, S., Sastry, C. ve Jolly, M., 1986, Induced tetraploidy in mulberry I: Morphological, anatomical and cytological investigations in cultivar RFS-135, *Cytologia*, 51 (2), 393-401.
- Edriss, M., Baghdady, G., Abdrabboh, G. ve Abdel Aziz, H., 2016, In vitro responses of some grape rootstocks to salt stress, *3rd International Conference on Biotechnology Applications in Agriculture (ICBAA)*, 1-10.
- Eeckhaut, T., 2003, Ploidy breeding and interspecific hybridization in *Spathiphyllum* and woody ornamentals, *Ghent University*, 123.
- Eeckhaut, T., Leus, L. ve Van Huylenbroeck, J., 2005, Exploitation of flow cytometry for plant breeding, *Acta Physiol. Plant*, 27 (4), 743-750.
- Eichhorn, K. ve Lorenz, D., 1977, Phenological development stages of the grape vine, *Nachr.bl. Dtsch. Pflanzenschutzd.*, 29 (8), 119-120.
- Eitle, M. W., Griesser, M., Vankova, R., Dobrev, P., Aberer, S. ve Forneck, A., 2019, Grape phylloxera (*D. vitifoliae*) manipulates SA/JA concentrations and signalling pathways in root galls of *Vitis* spp, *Plant Physiol. Biochem.*, 144, 85-91.
- Ekbiç, H. B., 2010, Trakya ilkeren ve flama seedless üzüm çeşitlerinde Co60 ve kolhisin kullanılarak mutasyon ve poliploidi oluşturma olanakları, Doktora, *Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü*, 152.
- Ellis, J. R., Taylor, R. ve Hussey, P. J., 1994, Molecular modeling indicates that two chemically distinct classes of anti-mitotic herbicide bind to the same receptor site (s), *Plant Physiol.*, 105 (1), 15-18.
- Eng, W.-H. ve Ho, W.-S., 2019, Polyploidization using colchicine in horticultural plants: a review, *Sci. Hortic.*, 246, 604-617.
- Ergönül, O., Özalp, Z. O., Uysal, T., Özer, C. ve Tuna, M., 2018, Effects of colchicine applications on viability and ploidy level in *in vitro* (solid medium) shoot tip culture of 'Michele Palieri' and 'Tekirdağ Misketi' grape cultivars, *XXX International Horticultural Congress IHC2018: International Symposium on Viticulture: Primary Production and Processing 1276*, 251-256.
- Ewald, D., Ulrich, K., Naujoks, G. ve 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*, *PCTOC*, 99 (3), 353-357.
- Ewing, R. M., Chu, P., Elisma, F., Li, H., Taylor, P., Climie, S., McBroom-Cerajewski, L., Robinson, M. D., O'Connor, L. ve Li, M., 2007, Large-scale mapping of

- human protein–protein interactions by mass spectrometry, *Mol. Syst. Biol.*, 3 (1), 1-17.
- Faostat, 2021, <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize>, 27.09.2121,
- Farkash, E. A., Kao, G. D., Horman, S. R. ve Prak, E. T. L., 2006, Gamma radiation increases endonuclease-dependent L1 retrotransposition in a cultured cell assay, *Nucleic Acids Res.*, 34 (4), 1196-1204.
- Fort, K. ve Walker, M. A., 2008, Breeding salinity tolerant grape rootstocks, *Proceedings of the 2nd Annual National Viticulture Research Conference*• 9-11 July, 23-24.
- Fu, L., Zhu, Y., Li, M., Wang, C. ve Sun, H., 2019a, Autopolyploid induction via somatic embryogenesis in *Lilium distichum* Nakai and *Lilium cernuum* Komar, *PCTOC*, 139 (2), 237-248.
- Fu, Q.-q., Tan, Y.-z., Zhai, H. ve Du, Y.-p., 2019b, Evaluation of salt resistance mechanisms of grapevine hybrid rootstocks, *Sci. Hortic.*, 243, 148-158.
- Galbraith, D. W., Harkins, K. R., Maddox, J. M., Ayres, N. M., Sharma, D. P. ve Firoozabady, E., 1983, Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues, *Science*, 220 (4601), 1049-1051.
- Galet, P., 1979, A practical ampelography, Cornell University Press., p.
- Galet, P., 1988, Cepages et vignobles de France. Tome 1 Les vignes Americaines, *Charles Déhan, Montpellier, France*.
- Galet, P., 1998, Grape varieties and rootstock varieties, *Chaintré, France*, Oenoplurimédia, p. 315.
- Gallone, A., Hunter, A. ve Douglas, G. C., 2014, Polyploid induction *in vitro* using colchicine and oryzalin on Hebe ‘Oratia Beauty’: Production and characterization of the vegetative traits, *Sci. Hortic.*, 179, 59-66.
- Gao-Takai, M., Katayama-Ikegami, A., Nakano, S., Matsuda, K. ve Motosugi, H., 2017, Vegetative growth and fruit quality of ‘Ruby Roman’ grapevines grafted on two species of rootstock and their tetraploids, *J. Hortic.*, 86 (2), 171-182.
- Gogonea, C. B., Gogonea, V., Ali, Y. M., Merz Jr, K. M. ve Siddiqui, S. S., 1999, Computational prediction of the three-dimensional structures for the *Caenorhabditis elegans* tubulin family, *J. Mol. Graph. Model.*, 17 (2), 90-100.
- Gonzalez-Perez, A., Sabarinathan, R. ve Lopez-Bigas, N., 2019, Local determinants of the mutational landscape of the human genome, *Cell*, 177, 101–114.
- Gordej, I., Lyusikov, O. ve Gordej, I., 2019, Zygotic Autopolyploidization of Rye (*Secale cereale* L.), *Cytol. Genet.*, 53 (5), 357-362.
- Granett, J., Walker, M. A., Kocsis, L. ve Omer, A. D., 2001, Biology and management of grape phylloxera, *Annu. Rev. Entomol.*, 46 (1), 387-412.
- Greplova, M., Polzerova, H. ve Domkářová, J., 2009, Intra-and inter-specific crosses of *Solanum* materials after mitotic polyploidization *in vitro*, *Plant Breed.*, 128 (6), 651-657.
- Gu, X., Yang, A., Meng, H. ve Zhang, J., 2005, *In vitro* induction of tetraploid plants from diploid *Zizyphus jujuba* Mill. cv. Zhanhua, *Plant Cell Rep.*, 24 (11), 671-676.
- Gucker Jr, F. T., O’Konski, C. T., Pickard, H. B. ve Pitts Jr, J. N., 1947, A photoelectronic counter for colloidal particles¹, *J. Am. Chem. Soc.*, 69 (10), 2422-2431.
- Guerra, D., Wittmann, M. T. S., Schwarz, S. F., Souza, P. V. D. d., Gonzatto, M. P. ve Weiler, R. L., 2014, Comparison between diploid and tetraploid citrus rootstocks: morphological characterization and growth evaluation, *Bragantia*, 73 (1), 1-7.

- Guerra, D., Schifino-Wittmann, M. T., Schwarz, S. F., Weiler, R. L., Dahmer, N. ve Souza, P. V. D. d., 2016, Tetraploidization in citrus rootstocks: effect of genetic constitution and environment in chromosome duplication, *Crop Breed. Appl. Biotechnol.*, 16, 35-41.
- Guo, M., D. D. ve JA, B., 1996, Dosage effects on gene expression in a maize ploidy series, *Genetics*, 142, 1349–1355.
- Hajdu, E., 2019, Grape rootstock breeding, *Kertgazdasag-Horticulture*, 51 (1), 32-45.
- Hamill, S., Smith, M. ve Dodd, W., 1992, *In vitro* induction of banana autotetraploids by colchicine treatment of micropropagated diploids, *Aust. J. Bot.*, 40 (6), 887-896.
- Hamilton, M. L., Guo, Z., Fuller, C. D., Van Remmen, H., Ward, W. F., Austad, S. N., Troyer, D. A., Thompson, I. ve Richardson, A., 2001, A reliable assessment of 8-oxo-2-deoxyguanosine levels in nuclear and mitochondrial DNA using the sodium iodide method to isolate DNA, *Nucleic Acids Res.*, 29 (10), 2117-2126.
- Hancock, J. F., 1997, The colchicine story, *HortScience*, 32 (6), 1011-1012.
- Hansen, F., Andersen, S., Due, I. ve Olesen, A., 1988, Nitrous oxide as a possible alternative agent for chromosome doubling of wheat haploids, *Plant Sci.*, 54 (3), 219-222.
- Hansen, N. ve Andersen, S., 1996, *In vitro* chromosome doubling potential of colchicine, oryzalin, trifluralin, and APM in *Brassica napus* microspore culture, *Euphytica*, 88 (2), 159-164.
- Hardie, W. ve Cirami, R., 1990, Grapevine rootstocks, in Viticulture, *Adelaide, South Australia*, Australian Industrial Publishers, p. 154–176.
- Hasim, A., Shamsiah, A. ve Hussein, S., 2021, Induced mutations using gamma ray and multiplication of plantlet through micro cross section culture of banana (*Musa acuminata* cv. Berangan), *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 1-10.
- Hassan, N. A., Gomaa, A. H., Shahin, M. A. ve El Homosany, A. A., 2013, *In vitro* storage and cryopreservation of some grape varieties, *JHSOP*, 5 (3), 183-193.
- He, L., Ding, Z., Jiang, F., Jin, B., Li, W., Ding, X., Sun, J. ve Lv, G., 2012, Induction and identification of hexadecaploid of *Pinellia ternate*, *Euphytica*, 186 (2), 479-488.
- Helleday, T., Eshtad, S. ve Nik-Zainal, S., 2014, Mechanisms underlying mutational signatures in human cancers, *Nat. Rev. Genet.*, 15 (9), 585-598.
- Heller, F. O., 1973, DNS-Bestimmung an Keimwurzeln von *Vicia faba* L. mit Hilfe der Impuls cytophotometrie¹, *Ber. Deutsch. Bot. Ges.*, 86 (5-9), 437-441.
- Hiesey, W. M., Nobs, M. A. ve Björkman, O., 1971, Experimental studies on the nature of species. 5. Biosystematics, genetics, and physiological ecology of the Erythranthe section of Mimulus, *Carnegie Institute of Washington Publ* 628, p. 213.
- Hirota, K., Matsui, M., Iwata, S., Nishiyama, A., Mori, K. ve Yodoi, J., 1997, AP-1 transcriptional activity is regulated by a direct association between thioredoxin and Ref-1, *Proc Natl Acad Sci USA*, 94 (3), 633–638.
- Hodgson, J., Sharafi, M., Jalili, A., Díaz, S., Montserrat-Martí, G., Palmer, C., Cerabolini, B., Pierce, S., Hamzehee, B. ve Asri, Y., 2010, Stomatal vs. genome size in angiosperms: the somatic tail wagging the genomic dog?, *Ann. Bot.*, 105 (4), 573-584.
- Huy, N. P., Luan, V. Q., Tung, H. T., Hien, V. T., Ngan, H. T. M., Duy, P. N. ve Nhut, D. T., 2019, *In vitro* polyploid induction of *Paphiopedilum villosum* using colchicine, *Sci. Hortic.*, 252, 283-290.

- Ishfaq, M., Nasir, I. A., Mahmood, N. ve Saleem, M., 2012, *In vitro* induction of mutation in tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) cv. Roma by using chemical mutagens, *Pak J Bot*, 44, 311-314.
- Jackson, R., 1982, Polyploidy and diploidy: new perspectives on chromosome pairing and its evolutionary implications, *Am. J. Bot.*, 69 (9), 1512-1523.
- Jain, S. M., 2010, Mutagenesis in crop improvement under the climate change, *Rom. Biotechnol. Lett.*, 15 (2), 88-106.
- Jiang, D., Malla, S., Fu, Y.-j., Choudhary, D. ve Rusling, J. F., 2017, Direct LC-MS/MS detection of guanine oxidations in exon 7 of the p53 tumor suppressor gene, *Anal. Chem.*, 89 (23), 12872-12879.
- Jin, S., Mushke, R., Zhu, H., Tu, L., Lin, Z., Zhang, Y. ve Zhang, X., 2008, Detection of somaclonal variation of cotton (*Gossypium hirsutum*) using cytogenetics, flow cytometry and molecular markers, *Plant Cell Rep.*, 27 (8), 1303-1316.
- Joachimciak, A., Kula, A., Sliwinska, E. ve Sobieszczanska, A., 2001, C-banding and nuclear DNA amount in six *Bromus* species, *Acta Biol. Crac. Ser. Bot.*, 43, 105-115.
- Kadota, M. ve Niimi, Y., 2002, *In vitro* induction of tetraploid plants from a diploid Japanese pear cultivar (*Pyrus pyrifolia* N. cv. Hosui), *Plant Cell Rep.*, 21 (3), 282-286.
- Kamenisch, Y., Fousteri, M., Knoch, J., von Thaler, A.-K., Fehrenbacher, B., Kato, H., Becker, T., Dollé, M. E., Kuiper, R. ve Majora, M., 2010, Proteins of nucleotide and base excision repair pathways interact in mitochondria to protect from loss of subcutaneous fat, a hallmark of aging, *J. Exp. Med.*, 207 (2), 379-390.
- Kang, X., Zhu, Z. ve Zhang, Z., 2000, Suitable period of high temperature treatment for 2n pollen of *Populus tomentosa* × *P. bolleana*, *J. Beijing For. Univ.*, 22 (3), 1-4.
- Kara, Z., 2017, Ampelografi, *Selçuk Üniversitesi, Konya, Ders Notu*, p. 269.
- Kara, Z., Doğan, O., Yazar, K. ve Sabır, A., 2018a, 41 B asma anacına *in vivo* kolhisin uygulamalarının morfolojik ve sitolojik etkileri, *Selcuk J Agr Food Sci*, 32 (1), 8-13.
- Kara, Z., Sabır, A., Yazar, K., Doğan, O. ve Şit, M. M., 2018b, Effects of colchicine treatments on some grape rootstock and grape varieties at cotyledon stage, *Selcuk J Agr Food Sci*, 32 (3), 424-429.
- Kara, Z., Yazar, K., Doğan, O., Sabir, A. ve Özer, A., 2018c, Induction of ploidy in some grapevine genotypes by N₂O treatments, *XXX International Horticultural Congress IHC2018: International Symposium on Viticulture: Primary Production and Processing 1276*, 239-246.
- Kara, Z., 2020, Genel Bağcılık, *Selçuk Ünivefrsitesi, Ziraat Fakültesi, Ders Notu*, p. 2016.
- Kara, Z., Erboğa, M. ve Doğan, O., 2021, The Effects of Nitrogen Protoxide and Orizalin on Promotion of Polyploidy in Grapes, *Selcuk J Agr Food Sci*, 35 (3), 244-248.
- Kara, Z. ve Yazar, K., 2021, Effects of shoot tip colchicine applications on some grape cultivars, *JAEEFS*, 5 (1), 78-84.
- Karataş, D. D. ve Kunter, B., 2012, Sultani Çekirdeksiz ve Kalecik Karası üzüm çeşitlerinde uyarılmış mutasyon etkilerinin sitolojik incelenmesi, *Bursa Uludağ Üniv. Ziraat Fak. Derg.*, 26 (2), 59-64.
- Kasymov, R. D., Grin, I. R., Endutkin, A. V., Smirnov, S. L., Ishchenko, A. A., Saparbaev, M. K. ve Zharkov, D. O., 2013, Excision of 8-oxoguanine from methylated CpG dinucleotides by human 8-oxoguanine DNA glycosylase, *FEBS Lett.*, 587 (18), 3129-3134.

- Kato, A. ve Geiger, H., 2002, Chromosome doubling of haploid maize seedlings using nitrous oxide gas at the flower primordial stage, *Plant Breed.*, 121 (5), 370-377.
- Kato, A. ve Birchler, J. A., 2006, Induction of tetraploid derivatives of maize inbred lines by nitrous oxide gas treatment, *J. Hered.*, 97 (1), 39-44.
- Kaya, E. ve Souza, F. V. D., 2017, Comparison of two PVS2-based procedures for cryopreservation of commercial sugarcane (*Saccharum* spp.) germplasm and confirmation of genetic stability after cryopreservation using ISSR markers, *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.*, 53 (4), 410-417.
- Kelman, W., Oram, R. ve Hayes, J., 1999, Characterization, establishment and persistence under grazing of nitrous oxide-induced octoploid *Phalaris aquatica* L., *Grass Forage Sci.*, 54 (1), 62-68.
- Kerdsuwan, N. ve Te-chato, S., 2012, Effects of colchicine on survival rate, morphological, physiological and cytological characters of chang daeng orchid (*Rhynchostylis gigantea* var. *rubrum* Sagarik) *in vitro*, *IJAT*, 8 (4), 1451-1460.
- Kermani, M., Sarasan, V., Roberts, A., Yokoya, K., Wentworth, J. ve Sieber, V., 2003, Oryzalin-induced chromosome doubling in *Rosa* and its effect on plant morphology and pollen viability, *Theor. Appl. Genet.*, 107 (7), 1195-1200.
- Kewscience, 2022, The Plant DNA C-values Database, <https://cvalues.science.kew.org/search/angiosperm>, [01.02.2022].
- Kihara, H. ve Tsunewaki, K., 1960, Production of polyploid wheat by nitrous oxide, *Proc. Jpn. Acad.*, 36 (10), 658-663.
- Kim, N. ve Jinks-Robertson, S., 2012, Transcription as a source of genome instability, *Nat. Rev. Genet.*, 13 (3), 204-214.
- Kitamura, S., Akutsu, M. ve Okazaki, K., 2009, Mechanism of action of nitrous oxide gas applied as a polyploidizing agent during meiosis in *lilies*, *Sex. Plant Reprod.*, 22 (1), 9-14.
- Kosonoy-González, R., Tapia-Campos, E. ve Barba-Gonzalez, R., 2019, The importance of mitotic spindle inhibitors in plant breeding, *IX International Symposium on New Ornamental Crops 1288*, 175-184.
- Kucab, J. E., Zou, X., Morganella, S., Joel, M., Nanda, A. S., Nagy, E., Gomez, C., Degasper, A., Harris, R. ve Jackson, S. P., 2019, A compendium of mutational signatures of environmental agents, *Cell*, 177 (4), 821-836. e816.
- Kuninger, D., Izumi, T., Papaconstantinou, J. ve Mitra, S., 2002, Human AP-endonuclease 1 and hnRNP-L interact with a nCaRE-like repressor element in the APendonuclease 1 promoter, *Nucleic Acids Res.*, 30, 823-829.
- Lam, H., Harbard, J. ve Koutoulis, A., 2014, Tetraploid induction of *Acacia crassicarpa* using colchicine and oryzalin, *J. Trop. For. Sci.*, 347-354.
- Lan, M., Chen, J.-H., Fei, C., Xu, Q.-W., Tong, Z.-K., Huang, H.-H., Dong, R.-H., Lou, X.-Z. ve Lin, E.-P., 2020, Induction and characterization of polyploids from seeds of *Rhododendron fortunei* Lindl, *J. Integr. Agric.*, 19 (8), 2016-2026.
- Leal, F., Loureiro, J., Rodriguez, E., Pais, M., Santos, C. ve Pinto-Carnide, O., 2006, Nuclear DNA content of *Vitis vinifera* cultivars and ploidy level analyses of somatic embryo-derived plants obtained from anther culture, *Plant Cell Rep.*, 25 (9), 978-985.
- Leitch, I. J. ve Bennett, M. D., 1997, Polyploidy in angiosperms, *Trends Plant Sci.*, 2 (12), 470-476.
- Leus, L., Van Laere, K., Dewitte, A. ve Van Huylenbroeck, J., 2009, Flow cytometry for plant breeding, *XXIII International Eucarpia Symposium, Section Ornamentals: Colourful Breeding and Genetics 836*, 221-226.
- Levin, D., 1983, Polyploidy and novelty in flowering plants, *Am Nat*, 122 (1), 1-25.

- Levin, D. A. ve Donald, A., 2002, The role of chromosomal change in plant evolution, Oxford University Press, USA, p.
- Lewis, W. H., 1980, Polyploidy in species populations, *Polyploidy*, 13, 103-144.
- Li, X., Zhang, Z., Ren, Y., Feng, Y., Guo, Q., Dong, L., Sun, Y. ve Li, Y., 2021, Induction and early identification of tetraploid black locust by hypocotyl *in vitro*, *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.*, 57 (3), 372-379.
- Li, Y., Tian, M. ve Zhang, P., 2017, Embryo sac chromosome doubling in *Populus alba* × *P. glandulosa* induced by high temperature exposure to produce triploids, *Breed. Sci.*, 67 (3), 1-6.
- Lindahl, T. ve Nyberg, B., 1972, Rate of depurination of native deoxyribonucleic acid, *Biochemistry*, 11 (19), 3610-3618.
- Lindahl, T., 1993, Instability and decay of the primary structure of DNA, *Nature*, 362 (6422), 709-715.
- Liu, N., Lee, C. H., Swigut, T., Grow, E., Gu, B., Bassik, M. C. ve Wysocka, J., 2018, Selective silencing of euchromatic L1s revealed by genome-wide screens for L1 regulators, *Nature*, 553 (7687), 228-232.
- Loeb, L., 1985, Apurinic sites as mutagenic intermediates, *Cell*, 40, 483-484.
- Loureiro, J., Pinto, G., Lopes, T., Doležel, J. ve 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. ve Kang, X., 2013, Induction of 2n female gametes in *Populus adenopoda* Maxim by high temperature exposure during female gametophyte development, *Breed. Sci.*, 63 (1), 96-103.
- Lu, M., Zhang, P., Wang, J., Kang, X., Wu, J., Wang, X. ve Chen, Y., 2014, Induction of tetraploidy using high temperature exposure during the first zygote division in *Populus adenopoda* Maxim, *Plant Growth Regul.*, 72 (3), 279-287.
- Lujan, S., Clausen, A., Clark, A., MacAlpine, H., MacAlpine, D. ve Malc, E., 2014, Heterogeneous polymerase fidelity and mismatch repair bias genome variation and composition, *Genome Res* (24), 1751-1764.
- Lundgren, M. R., Mathers, A., Baillie, A. L., Dunn, J., Wilson, M. J., Hunt, L., Pajor, R., Fradera-Soler, M., Rolfe, S. ve Osborne, C. P., 2019, Mesophyll porosity is modulated by the presence of functional stomata, *Nat. Commun.*, 10 (1), 1-10.
- Luo, J., Arens, P., Niu, L. ve Van Tuyl, J., 2016, Induction of viable 2n pollen in sterile Oriental × Trumpet *Lilium* hybrids, *J. Hortic. Sci. Biotechnol.*, 91 (3), 258-263.
- Mahajan, V., Devi, A., Khar, A. ve Lawande, K., 2015, Studies on mutagenesis in garlic using chemical mutagens to determine lethal dose (LD50) and create variability, *Indian J Hortic*, 72 (2), 289-292.
- Maki, H. ve Sekiguchi, M., 1992, MutT protein specifically hydrolyses a potent mutagenic substrate for DNA synthesis, *Nature*, 355 (6357), 273-275.
- Mandelkow, E. ve Mandelkow, E.-M., 1995, Microtubules and microtubule-associated proteins, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 7 (1), 72-81.
- Marasalı, B., Kunter, B., Değirmenci, D., Keskin, N., Taner, K. Y., Çelik, H., Tutluer, İ., Uslu, N., Sağel, Z. ve Peşkırcioğlu, H., 2003, Yerli Üzüm Çeşitlerinde Mutasyon İslahına Yönelik Olarak Etkili Mutasyon Dozunun Belirlenmesi ve M1V1 Generasyonunda Görülen İlk Etkiler., *Türkiye IV. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi*, Antalya, 467-469).
- Margolin, Y., Cloutier, J.-F., Shafirovich, V., Geacintov, N. E. ve Dedon, P. C., 2006, Paradoxical hotspots for guanine oxidation by a chemical mediator of inflammation, *Nat. Chem. Biol.*, 2 (7), 365-366.

- Margolin, Y., Shafirovich, V., Geacintov, N. E., DeMott, M. S. ve Dedon, P. C., 2008, DNA sequence context as a determinant of the quantity and chemistry of guanine oxidation produced by hydroxyl radicals and one-electron oxidants, *Int. J. Biol. Chem.*, 283 (51), 35569-35578.
- Marín, D., Armengol, J., Carbonell-Bejerano, P., Escalona, J., Gramaje, D., Hernández-Montes, E., Intrigliolo, D. S., Martínez-Zapater, J. M., Medrano, H. ve Mirás-Avalos, J. M., 2021, Challenges of viticulture adaptation to global change: Tackling the issue from the roots, *Aust. J. Grape Wine Res.*, 27 (1), 8-25.
- Marinho, R., Mendes-Rodrigues, C., Bonetti, A. ve Oliveira, P., 2014, Pollen and stomata morphometrics and polyploidy in *Eriotheca* (*Malvaceae-Bombacoideae*), *Plant Biol.*, 16 (2), 508-511.
- Markkanen, E., Dorn, J. ve Hübscher, U., 2013, MUTYH DNA glycosylase: the rationale for removing undamaged bases from the DNA, *Front. Genet.*, 4, 1-20.
- Markkanen, E., 2017, Not breathing is not an option: How to deal with oxidative DNA damage, *DNA repair*, 59, 82-105.
- Marković, Z., Chatelet, P., Sylvestre, I., Kontić, J. K. ve Engelmann, F., 2013, Cryopreservation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) in vitro shoot tips, *Cent. Eur. J. Biol.*, 8 (10), 993-1000.
- Martelotto, L. G., Ortiz, J. P. A., Stein, J., Espinoza, F., Quarin, C. L. ve Pessino, S. C., 2007, Genome rearrangements derived from autopolyploidization in *Paspalum* sp, *Plant Sci.*, 172 (5), 970-977.
- Martincorena, I. ve Campbell, P. J., 2015, Somatic mutation in cancer and normal cells, *Science*, 349 (6255), 1483-1489.
- Marum, L., Loureiro, J., Rodriguez, E., Santos, C., Oliveira, M. M. ve Miguel, C., 2009, Flow cytometric and morphological analyses of *Pinus pinaster* somatic embryogenesis, *J. Biotechnol.*, 143 (4), 288-295.
- Mathew, L., McLachlan, A., Jibrán, R., Burritt, D. J. ve Pathirana, R., 2018, Cold, antioxidant and osmotic pre-treatments maintain the structural integrity of meristematic cells and improve plant regeneration in cryopreserved kiwifruit shoot tips, *Protoplasma*, 255 (4), 1065-1077.
- Matusima, K., 1935, Chromosome doubling in the rice plants treated with high temperature, *Jap. Jour. Genet.*, 11 (235.237).
- Melaragno, J., B, M. ve AW, C., 1993, Relationship between endopolyploidy and cell size in epidermal tissue of *Arabidopsis*, *PCTOC*, 5, 1661-1668.
- Menezes-Sá, T. S. A., de Fátima Arrigoni-Blank, M., da Costa, A. S., de Almeida Santos-Serejo, J., Blank, A. F., Soares, C. A. ve Moura, G. M. S., 2019, Chromosome doubling in *Cattleya tigrina* A. Rich, *Sci. Plena*, 15 (11), 1-10.
- Meyer, E. M., Touchell, D. H. ve Ranney, T. G., 2009, *In vitro* shoot regeneration and polyploid induction from leaves of *Hypericum* species, *HortScience*, 44 (7), 1957-1961.
- Miguel, T. P. ve Leonhardt, K. W., 2011, *In vitro* polyploid induction of orchids using oryzalin, *Sci. Hortic.*, 130 (1), 314-319.
- Ming, S., Xiao-fan, L., Ying, K., Jin-fang, S. ve Qi-xiang, Z., 2012, Polyploidy induction of three *Lilium* species endemic to China (*Lilium pumilum*, *L. Sargentiae*, *L. Tsingtauense*), *Acta Hortic.*, 935, 82-83.
- Mitrofanova, I., Zilbervarg, I., Yemets, A., Mitrofanova, O. ve Blume, Y. B., 2003, The effect of dinitroaniline and phosphorothioamidate herbicides on polyploidisation *in vitro* of *Nepeta* plants, *Cell Biol. Int.*, 27 (3), 229-231.

- Mo, L., Chen, J., Lou, X., Xu, Q., Dong, R., Tong, Z., Huang, H. ve Lin, E., 2020, Colchicine-induced polyploidy in *Rhododendron fortunei* Lindl, *Plants*, 9 (4), 424.
- Moghbel, N., Borujeni, M. K. ve Bernard, F., 2015, Colchicine effect on the DNA content and stomata size of *Glycyrrhiza glabra* var. *glandulifera* and *Carthamus tinctorius* L. cultured *in vitro*, *J Genet Eng Biotechnol*, 13 (1), 1-6.
- Molenaar, W. S., Schipprack, W. ve Melchinger, A. E., 2018, Nitrous oxide-induced chromosome doubling of maize haploids, *Crop Sci.*, 58 (2), 650-659.
- Morales-Cruz, A., Aguirre-Liguori, J. A., Zhou, Y., Minio, A., Riaz, S., Walker, A. M., Cantu, D. ve Gaut, B. S., 2021, Introgression among North American wild grapes (*Vitis*) fuels biotic and abiotic adaptation, *Genome Biol.*, 22 (1), 1-27.
- Morano, L. ve Walker, M., 1995, Soils and plant communities associated with three *Vitis* species, *Am. Midl. Nat.*, 134 (2), 254-263.
- Morejohn, L. C. ve Fosket, D. E., 1991, The biochemistry of compounds with anti-microtubule activity in plant cells, *Pharmacol. Ther.*, 51 (2), 217-230.
- Mori, S., Yahata, M., Kuwahara, A., Shirono, Y., Ueno, Y., Hatanaka, M., Honda, Y., Sugiyama, K., Murata, N. ve Okamoto, Y., 2021, Morphological characterization of tetraploids of *Limonium sinuatum* (L.) Mill. produced by oryzalin treatment of seeds, *Horticulturae*, 7 (8), 248.
- Motosugi, H., 2002, Production of triploid grape [*Vitis*] rootstocks, *Exp. Farm Fac. Agr., Kyoto Pref. Üniv.*
- Motosugi, H., Naruo, T., Komazaki, S. ve Yamada, M., 2002a, Resistance of autotetraploids of grapevine rootstock cultivars to phylloxera (*Daktulosphaira vitifoliae* FITCH), *Vitis*, 41 (2), 103-106.
- Motosugi, H., Okudo, K., Kataoka, D. ve Naruo, T., 2002b, Comparison of growth characteristics between diploid and colchicine-induced tetraploid grape rootstocks, *J. Jpn. Soc. Hortic. Sci.*, 71 (3), 335-341.
- Motosugi, H., Yamamoto, Y., Naruo, T., Kitabayashi, H. ve Ishii, T., 2002c, Comparison of the growth and leaf mineral concentrations between three grapevine rootstocks and their corresponding tetraploids inoculated with an arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita*, *Vitis*, 41 (1), 21-25.
- Motosugi, H. ve Naruo, T., 2003, Production of triploid grape rootstocks by embryo culture and their growth characteristics, *J. Jpn. Soc. Hortic. Sci.*, 72 (2), 107-115.
- Motosugi, H. ve Yamamoto, Y., 2004, Water relation and net photosynthetic rates of leaves on 'Kyoho' grapevine grafted on tetraploid rootstocks, *Exp. Farm Fac. Agr., Kyoto Pref. Üniv.*, 24, 16-19.
- Motosugi, H., Yamamoto, Y., Naruo, T. ve Yamaguchi, D., 2007, Growth and fruit quality of 'Kyoho' grapevines grafted on autotetraploid rootstocks, *J. Jpn. Soc. Hortic. Sci.*, 76 (4), 271-278.
- Mouhaya, W., Allario, T., Brumos, J., Andres, F., Froelicher, Y., Luro, F., Talon, M., Ollitrault, P. ve Morillon, R., 2010, Sensitivity to high salinity in tetraploid citrus seedlings increases with water availability and correlates with expression of candidate genes, *Funct. Plant Biol.*, 37 (7), 674-685.
- Natale, F., Rapp, A., Yu, W., Maiser, A., Harz, H., Scholl, A., Grulich, S., Anton, T., Hörl, D. ve Chen, W., 2017, Identification of the elementary structural units of the DNA damage response, *Nat. Commun.*, 8 (1), 1-18.
- Navrátilová, B., Švécarová, M., Bednář, J. ve Ondřej, V., 2021, *In vitro* polyploidization of *Thymus vulgaris* L. and its effect on composition of essential oils, *Agronomy*, 11 (3), 596.

- Niazian, M. ve Niedbała, G., 2020, Machine learning for plant breeding and biotechnology, *Agriculture*, 10 (10), 436.
- Nogales, E., Wolf, S. G., Zhang, S. X. ve Downing, K. H., 1995, Preservation of 2-D crystals of tubulin for electron crystallography, *J. Struct. Biol.*, 115 (2), 199-208.
- Nogales, E., Wolf, S. G. ve Downing, K. H., 1998, Erratum: structure of the $\alpha\beta$ tubulin dimer by electron crystallography, *Nature*, 393 (6681), 191-191.
- Nogales, E., 1999, A structural view of microtubule dynamics, *Cell. Mol. Life Sci.*, 56 (1), 133-142.
- Nogales, E., 2001, Structural insights into microtubule function, *Annu. Rev. Biophys.*, 30 (1), 397-420.
- Noh, J.-H., Park, K.-S., Yun, H.-K., Do, G.-R., Hur, Y.-Y., Kim, S.-H., Lee, H.-C., Ryou, M.-S., Park, S.-J. ve Jung, S.-M., 2010, Determination of chimera types and ploidy level of sports from 'Campbell Early' grape (*Vitis labruscana*), *Hortic. Sci. Technol.*, 28 (6), 996-1002.
- Noren Hooten, N., Kompaniez, K., Barnes, J., Lohani, A. ve Evans, M., 2011, Poly(ADPribose) polymerase 1 (PARP-1) binds to 8-oxoguanine-DNA glycosylase (OGG1), *J Biol Chem*, 286, 44679–44690.
- Notsuka, K., Tsuru, T. ve Shiraishi, M., 2000, Induced polyploid grapes via *in vitro* chromosome doubling, *J. Jpn. Soc. Hortic. Sci.*, 69 (5), 543-551.
- Nukui, S., Kitamura, S., Hioki, T., Ootsuka, H., Miyoshi, K., Satou, T., Takatori, Y., Oomiya, T. ve Okazaki, K., 2011, N₂O induces mitotic polyploidization in anther somatic cells and restores fertility in sterile interspecific hybrid lilies, *Breed. Sci.*, 61 (4), 327-337.
- Nygren, A., 1955, Polyploids in *Melandrium* produced by nitrous oxide, *Hereditas*, 41, 287-290.
- Nyporko, A. Y. ve Blume, Y. B., 2001, Comparative analysis of secondary structure of tubulins and FtsZ proteins, *Biopolym. Cell*, 17, 61-69.
- O'Brien, I. E., Smith, D. R., Gardner, R. C. ve Murray, B. G., 1996, Flow cytometric determination of genome size in *Pinus*, *Plant Sci.*, 115 (1), 91-99.
- Ochatt, S., Patat-Ochatt, E. ve Moessner, A., 2011, Ploidy level determination within the context of *in vitro* breeding, *PCTOC*, 104 (3), 329-341.
- OIV, 2017, Distribution of the world's grapevine varieties, <http://www.oiv.int/public/medias/5888/en-distribution-of-the-worlds-grapevine-varieties.pdf>, [07.11.2021].
- Okazaki, K., Kurimoto, K., Miyajima, I., Enami, A., Mizuochi, H., Matsumoto, Y. ve Ohya, H., 2005, Induction of 2 n pollen in tulips by arresting the meiotic process with nitrous oxide gas, *Euphytica*, 143 (1), 101-114.
- Ollat, N., Peccoux, A., Papura, D., Esmenjaud, D., Marguerit, E., Tandonnet, J.-P., Bordenave, L., Cookson, S., Barrieu, F. ve Rossdeutsch, L., 2015, Rootstocks as a component of adaptation to environment, In: *Grapevine in a changing environment: a molecular and ecophysiological perspective*, Eds, p. 68-108.
- Ollitrault-Sammarcelli, F., Legave, J.-M., Michaux-Ferriere, N. ve Hirsch, A. M., 1994, Use of flow cytometry for rapid determination of ploidy level in the genus *Actinidia*, *Sci. Hortic.*, 57 (4), 303-313.
- Omezzine, F., Ladhari, A., Nefzi, F., Harrath, R., Aouni, M. ve Haouala, R., 2012, Induction and flow cytometry identification of mixoploidy through colchicine treatment of *Trigonella foenum-graecum* L, *Afr. J. Biotechnol.*, 11 (98), 16434-16442.

- Oustric, J., Herbette, S., Quilichini, Y., Morillon, R., Giannettini, J., Berti, L. ve Santini, J., 2021, Tetraploid Citrumelo 4475 rootstocks improve diploid common clementine tolerance to long-term nutrient deficiency, *Sci. Rep.*, 11 (1), 1-15.
- Östergren, G., 1954, Polyploids and aneuploids of *Crepis capillaris* produced by treatment with nitrous oxide, *Genetica*, 27 (1), 54-64.
- Östergren, G., 1957, Production of polyploids and aneuploids of *Phalaris* by means of nitrous oxide, *Hereditas*, 43 (3-4), 512-516.
- Özer, A., 2021, Bazı üzüm çeşitlerinde (*Vitis vinifera* L.) N₂O uygulamalarıyla ototetraploidi teşviki, Doktora, *Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü*, 127.
- Padgett-Johnson, M., Williams, L. ve Walker, M., 2003, Vine water relations, gas exchange, and vegetative growth of seventeen *Vitis* species grown under irrigated and nonirrigated conditions in California, *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, 128 (2), 269-276.
- Pal, R., Ramdhan, Z., Kaur, S., Duquette, P., Marcotte, R. ve Leduy, L., 2015, CUX2 protein functions as an accessory factor in the repair of oxidative DNA damage, *J Biol Chem*, 290, 22520–22531.
- Pal, S., Kumar, A., Chaturvedi, P., Srivastava, R. ve Tripathi, S., 2017, Determination of lethal dose for gamma rays induced mutagenesis in different cultivars of *dahlia*, *J. Hill Agric.*, 8 (3), 279-282.
- Parisod, C., Holderegger, R. ve Brochmann, C., 2010, Evolutionary consequences of autopolyploidy, *New Phytol.*, 186 (1), 5-17.
- Park, J. W., Han, Y. I., Kim, S. W., Kim, T. M., Yeom, S. C., Kang, J. ve Park, J., 2019, 8-OxoG in GC-rich Sp1 binding sites enhances gene transcription in adipose tissue of *juvenile mice*, *Sci. Rep.*, 9 (1), 1-12.
- Park, K., Yun, H., Rho, J. ve Kim, K., 2006, Major characteristics of grape cultivars bred by a grape breeding program in Korea, *IX International Conference on Grape Genetics and Breeding 827*, 511-514.
- Patel, G. ve Olmo, H., 1957, Interspecific Triploid Hybrid in Grape: (with 10 figures), *Caryologia*, 9 (2), 340-352.
- Pathirana, R., McLachlan, A., Hedderley, D., Panis, B. ve Carimi, F., 2016, Pre-treatment with salicylic acid improves plant regeneration after cryopreservation of grapevine (*Vitis* spp.) by droplet vitrification, *Acta Physiol. Plant*, 38 (1), 1-11.
- Pehlivan, E. C., 2020, Asmada (*Vitis vinifera* L.) kromozom katlama uygulamaları ile otopoliploidinin uyarılması ve organogenez, *Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü* 140.
- Peterson, J. C. D., Duncan, R., Hirschfeld, D., Ingels, C., McGourty, G., Smith, R., Weber, E., Wolpert, J., Anderson, M. ve Benz, J., 2019, Grape rootstock breeding and their performance based on the wolpert trials in California, In: *The Grape Genome*, Eds: Springer, p. 301-318.
- Peto, F., 1938, Hybridization of *triticum* and *agropyron*: v. doubling the chromosome number in *T. vulgare* and f 1 of *T. vulgare* × *A. glaucum* by temperature treatments, *Can. J. Res.*, 16 (12), 516-529.
- Pich, O., Muiños, F., Sabarinathan, R., Reyes-Salazar, I., Gonzalez-Perez, A. ve Lopez-Bigas, N., 2018, Somatic and germline mutation periodicity follow the orientation of the DNA minor groove around nucleosomes, *Cell*, 175 (4), 1074-1087. e1018.
- Pintos, B., Manzanera, J. A. ve Bueno, M. A., 2007, Antimitotic agents increase the production of doubled-haploid embryos from cork oak anther culture, *J. Plant Physiol.*, 164 (12), 1595-1604.

- Pliankong, P., Suksa-Ard, P. ve Wannakrairoj, S., 2017, Effects of colchicine and oryzalin on polyploidy induction and production of *Capsaicin* in *Capsicum frutescens* L. Pawnpirun, *Thai J. Agric. Sci.*, 50 (2), 108–120.
- Podwyszyńska, M., Gabryszewska, E., Sochacki, D. ve Jasiński, A., 2011, Histogenic identification by cytological analysis of colchicine-induced polyploids of *Hemerocallis*, *Acta Hortic.* (886), 245-249.
- Poetsch, A. R., Boulton, S. J. ve Luscombe, N. M., 2018, Genomic landscape of oxidative DNA damage and repair reveals regioselective protection from mutagenesis, *Genome Biol.*, 19 (1), 1-23.
- Poetsch, A. R., 2020, The genomics of oxidative DNA damage, repair, and resulting mutagenesis, *Comput. Struct. Biotechnol. J.*, 18, 207-219.
- Polak, P., Lawrence, M., Haugen, E., Stoletzki, N., Stojanov, P. ve Thurman, R., 2014, Reduced local mutation density in regulatory DNA of cancer genomes is linked to DNA repair, *Nat Biotechnol*, 32, 71–75.
- Pongrácz, D. P., 1983, Rootstocks for grape-vines, *David Philip Publisher (Pty), Cape Town, South Africa.*, p.
- Postman, J., Hummer, K., Stover, E., Krueger, R., Forsline, P., Grauke, L., Zee, F., Ayala-Silva, T. ve Irish, B., 2006, Fruit and nut genebanks in the US National Plant Germplasm System, *HortScience*, 41 (5), 1188-1194.
- Powell, K. S., 2008, Root feeders: an ecosystem perspective, CAB International, Wallingford, p.
- Prado, M. J., Rodriguez, E., Rey, L., González, M. V., Santos, C. ve Rey, M., 2010, Detection of somaclonal variants in somatic embryogenesis-regenerated plants of *Vitis vinifera* by flow cytometry and microsatellite markers, *PCTOC*, 103 (1), 49-59.
- Pratassentja, G., 1939, Production of polyploid plants, haploid and triploids in *Prunus persica*, *Camp. Rend. Acad. Sci.(Doklady) URSS*, 22, 348-351.
- Predieri, S. ve Di Virgilio, N., 2007, *In vitro* mutagenesis and mutant multiplication, In: Protocols for micropropagation of woody trees and fruits, Eds: Springer, p. 323-333.
- Provost, C., Campbell, A. ve Dumont, F., 2021, Rootstocks impact yield, fruit composition, nutrient deficiencies, and winter survival of hybrid cultivars in Eastern Canada, *Horticulturae*, 7 (8), 237.
- Qu, L., Zhang, Y., Xing, G., Cui, Y., Xue, L., Zhao, J., Zhang, W., Qu, L. ve Lei, J., 2019, Inducing 2n pollen to obtain polyploids in tulip, *XIII International Symposium on Flower Bulbs and Herbaceous Perennials* 1237, 93-100.
- Ramdzan, Z., Vadnais, C., Pal, R., Vandal, G., Cadieux, C. ve Leduy, L., 2014, RAS transformation requires CUX1-dependent repair of oxidative DNA damage, *PLoS Biol*, 12 (3), e1001807.
- Rameshsing, C. N., Hegde, S. N., Wallalwar, M. ve Vasundhara, M., 2015, Crop improvement in stevia (*Stevia rebaudiana* Beroni) through colchicine, *Res. Environ. Life Sci.*, 8 (2), 393-396.
- Ramsey, J. ve Schemske, D. W., 1998, Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants, *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.*, 29 (1), 467-501.
- Ramsey, J. ve Schemske, D. W., 2002, Neopolyploidy in flowering plants, *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.*, 33 (1), 589-639.
- Ramulu, K. S., Verhoeven, H. ve Dijkhuis, P., 1991, Mitotic blocking, micronucleation, and chromosome doubling by oryzalin, amiprofos-methyl, and colchicine in potato, *Protoplasma*, 160 (2-3), 65-71.

- Randolph, L., 1932, Some effects of high temperature on polyploidy and other variations in maize, *PNAS*, 18 (3), 222.
- Rao, S., Kang, X., Li, J. ve Chen, J., 2019, Induction, identification and characterization of tetraploidy in *Lycium ruthenicum*, *Breed. Sci.*, 69 (1), 1-9.
- Rêgo, M. d., Rêgo, E., Bruckner, C., Finger, F. ve Otoni, W., 2011, *In vitro* induction of autotetraploids from diploid yellow passion fruit mediated by colchicine and oryzalin, *PCTOC*, 107 (3), 451-459.
- Rehman, R.-U., 2017, Polyploidy: Recent trends and future perspectives, Springer, p. 103.
- Reijns, M., Kemp, H., Ding, J., de Procé, S., Jackson, A. ve Taylor, M., 2015, Laggingstrand replication shapes the mutational landscape of the genome, *Nature*, 518, 502-506.
- Reynolds, A. G., 2015, Grapevine breeding programs for the wine industry, Elsevier, p. 439.
- Rhee, D. B., Ghosh, A., Lu, J., Bohr, V. A. ve Liu, Y., 2011, Factors that influence telomeric oxidative base damage and repair by DNA glycosylase OGG1, *DNA repair*, 10 (1), 34-44.
- Riaz, S., Pap, D., Uretsky, J., Laucou, V., Boursiquot, J.-M., Kocsis, L. ve Walker, M. A., 2019, Genetic diversity and parentage analysis of grape rootstocks, *Theor. Appl. Genet.*, 132 (6), 1847-1860.
- Ridwan, W., 2020, Biodiversitas Journal of Biological Diversity, 9, p.
- Roberts, A. V., 2007, The use of bead beating to prepare suspensions of nuclei for flow cytometry from fresh leaves, herbarium leaves, petals and pollen, *Cytometry Part A*, 71 (12), 1039-1044.
- Rogalska, S., M. A. ve A. K., 2007, Mechanisms of genome changes and gene expression in plant hybrid polyploids, *Kosmos*, 56, 421-433.
- Rosenberg, E. ve Zilber-Rosenberg, I., 2016, Microbes drive evolution of animals and plants: the hologenome concept, *MBio*, 7 (2), e01395-01315.
- Roy, A., Leggett, G. ve Koutoulis, A., 2001, *In vitro* tetraploid induction and generation of tetraploids from mixoploids in hop (*Humulus lupulus* L.), *Plant Cell Rep.*, 20 (6), 489-495.
- Sabzehzari, M., Hoveidamanesh, S., Modarresi, M. ve Mohammadi, V., 2019, Morphological, anatomical, physiological, and cytological studies in diploid and tetraploid plants of *Plantago psyllium*, *PCTOC*, 139 (1), 131-137.
- Sakhanokho, H. F., Rajasekaran, K., Kelley, R. Y. ve Islam-Faridi, N., 2009, Induced polyploidy in diploid ornamental ginger (*Hedychium muluense* RM Smith) using colchicine and oryzalin, *HortScience*, 44 (7), 1809-1814.
- Salama, A. M., Zayan, M., Shereif, A. ve Gaser, A., 2020, Genetic diversity and relationships among grapevine rootstock mutants through RAPD technique, *J. Product. Dev.*, 25 (1), 79-99.
- Saleh, B., Allario, T., Dambier, D., Ollitrault, P. ve Morillon, R., 2008, Tetraploid citrus rootstocks are more tolerant to salt stress than diploid, *C. R. Biol.*, 331 (9), 703-710.
- Salmon, A., Ainouche, M. L. ve Wendel, J. F., 2005, Genetic and epigenetic consequences of recent hybridization and polyploidy in *Spartina* (*Poaceae*), *Mol. Ecol.*, 14 (4), 1163-1175.
- Särkilähti, E., 1988, Micropropagation of a mature colchicine-polyploid and irradiation-mutant of *Betula pendula* Roth, *Tree Physiol.*, 4 (2), 173-179.
- Sasani, T. A., Pedersen, B. S., Gao, Z., Baird, L., Przeworski, M., Jorde, L. B. ve Quinlan, A. R., 2019, Large, three-generation human families reveal post-

- zygotic mosaicism and variability in germline mutation accumulation, *Elife*, 8, e46922.
- Sato, T., Miyoshi, K. ve Okazaki, K., 2009, Induction of 2n gametes and 4n embryo in *Lilium* (*Lilium* × *formolongi* hort.) by nitrous oxide gas treatment, *XXIII International EUCARPIA Symposium, Section Ornamentals, Colourful Breeding and Genetics-Part II* 855, 243-248.
- Satou, K., Kawai, K., Kasai, H., Harashima, H. ve Kamiya, H., 2007, Mutagenic effects of 8-hydroxy-dGTP in live mammalian cells, *Free Radic. Biol. Med.*, 42 (10), 1552-1560.
- Sattler, M. C., Carvalho, C. R. ve Clarindo, W. R., 2016, The polyploidy and its key role in plant breeding, *Planta*, 243 (2), 281-296.
- Schuster-Böckler, B. ve Lehner, B., 2012, Chromatin organization is a major influence on regional mutation rates in human cancer cells, *Nature*, 488, 504–507.
- Senthilkumar, K., Grozema, F., Guerra, C. F., Bickelhaupt, F. ve Siebbeles, L., 2003, Mapping the sites for selective oxidation of guanines in DNA, *J. Am. Chem. Soc.*, 125 (45), 13658-13659.
- Sgorbati, S., Levi, M., Sparvoli, E., Trezzi, F. ve Lucchini, G., 1986, Cytometry and flow cytometry of 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)-stained suspensions of nuclei released from fresh and fixed tissues of plants, *Physiol. Plant.*, 68 (3), 471-476.
- Shibutani, S., Takeshita, M. ve Grollman, A. P., 1991, Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG, *Nature*, 349 (6308), 431-434.
- Shibutani, S., Takeshita, M. ve Grollman, A., 1997, Translesional synthesis on DNA templates containing a single abasic site. A mechanistic study of the “A rule”, *J Biol Chem*, 272, 13916–13922.
- Sinski, I., Dal Bosco, D., Pierozzi, N. I., Maia, J. D. G., Ritschel, P. S. ve Quecini, V., 2014, Improving *in vitro* induction of autopolyploidy in grapevine seedless cultivars, *Euphytica*, 196 (2), 299-311.
- Skelton, S., 2020, Viticulture: an introduction to commercial grape growing for those in the wine-trade, students taking the WSET Diploma and Master of Wine candidates, *London*, Lulu. com, p. 320.
- Sliwinska, E. ve Steen, P., 1995, Flow cytometric estimation of ploidy in anisoploid sugar-beet populations, *J. Appl. Genet.*, 36 (2), 111-118.
- Smith, J. P., 2004, Investigations into the mechanisms underlying grapevine rootstock effects on scion growth and yield, *Charles Sturt University*, Wagga Wagga, Australia.
- Soltis, D. ve Soltis, P., 1993, Molecular data facilitate a reevaluation of traditional tenets of polyploid evolution, *Crit Rev Plant Sci*, 12, 243-273.
- Soltis, D., Soltis, P. ve Rieseberg, L. H., 1993, Molecular data and the dynamic nature of polyploidy, *Crit Rev Plant Sci*, 12 (3), 243-273.
- Soltis, D. ve Soltis, P., 1999, Polyploidy: origins of species and genome evolution, *Trends Ecol. Evol*, 9, 348-352.
- Soltis, D. E., 1984, Autopolyploidy in *Tolmiea menziesii* (*Saxifragaceae*), *Am. J. Bot.*, 71 (9), 1171-1174.
- Soltis, D. E., Soltis, P. S., Pires, J. C., Kovarik, A., Tate, J. A. ve Mavrodiev, E., 2004, Recent and recurrent polyploidy in *Tragopogon* (*Asteraceae*): cytogenetic, genomic and genetic comparisons, *Biol. J. Linn. Soc.*, 82 (4), 485-501.
- Soltis, P. S. ve Soltis, D. E., 2000, The role of genetic and genomic attributes in the success of polyploids, *PNAS*, 97 (13), 7051-7057.

- Sondka, Z., Bamford, S., Cole, C. G., Ward, S. A., Dunham, I. ve Forbes, S. A., 2018, The COSMIC Cancer Gene Census: describing genetic dysfunction across all human cancers, *Nat. Rev. Cancer.*, 18 (11), 696-705.
- Souza, F. V. D., Kaya, E., de Jesus Vieira, L., de Souza, E. H., de Oliveira Amorim, V. B., Skogerboe, D., Matsumoto, T., Alves, A. A. C., da Silva Ledo, C. A. ve Jenderek, M. M., 2016, Droplet-vitrification and morphohistological studies of cryopreserved shoot tips of cultivated and wild pineapple genotypes, *PCTOC*, 124 (2), 351-360.
- Stanys, V., Weckman, A., Staniene, G. ve Duchovskis, P., 2006, *In vitro* induction of polyploidy in Japanese quince (*Chaenomeles japonica*), *PCTOC*, 84 (3), 263-268.
- Stebbins, G. L., 1950, Variation and evolution in plants, Columbia University Press, New York, p. 623.
- Stebbins Jr, G. L., 1947, Types of polyploids: their classification and significance, In: *Advances in genetics*, Eds, p. 403-429.
- Straathof, T. P. ve Eikelboom, W., 1997, Tulip breeding at PRI, *Daffodil and Tulip yearbook*, 8, 27-33.
- Strashnyuk, N. ve Blume, Y. B., 1993, Obtaining the mutants on microtubule protein genes, *Cytol. Genet*, 27 (6), 79-96.
- Subrahmanyam, N. ve Kasha, K., 1975, Chromosome doubling of barley haploids by nitrous oxide and colchicine treatments, *Can J Genet Cytol*, 17 (4), 573-583.
- Sun, Q., Sun, H., Li, L. ve Bell, R. L., 2009, *In vitro* colchicine-induced polyploid plantlet production and regeneration from leaf explants of the diploid pear (*Pyrus communis* L.) cultivar, 'Fertility', *J. Hortic. Sci. Biotechnol.*, 84 (5), 548-552.
- Supek, F. ve Lehner, B., 2019, Scales and mechanisms of somatic mutation rate variation across the human genome, *DNA repair*, 81, 1-9.
- Suzuki, T. ve Kamiya, H., 2017, Mutations induced by 8-hydroxyguanine (8-oxo-7,8-dihydroguanine), a representative oxidized base, in mammalian cells, *Genes Environ*, 39 (2), 1-6.
- Szarejko, I., 2012, Haploid mutagenesis, In: *Plant mutation breeding and biotechnology*, Eds, p. 387-410.
- Takamura, T., Lim, K. ve Van Tuyl, J., 2001, Effect of a new compound on the mitotic polyploidization of *Lilium longiflorum* and *Oriental hybrid lilies*, *XX International Eucarpia Symposium, Section Ornamentals, Strategies for New Ornamentals-Part II* 572, 37-42.
- Tal, M., 1980, Physiology of polyploids, In: *Polyploidy*, Eds: Springer, p. 61-75.
- Tang, Z.-Q., Chen, D.-L., Song, Z.-J., He, Y.-C. ve Cai, D.-T., 2010, *In vitro* induction and identification of tetraploid plants of *Paulownia tomentosa*, *PCTOC*, 102 (2), 213-220.
- Tate, J. A., Soltis, D. E. ve Soltis, P. S., 2005, Polyploidy in plants, In: *The evolution of the genome*, Eds: Elsevier, p. 371-426.
- Tavan, M., Mirjalili, M. H. ve Karimzadeh, G., 2015, *In vitro* polyploidy induction: changes in morphological, anatomical and phytochemical characteristics of *Thymus persicus* (*Lamiaceae*), *PCTOC*, 122 (3), 573-583.
- Taylor, N., Anderson, M., Quesenberry, K. ve Watson, L., 1976, Doubling the chromosome number of *Trifolium* species using nitrous oxide 1, *Crop Sci.*, 16 (4), 516-518.
- Tekleyohans, D. G. ve Groß-Hardt, R., 2020, New advances and future directions in plant polyspermy, *Mol. Reprod. Dev.*, 87 (3), 370-373.

- Teng, E. ve Leonhardt, K., 2007, *In vitro* and *in vivo* polyploidization of *Dracaena* with oryzalin, *VI International Symposium on New Floricultural Crops* 813, 509-516.
- Tepe, Ş., Ellialtıoğlu, Ş., Yenİce, N. ve Tipirdamaz, R., 2002, *In vitro* kolhisin uygulaması ile poliploid nane (*Mentha longifolia* L.) bitkilerinin elde edilmesi, *Mediterr. Agric. Sci.*, 15 (2), 63-69.
- Thao, N. T. P., Ureshino, K., Miyajima, I., Ozaki, Y. ve Okubo, H., 2003, Induction of tetraploids in ornamental *Alocasia* through colchicine and oryzalin treatments, *PCTOC*, 72 (1), 19-25.
- The Linde Group, 2011, Safety data sheet: Nitrous oxide, *Linde AG*, Munich, Bavaria.
- Thiem, B. ve Śliwińska, E., 2003, Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in cloudberry (*Rubus chamaemorus* L.) *in vitro* cultures, *Plant Sci.*, 164 (1), 129-134.
- Tomé, L. G. O., Silva, A. B. d., Pinto, C. A. B. P., Davide, L. C., Pereira, D. S. ve Carvalho, C. R. d., 2016, Colchicine and oryzalin effects on tetraploid induction and leaf anatomy of *Solanum commersonii* ssp, *Ciência Rural*, 46, 1973-1979.
- Tomkova, M. ve Schuster-Böckler, B., 2018, DNA modifications: naturally more error prone, *Trends Genet.*, 34, 627-638.
- Tomkova, M., Tomek, J., Kriaucionis, S. ve Schuster-Böckler, B., 2018, Mutational signature distribution varies with DNA replication timing and strand asymmetry, *Genome Biol.*, 19 (1), 1-12.
- Tosca, A., Pandolfi, R., Citterio, S. a., Fasoli, A. ve Sgorbati, S., 1995, Determination by flow cytometry of the chromosome doubling capacity of colchicine and oryzalin in gynogenetic haploids of *Gerbera*, *Plant Cell Rep.*, 14 (7), 455-458.
- Touchell, D. H., Palmer, I. E. ve Ranney, T. G., 2020, *In vitro* ploidy manipulation for crop improvement, *Front. Plant Sci.*, 11, 722.
- Töpfer, R., Hausmann, L., Harst, M., Maul, E., Zyprian, E. ve Eibach, R., 2011, New horizons for grapevine breeding, *MTFB*, 5, 79-100.
- Trenti, M., Emanuelli, F., Bianchedi, P., Lorenzi, S., Dalla Costa, L., Malnoy, M., Zamboni, A. ve Grando, M., 2018, Breeding strategies to develop new grape rootstock candidate, *62th Annual Congress SIGA: Plant development and crop productivity for sustainable agriculture*, 33.
- Tubbs, A. ve Nussenzweig, A., 2017, Endogenous DNA damage as a source of genomic instability in cancer, *Cell*, 168 (4), 644-656.
- Udall, J. A. ve Wendel, J. F., 2006, Polyploidy and crop improvement, *Crop Sci.*, 46, S-3-S-14.
- Uddling, J., Gelang-Alfredsson, J., Piikki, K. ve Pleijel, H., 2007, Evaluating the relationship between leaf chlorophyll concentration and SPAD-502 chlorophyll meter readings, *Photosynth. Res.*, 91 (1), 37-46.
- Uysal, T., Ertuğrul, K., Susanna, A. ve Garcia-Jacas, N., 2009, New chromosome counts in the genus *Centaurea* (Asteraceae) from Turkey, *Bot. J. Linn. Soc.*, 159 (2), 280-286.
- Väinölä, A., 2000, Polyploidization and early screening of *Rhododendron* hybrids, *Euphytica*, 112 (3), 239-244.
- Van Laere, K., Leus, L., Van Huylenbroeck, J. ve Van Bockstaele, E., 2009, Interspecific hybridisation and genome size analysis in *Buddleja*, *Euphytica*, 166 (3), 445-456.
- van Tuyl, J., Meijer, B. ve van Diën, M., 1992, The use of oryzalin as an alternative for colchicine in *in vitro* chromosome doubling of *Lilium* and *Nerine*, *In VI International Symposium on Flower Bulbs* 325, 625-630.

- Vascotto, C., Fantini, D., Romanello, M., Cesaratto, L., Deganuto, M. ve Leonardi, A., 2009, APE1/Ref-1 interacts with NPM1 within nucleoli and plays a role in the rRNA quality control process, *Mol Cell Biol*, 29, 1834–1854.
- Vaughn, K. C., Marks, M. D. ve Weeks, D. P., 1987, A dinitroaniline-resistant mutant of *Eleusine indica* exhibits cross-resistance and supersensitivity to antimicrotubule herbicides and drugs, *Plant Physiol.*, 83 (4), 956-964.
- Viehmánová, I., Cusimamani, E. F., Bechyne, M., Vyvadilová, M. ve Greplová, M., 2009, *In vitro* induction of polyploidy in yacon (*Smallanthus sonchifolius*), *PCTOC*, 97 (1), 21-25.
- Vink, S. N., Dini-Andreote, F., Höfle, R., Kicherer, A. ve Salles, J. F., 2021, Interactive effects of scion and rootstock genotypes on the root microbiome of grapevines (*Vitis* spp. L.), *Appl. Sci.*, 11 (4), 1615.
- VIVC, 2021, <https://www.vivc.de/index.php?r=passport-statistic%2Findex>, [18.10.2021].
- Walker, M., Lund, K., Agüero, C., Riaz, S., Fort, K., Heinitz, C. ve Romero, N., 2014, Breeding grape rootstocks for resistance to phylloxera and nematodes – It's not always easy, *VI International Phylloxera Symposium*, 89-97.
- Wang, J., Li, D.-L. ve Kang, X.-Y., 2012, Induction of unreduced megaspores with high temperature during megasporogenesis in *Populus*, *Ann. For. Sci.*, 69 (1), 59-67.
- Wang, M.-R., Chen, L., da Silva, J. A. T., Volk, G. M. ve Wang, Q.-C., 2018, Cryobiotechnology of apple (*Malus* spp.): development, progress and future prospects, *Plant Cell Rep.*, 37 (5), 689-709.
- Webber, J., 1940, Polyembryony, *Bot Rev*, 6, 575–598.
- Whiting, J., 2005, Grapevine rootstocks in Viticulture, *Australia*, Winetitles Pty Ltd, Ashford, p. 167–188.
- Wongprichachan, P., Huang, K., Chou, Y., Hsu, S., Liu, T. ve Okubo, H., 2013a, Induction of unreduced gamete in *Phalaenopsis* by N₂O treatments, *J. Fac. Agric. Kyushu Univ.*, 58 (1), 27-31.
- Wongprichachan, P., Huang, K. L., Hsu, S. T., Chou, Y. M., Liu, T. Y. ve Okubo, H., 2013b, Induction of polyploid *phalaenopsis amabilis* by N₂O treatment, *J. Fac. Agr., Kyushu Univ*, 58 (1), 33–36.
- Wu, J.-H. ve Mooney, P., 2002, Autotetraploid tangor plant regeneration from *in vitro* *Citrus* somatic embryogenic callus treated with colchicine, *PCTOC*, 70 (1), 99-104.
- Wu, J., McKeague, M. ve Sturla, S. J., 2018, Nucleotide-resolution genome-wide mapping of oxidative DNA damage by click-code-seq, *J. Am. Chem. Soc.*, 140 (31), 9783-9787.
- Wu, K., Siddiqui, S., Heinz, D. ve Ladd, S., 1978, Evaluation of mathematical methods for predicting optimum dose of gamma radiation in sugarcane (*Saccharum* sp.), *Environ. Exp. Bot.*, 18 (2), 95-98.
- Xia, L., Huang, W., Bellani, M., Seidman, M. M., Wu, K., Fan, D., Nie, Y., Cai, Y., Zhang, Y. W. ve Yu, L.-R., 2017, CHD4 has oncogenic functions in initiating and maintaining epigenetic suppression of multiple tumor suppressor genes, *Cancer cell*, 31 (5), 653-668. e657.
- Xie, X., Agüero, C. B., Wang, Y. ve Walker, M. A., 2015, *In vitro* induction of tetraploids in *Vitis* × *Muscadinia* hybrids, *PCTOC*, 122 (3), 675-683.
- Xu, C., Huang, Z., Liao, T., Li, Y. ve Kang, X., 2016, *In vitro* tetraploid plants regeneration from leaf explants of multiple genotypes in *Populus*, *PCTOC*, 125 (1), 1-9.

- Yamada, M. ve Sato, A., 2016, Advances in table grape breeding in Japan, *Breed. Sci.*, 66 (1), 34-45.
- Yamamori, T., DeRicco, J., Naqvi, A., Hoffman, T., Mattagajasingh, I. ve Kasuno, K., 2010, SIRT1 deacetylates APE1 and regulates cellular base excision repair, *Nucleic Acids Res* (38), 832-845.
- Yamamoto, E., Zeng, L. ve Baird, W. V., 1998, α -Tubulin missense mutations correlate with antimicrotubule drug resistance in *Eleusine indica*, *Plant Cell*, 10 (2), 297-308.
- Yang, X., Cao, Z., An, L., Wang, Y. ve Fang, X., 2006, *In vitro* tetraploid induction via colchicine treatment from diploid somatic embryos in grapevine (*Vitis vinifera* L.), *Euphytica*, 152 (2), 217-224.
- Yao, P.-Q., Li, G.-H., Long, Q.-Y., He, L.-G. ve Kang, X.-Y., 2017, Microsporogenesis and induction of unreduced pollen with high temperatures in rubber tree clone RRIM 600, *Forests*, 8 (5), 152.
- Yazar, K., 2018, Kolhisin uygulamalarının 'Trakya İlkeren', 'Ekşi Kara' ve 'Gök Üzüm' (*Vitis vinifera* L.) çeşitlerinde morfolojik ve sitolojik etkileri, Doktora, T.C. Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 80.
- Yemets, A. ve Blume, Y. B., 1999, Resistance to herbicides with antimicrotubular activity: from natural mutants to transgenic plants, *Russ. J. Plant Physiol.*, 46 (6), 789-796.
- Yemets, A. ve Blume, Y. B., 2008, Progress in plant polyploidization based on antimicrotubular drugs, *The Open Horticulture Journal*, 1 (1), 15-20.
- Yuan, S.-x., Liu, Y.-M., Fang, Z.-Y., Yang, L.-M., Zhuang, M., Zhang, Y.-Y. ve Sun, P.-T., 2009, Study on the relationship between the ploidy level of microspore-derived plants and the number of chloroplast in stomatal guard cells in *Brassica oleracea*, *Agric. Sci. China*, 8 (8), 939-946.
- Yue, Y., Zhu, Y., Fan, X., Hou, X., Zhao, C., Zhang, S. ve Wu, J., 2017, Generation of octoploid switchgrass in three cultivars by colchicine treatment, *Ind Crops Prod*, 107, 20-21.
- Yun, H. K. ve Park, K. S., 2007, Grape and grapevine rootstock breeding program in Korea, *Int. J. Plant Breed.*, 1 (1), 22-26.
- Zakizadeh, S., Kaviani, B. ve Hashemabadi, D., 2020, *In vivo*-induced polyploidy in *Dendrobium* 'Sonia' in a bubble bioreactor system using colchicine and oryzalin, *Rev. Bras. Bot.*, 43 (4), 921-932.
- Zeilinga, A. ve Schouten, H., 1968, Polyploidy in garden tulips. II. The production of tetraploids, *Euphytica*, 17 (2), 303-310.
- Zeng, Q., Liu, Z., Du, K. ve Kang, X., 2019, Oryzalin-induced chromosome doubling in triploid *Populus* and its effect on plant morphology and anatomy, *PCTOC*, 138 (3), 571-581.
- Zhang, L.-Y., Guo, Q.-G., Li, X.-L., Zeng, H., Tan, J.-M. ve Liang, G.-L., 2005, Study on the relationship between the number of chloroplast in stomata guard cell and the ploidy of loguat cultivars [J], *Int. J. Fruit Sci.*, 3 (009), 229-233.
- Zhang, Q., Luo, F., Liu, L. ve Guo, F., 2010, *In vitro* induction of tetraploids in crape myrtle (*Lagerstroemia indica* L.), *PCTOC*, 101 (1), 41-47.
- Zhang, X.-Z., Liu, G.-J., Yan, L.-Y., Zhao, Y.-B., Chang, R.-F. ve Wu, L.-P., 2002, Creating triploid germplasm via induced 2n pollen in *Capsicum annuum* L., *J. Hortic. Sci. Biotechnol.*, 78 (1), 84-88.
- Zhang, Z., Dai, H., Xiao, M. ve Liu, X., 2008, *In vitro* induction of tetraploids in *Phlox subulata* L., *Euphytica*, 159 (1), 59-65.

- Zhou-Tsang, A., Wu, Y., Henderson, S., Walker, A., Borneman, A., Walker, R. ve Gilliam, M., 2021, Grapevine salt tolerance, *Aust. J. Grape Wine Res.*, 27 (2), 149-168.
- Zhou, H.-w., Zeng, W.-d. ve Yan, H.-b., 2017, *In vitro* induction of tetraploids in cassava variety 'Xinxuan 048' using colchicine, *PCTOC*, 128 (3), 723-729.
- Zhou, J., Liu, M., Fleming, A. M., Burrows, C. J. ve Wallace, S. S., 2013, Neil3 and NEIL1 DNA glycosylases remove oxidative damages from quadruplex DNA and exhibit preferences for lesions in the telomeric sequence context, *Int. J. Biol. Chem.*, 288 (38), 27263-27272.
- Zlesak, D. C., Thill, C. A. ve Anderson, N. O., 2005, Trifluralin-mediated polyploidization of *Rosa chinensis* minima (Sims) Voss seedlings, *Euphytica*, 141 (3), 281-290.
- Zou, X., Owusu, M., Harris, R., Jackson, S. P., Loizou, J. I. ve Nik-Zainal, S., 2018, Validating the concept of mutational signatures with isogenic cell models, *Nat. Commun.*, 9 (1), 1-16.

