



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**PATATES (*Solanum tuberosum* L.) DOKU KÜLTÜRÜNDE
SOMATİK MUTASYONLARIN GAMA RADYASYONU
İLE TEŞVİKİ**

**Orkun YAYCILI
Biyoloji Anabilim Dalı
Radyobioloji Programı**

**Danışman
Yard.Doç.Dr. Sema ALİKAMANOĞLU**

Ekim, 2009

İSTANBUL



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**PATATES (*Solanum tuberosum* L.) DOKU KÜLTÜRÜNDE
SOMATİK MUTASYONLARIN GAMA RADYASYONU
İLE TEŞVİKİ**

**Orkun YAYCILI
Biyoloji Anabilim Dalı
Radyobioloji Programı**

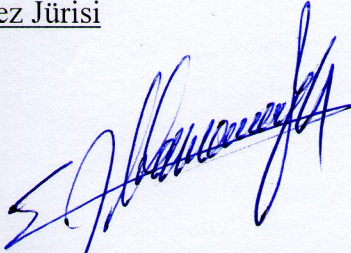
**Danışman
Yard.Doç.Dr. Sema ALİKAMANOĞLU**

Ekim, 2009

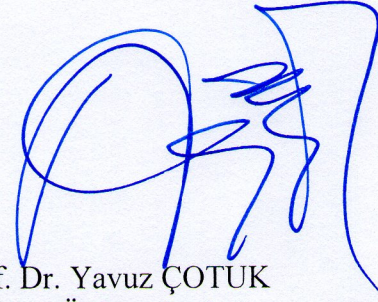
İSTANBUL

Bu çalışma 23/11/2009 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı Radyobiyoloji Programında Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

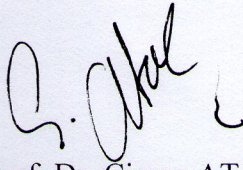
Tez Jürisi



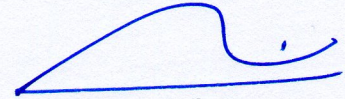
Yard. Doç. Dr. Sema ALİKAMANOĞLU (Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



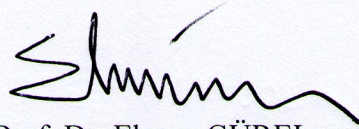
Prof. Dr. Yavuz ÇOTUK
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Prof. Dr. Çimen ATAK
Kültür Üniversitesi
Fen-Edebiyat Fakültesi



Prof. Dr. Tulay ENGİZEK
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Prof. Dr. Ekrem GÜREL
Abant İzzet Baysal Üniversitesi
Fen-Edebiyat Fakültesi

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin T-791/27122005 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Akademik çalışmalarımnda, bilgi ve deneyimiyle her zaman yanımda olduğunu hissettiren ve yapmış olduğum bu doktora tezinde bana yön vererek bilimsel düşüncemi genişleten çok değerli hocam, Sayın Yrd.Doç.Dr. Sema ALİKAMANOĞLU'na sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Lisansüstü eğitimim boyunca engin tecrübesi ve bilgisiyle beni sürekli destekleyen ve bana güç veren çok kıymetli hocam, Sayın Prof.Dr. Çimen ATAK'a en içten teşekkürlerimi sunuyorum.

Tez çalışmamı gerçekleştirmem için gerekli olanağı sağlayan, değerli hocam Sayın Genel Biyoloji Ana Bilim Dalı Başkanı Prof.Dr. Yavuz ÇOTUK'a teşekkürlerimi sunuyorum.

Moleküler çalışmalarım sırasında İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Laboratuvar olanaklarını kullanma iznini veren Sayın Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölüm Başkanı Prof.Dr. Güler TEMİZKAN'a teşekkür ediyorum.

Tez çalışmam sırasında bana sürekli destek olan ve yardımlarını esirgemeyen başta çalışma arkadaşlarımdan Arş.Gör. Ayşe ŞEN olmak üzere Alp AYAN'a ve tüm bölüm hocalarım ve arkadaşlarıma teşekkür ediyorum.

Ayrıca, verdikleri sevginin gücüyle bana enerji katan başta oğlum Sarp YAYCILI ve eşim Merih YILMAZ YAYCILI olmak üzere tüm aileme kalpten teşekkürlerimi sunuyorum.

Ekim, 2009

Orkun YAYCILI

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİL LİSTESİ.....	v
TABLO LİSTESİ.....	vii
ÖZET.....	ix
SUMMARY	x
1 GİRİŞ.....	1
2 GENEL KISIMLAR.....	5
2.1 PATATES (<i>Solanum tuberosum</i> L.).....	5
2.2 DOKU KÜLTÜRÜ.....	7
2.3 SOMATİK MUTASYON.....	9
2.4 TUZ STRESİ.....	12
2.5 RAPD-PCR YÖNTEMİ.....	15
3 MALZEME VE YÖNTEM.....	19
3.1 DENEY MATERYALİNİN ELDESİ.....	19
3.1.1 Patates Sürgünlerinin Eldesi ve Yüzey Sterilizasyonu.....	19
3.2 PATATES DOKU KÜLTÜRLERİNİN KURULMASI.....	19
3.2.1 Rejenerasyon Besiyerinin Hazırlanması.....	19
3.2.2 Nod Eksplantlarının Eldesi ve Kültür Ortamına Ekimi.....	21
3.3 <i>İN VİTRO</i> DOKU KÜLTÜRÜ ÇALIŞMALARI İÇİN OPTİMUM RADYASYON DOZUNUN BELİRLENMESİ	21
3.3.1 Doku Kültürlerinin Kurulması.....	21
3.3.2 Eksplantların Işınlanması ve M ₁ V ₁ Generasyonunun Oluşturulması.....	22
3.3.3 Işınlanmış Eksplantların Taze Besiyerine Aktarılması	22

3.3.4	Kültür Ortamında Rejenere Olan Bitkilerin Boy Uzunluklarının, Yaprak Sayılarının ve Kök Oluşum Yüzdelerinin Saptanması.....	22
3.3.5	Işınlanmış Bitkilerin Vejetatif Üretimi ile M_1V_2 ve M_1V_3 Generasyonlarının Oluşturulması.....	23
3.4	TUZ UYGULANMASI.....	23
3.4.1	Kullanılacak Tuz Konsantrasyonlarının Belirlenmesi.....	23
3.4.2	Selektif Besiyerinin Hazırlanması ve Kültürlerin Ekimi.....	23
3.5	MOLEKÜLER ANALİZLER.....	24
3.5.1	Deney Materyalin Eldesi.....	24
3.5.2	Genomik DNA İzolasyonu.....	24
3.5.3	Genomik DNA Analizi.....	25
3.5.3.1	<i>Spektral Analiz</i>	25
3.5.3.2	<i>Elektroforetik Analiz</i>	25
3.5.4	RAPD Analizinde Kullanılan Primerler ve Özellikleri.....	26
3.5.5	PCR Optimizasyonu ve Uygulanması.....	26
3.5.6	Agaroz Jel Elektroforezi ve Fotoğraflama.....	28
3.5.7	RAPD Polimorfizmin Belirlenmesi.....	29
3.6	İSTATİSTİKSEL ANALİZLER.....	29
4	BULGULAR	30
4.1	DOKU KÜLTÜRÜNDE REJENERASYON ÜZERİNE BESİYERİ İÇERİĞİNİN ETKİSİ.....	30
4.2	DOKU KÜLTÜRÜNDE GAMA RADYASYONUNUN ETKİSİ.....	31
4.3	İŞINLANMIŞ BİTKİLERİN VEJETATİF ÜRETİMİ.....	36
4.3.1	M_1V_2 Generasyonu.....	36
4.3.2	M_1V_3 Generasyonu.....	38
4.4	DOKU KÜLTÜRÜNE TUZ STRESİNİN ETKİSİ.....	40
4.4.1	Selektif Besiyerinde Somatik Mutantların Eldesi.....	42
4.4.2	Tuz Stresine Toleranslı Bitki Yüzdesinin Belirlenmesi.....	46
4.5	RAPD-PCR YÖNTEMİYLE GENETİK FARKLILIKLARIN BELİRLENMESİ.....	48
4.5.1	Genomik DNA İzolasyonu ve Analizi.....	49

4.5.1.1	<i>Spektral Analiz</i>	49
4.5.1.2	<i>Elektroforetik Analiz</i>	49
4.5.2	Genomik DNA Amplifikasyonu	50
4.5.3	Amplifiye Olmuş Ürünlerin Saptanması	50
4.5.4	Primerlere ait Amplifikasyon Sonuçlarının Değerlendirilmesi	54
4.5.5	Genetik Mesafenin Hesaplanması	58
5	TARTIŞMA VE SONUÇ	62
	KAYNAKLAR	77
	ÖZ GEÇMİŞ	89

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 3.1	: RAPD bant profillerini belirlemede kullanılan DNA markörü.....	28
Şekil 4.1	: Marfona patates (<i>Solanum tuberosum</i> L.) çeşidine ait kontrol ve ışınlanmış M_1V_1 generasyonu nod eksplantlarından kurulan 28 günlük kültürler.....	31
Şekil 4.2	: Kontrol ve ışınlanmış Marfona patates (<i>Solanum tuberosum</i> L.) çeşidine ait M_1V_1 generasyonu nod eksplantlarından kurulan kültürlerin 28. gününde, rejenerasyon yüzdesi, ortalama bitki boy uzunluğu yüzdesi, ortalama yaprak sayısı yüzdesi ve kök oluşum yüzdesine göre büyüme değerleri.....	35
Şekil 4.3	: Marfona patates (<i>Solanum tuberosum</i> L.) çeşidine ait M_1V_2 nod eksplantlarından kurulan 28 günlük kültürler.....	36
Şekil 4.4	: Marfona patates (<i>Solanum tuberosum</i> L.) çeşidine ait M_1V_3 nod eksplantlarından kurulan 28 günlük kültürler.....	39
Şekil 4.5	: Marfona patates çeşidine ait nod eksplantlarının 28. günde değişik konsantrasyonlarda tuz içeren selektif besiyerindeki görünümü	41
Şekil 4.6	: Kontrol ve 15 Gy gama radyasyon dozuna maruz bırakılmış Marfona patates (<i>Solanum tuberosum</i> L.) çeşidine ait M_1V_3 generasyonu nod eksplantlarının 28. Gün sonunda 50 mM tuz konsantrasyonuna sahip selektif besiyerindeki görünümü	44
Şekil 4.7	: Kontrol ve 20 Gy gama radyasyon dozuna maruz bırakılmış Marfona patates (<i>Solanum tuberosum</i> L.) çeşidine ait M_1V_3 generasyonu nod eksplantlarının 28. gün sonunda 50 mM tuz konsantrasyonuna sahip selektif besiyerindeki görünümü	44
Şekil 4.8	: Kontrol ve 30 Gy gama radyasyon dozuna maruz bırakılmış Marfona patates (<i>Solanum tuberosum</i> L.) çeşidine ait M_1V_3 generasyonu nod eksplantlarının 28. gün sonunda 50 mM tuz konsantrasyonuna sahip selektif besiyerindeki görünümü	45
Şekil 4.9	: Kontrol ve 20 Gy gama radyasyon dozuna maruz bırakılmış Marfona patates (<i>Solanum tuberosum</i> L.) çeşidine ait M_1V_3 generasyonu nod eksplantlarının 28. gün sonunda 100 mM tuz konsantrasyonuna sahip selektif besiyerindeki görünümü	45
Şekil 4.10	: Kontrol ve 15 Gy gama radyasyon dozuna maruz bırakılmış Marfona patates (<i>Solanum tuberosum</i> L.) çeşidine ait M_1V_3 generasyonu nod eksplantlarının 28. gün sonunda 125 mM tuz konsantrasyonuna sahip selektif besiyerindeki görünümü	46
Şekil 4.11	: Marfona patates (<i>Solanum tuberosum</i> L.) çeşidine ait kontrol ve tuza toleranslı mutant (1-19) bitkilerin UV translimülatörde görünümü.....	50
Şekil 4.12	: OPH-12 primerine ait amplifikasyonun agaroz jel elektroforezindeki görünümü.....	51
Şekil 4.13	: OPH-13 primerine ait amplifikasyonun agaroz jel elektroforezindeki görünümü.....	51
Şekil 4.14	: OPH-14 primerine ait amplifikasyonun agaroz jel elektroforezindeki görünümü.....	52

Şekil 4.15	: OPH-16 primerine ait amplifikasyonun agaroz jel elektroforezindeki görünümü.....	52
Şekil 4.16	: OPH-17 primerine ait amplifikasyonun agaroz jel elektroforezindeki görünümü.....	53
Şekil 4.17	: OPH-19 primerine ait amplifikasyonun agaroz jel elektroforezindeki görünümü.....	53
Şekil 4.18	: Marfona patates (<i>Solanum tuberosum</i> L.) çeşidine ait kontrol ve mutant bitkilerin, kullanılan primerlerin RAPD-PCR sonuçlarına göre dendrogramları.....	60

TABLO LİSTESİ

Tablo 3.1	: Doku kültürleri için hazırlanan MS besiyerinin içeriği.....	20
Tablo 3.2	: Patates doku kültüründe rejenerasyonu teşvik etmek için hazırlanan besiyerlerinde kullanılan büyüme hormonları ve şeker konsantrasyonları.....	21
Tablo 3.3	: Agaroz jel elektroforezinde kullanılan tamponlar.....	26
Tablo 3.4	: RAPD analizinde kullanılan primerler, baz dizilişleri ve GC (%) oranları	26
Tablo 3.5	: PCR Karışımı.....	27
Tablo 3.6	: PCR Döngü Koşulları.....	27
Tablo 4.1	: Marfona patates (<i>Solanum tuberosum</i> L.) çeşidine ait nod eksplantlarından farklı içerikli MS besiyerinde kurulan 28 günlük kültürlerdeki eksplant sayısı, rejenerasyon oranı ve yüzdesi.....	30
Tablo 4.2	: Marfona patates (<i>Solanum tuberosum</i> L.) çeşidine ait M ₁ V ₁ generasyonu nod eksplantlarından kurulan 28 günlük kültürlerdeki eksplant sayısı, rejenerasyon yüzdesi, ortalama bitki boyu, ortalama yaprak sayısı ve kök oluşum yüzdesi.....	32
Tablo 4.3	: Marfona patates (<i>Solanum tuberosum</i> L.) çeşidine ait M ₁ V ₂ generasyonu nod eksplantlarından kurulan 28 günlük kültürlerdeki eksplant sayısı, rejenerasyon yüzdesi, ortalama bitki boyu, ortalama yaprak sayısı ve kök oluşum yüzdesi.....	37
Tablo 4.4	: Marfona patates (<i>Solanum tuberosum</i> L.) çeşidine ait M ₁ V ₃ generasyonu nod eksplantlarından kurulan 28 günlük kültürlerdeki eksplant sayısı, rejenerasyon yüzdesi, ortalama bitki boyu, ortalama yaprak sayısı ve kök oluşum yüzdesi.....	39
Tablo 4.5	: Marfona patates çeşidine ait nod eksplantlarının 28. günde farklı konsantrasyonlarda tuz içeren selektif besiyerindeki rejenerasyon yüzdeleri.....	41
Tablo 4.6	: Marfona patates (<i>Solanum tuberosum</i> L.) çeşidine ait M ₁ V ₃ generasyonu nod eksplantlarının 28. gün sonunda 50,100 ve 125 mM tuz konsantrasyonuna sahip selektif besiyerindeki rejenerasyon yüzdesi ve kök oluşum yüzdesi.....	42
Tablo 4.7	: Selektif besiyerine ekilen M ₁ V ₃ generasyonundaki Marfona patates çeşidine ait kontrol ve ışınlanmış eksplantların sayısının deney gruplarına göre dağılımı ve elde edilen tuza toleranslı bitki yüzdesi... ..	47
Tablo 4.8	: Marfona patates (<i>Solanum tuberosum</i> L.) çeşidine ait seçilen 19 tuza toleranslı mutant bitki ve bu bitkilere uygulanan gama radyasyon dozları ile tuz (NaCl) konsantrasyonları.....	48
Tablo 4.9	: Çalışmamızda kullanılan OPH-12, OPH-13 ve OPH-14 primerlerine ait amplifikasyon sonuçları.....	55
Tablo 4.10	: Çalışmamızda kullanılan OPH-16, OPH-17 ve OPH-19 primerlerine ait amplifikasyon sonuçları.....	56
Tablo 4.11	: RAPD sonucu oluşan bantlar ve polimorfizm oranları.....	57

Tablo 4.12 : Çalışmamızda kullanılan primerlere göre Marfona patates (<i>Solanum tuberosum</i> L.) çeşidine ait kontrol ve mutant bitkilerin birbirlerine olan genetik uzaklıkları.....	59
---	----

ÖZET

PATATES (*Solanum tuberosum* L.) DOKU KÜLTÜRÜNDE SOMATİK MUTASYONLARIN GAMA RADYASYONU İLE TEŞVİKİ

Dünya nüfusunun hızla artmasına karşın, ekilebilir tarım alanlarının gün geçtikçe azalması, bitki ıslahçılarına abiyotik stres faktörlerine ve hastalıklara toleranslı yada dayanıklı yeni varyetelerin eldesine veya mevcut varyetelerin ıslah edilmesi çalışmalarına yönlendirmektedir.

Tuz stresi, yüksek ekonomik ve besinsel değere sahip tarımsal ürünlerin verimliliğini olumsuz yönde etkileyen önemli bir faktördür. Günümüzde *in vitro* teknikler ile mutagenlerin kombinasyonu kullanılarak tuz stresine dayanıklı veya toleranslı bitki türlerinin elde edilmesi mümkün olmaktadır.

Bu çalışmada dünyanın en önemli tarımsal ürünlerinden biri olan patates (*Solanum tuberosum* L. cv. Marfona) bitkisinin *in vitro* doku kültürü kurulmuş ve farklı dozlarda gama radyasyonu uygulanarak patates doku kültüründe somatik mutasyonlar teşvik edilmiştir.

Gama radyasyonu ile teşvik edilen somatik mutasyonların saptanması amacıyla Marfona patates çeşidine ait M₁V₃ generasyonu nod eksplantları, farklı konsantrasyonlarda NaCl içeren selektif besiyerlerine ekilmiş ve tuza toleranslı mutant bitkiler tespit edilmiştir.

Çalışmamızda elde edilen kontrol ve mutant bitkiler arasındaki moleküler düzeydeki farklılıklar, RAPD-PCR yöntemiyle ortaya konmuş ve kullanılan primerlere göre polimorfizm oranı % 89.66 olarak saptanmıştır. Ayrıca, Marfona patates (*Solanum tuberosum* L.) çeşidine ait kontrol ve mutant bitkilerin birbirlerine olan genetik uzaklıkları, SPSS istatistik programı kümeleme analiz yöntemi kullanılarak hesaplanmış ve dendrogramları çizilmiştir. Yapılan hesaplamalar sonucunda mutant bitkilerin, kontrol grubundan ortalama % 27.5 oranında genetik farklılığa sahip olduğu ve kontrol grubu ile en fazla genetik farklılığa ise % 47 oranıyla 100 mM tuz konsantrasyonu içeren selektif besiyerinde rejeneren olan 20 ve 30 Gy'lik gama radyasyonu uygulanmış mutant bitkilerin sahip olduğu tespit edilmiştir.

SUMMARY

INDUCED SOMATIC MUTATION WITH GAMMA RADIATION IN POTATO (*Solanum tuberosum* L.) TISSUE CULTURE

The fact that agricultural areas can not meet the expectations of increasing world population guides, plant breeders to improve existing varieties or to obtain more abiotic stress factors and decrease tolerant or resistant varieties.

Salinity is an important factor which has negative effects on productivity of agricultural crops that have economical and nutritional importance. Today it is possible to combine *in vitro* techniques and mutagens to obtain salt stress tolerant or resistant plant varieties.

In this study *in vitro* culture of potato (*Solanum tuberosum* L. cv. Marfona) which is one of the most important agricultural products of the world was established and different doses of gamma radiation were applied to stimulate somatic mutations.

To determine somatic mutations which had been stimulated by gamma radiation, node explants of M₁V₃ generation of Marfona potato variety placed into the selective culture media including different concentrations of NaCl and salt tolerant mutant plants had been determined.

In our study, molecular basis differences between obtained control and mutant plants presented by RAPD-PCR method and according to used primers, polymorphism ratio was 89.66%. Also genetic distance between control and mutant plants of Marfona (*Solanum tuberosum* L.) potato variety calculated by using cluster analysis method of SPSS statistic program and dendograms had been drawn. According to this calculations mutant plants have genetic difference from control plants by the ratio of 27.5% and the largest genetic difference by the ratio of 47% had been observed for the mutant plant which was irradiated with 20 and 30 Gy gamma radiation and regenerated in 100 mM salt concentration containing selective culture media.

1. GİRİŞ

Günümüzde insanların gıda ihtiyaçları, dünya nüfusuna paralel olarak artmakta fakat mevcut gıda üretimi ihtiyaçları karşılayacak düzeyde artış göstermemektedir. Tüm dünyayı ilgilendiren gıda üretimi ve tüketimi arasındaki denge sorunu ancak tarımsal üretimin iyileştirilmesi ve / veya artırılması ile mümkün olacaktır. Tarımsal üretimin iyileştirilmesi ve artırılması için ise, öncelikle değişen çevre şartlarına uyumlu ve adaptasyon yeteneği yüksek bitkilerin üretilmesi gerekmektedir. Çevresel şartlarda meydana gelen her türlü olumsuz değişimler, bitkilerde strese neden olarak, ürün verimini ve kalitesini düşürmektedir (Kanber ve Ünlü, 2008; Uygan ve diğ., 2006). Çevresel stres faktörlerinden biri olan tuzluluk, dünya tarım topraklarında bitki üretimine büyük zarar veren önemli bir sorundur. Özellikle kurak ve yarı kurak iklim bölgelerinde yetersiz yağış ve yüksek buharlaşma tuzluluğun başta gelen nedenlerindedir. Ayrıca, yanlış sulama uygulamaları özellikle drenaj koşullarının kötü olduğu yerlerde tuzluluğa sebep olabilmektedir (Aghaei ve diğ., 2008; Narita ve diğ., 2004; Foolad ve Chen, 1998; Zhang ve Donnelly, 1997). Ülkemizin sahip olduğu sıcak ve kurak iklim koşulları, tuzluluk ve çoraklığın oluşumu için çok uygundur. Ülkemizde yapılan arazi etütlerine göre sulanabilir özellikte 12.5 milyon hektar arazinin yaklaşık 1.5 milyon hektarlık bölümünde tuzlu topraklar mevcuttur. Düşük yağış miktarı ile eriyen tuzlar, fazla sıcaklığın etkisi ile toprak yüzeyinde birikerek tuz tabakaları oluşturmaktadır. Ülkemizde tuz tabakalarının olduğu alanlar, özellikle yükseklerden gelen sel sularının toplandığı düz ovalarda görülmekte ve bu bölgeler tuzluluk sorunundan dolayı kullanılamaz hale gelmektedir (Kanber ve Ünlü, 2008; Çolak ve diğ., 2008; Şen, 2005; Öztürk, 2004). Dünyada toprak tuz içeriğinin her yıl % 10 oranında artış eğiliminde olması ve buna bağlı olarak yaklaşık 10 milyon hektar arazinin tuzluluk etkisiyle kullanılamaz hale gelmesi, sorunun boyutunu anlamak için yeterlidir. Dünya topraklarında tuz problemi ile karşı karşıya kalan alanların miktarı kesin bilinmemekle birlikte yaklaşık olarak sulanan alanların dörtte birini oluşturduğu tahmin edilmektedir. Tuzluluk probleminin ciddi boyutlarda olduğu ülkeler arasında Avustralya, Çin, Mısır, Hindistan, Irak, Meksika, Pakistan, Suriye, Türkiye ve A.B.D.

öncelikle sayılabilir (Kanber ve Ünlü, 2008; Shaterian ve diğ., 2005; Öztürk, 2004; Ponnamiyuma, 1984).

Son yıllarda ülkemiz ve dünya topraklarında artan tuzluluk probleminin ciddi boyutlara ulaşması nedeniyle bitki ıslahçıları, tuz stresinin sebep olduğu ekonomik kayıpların azaltılması veya ortadan kaldırılması ve bu topraklarda yetiştirilebilecek tuza dirençli veya toleranslı bitki varyetelerinin elde edilmesi amacıyla yönelik çalışmalara hız vermişlerdir.

Bitki ıslahında mutasyonların teşvik edilmesi ile tuzluluk gibi çevresel stres faktörlerine dirençli veya toleranslı bitki varyeteleri geliştirilebilmektedir. Mutasyon, canlının genetik yapısında meydana gelen kalıcı değişiklikler olup hem eşey hem de somatik hücrelerde meydana gelebilir. Özellikle vegetatif yolla çoğalan bitkilerde mutant bireylerin elde edilmesinde somatik mutasyonlar oldukça önemlidir. Çünkü somatik hücrelerin mutasyona uğramasıyla buradan gelişen organlar mutant özellik kazanırlar. Bitkilerde çeşitli mutagenlerle somatik mutasyonların teşvik edildiği ve istenilen özelliklerin sağlandığı birçok çalışma yapılmıştır (Collet ve diğ., 2005; Franks ve diğ., 2002; Griffiths ve diğ., 1996).

Bitkilerde istenilen özellikteki mutasyonların kendiliğinden meydana gelme olasılığı çok düşüktür. Bu nedenle fiziksel veya kimyasal mutagenler, mutasyon frekansını artırmak amacıyla birçok bitki ıslah çalışmasında kullanılmaktadır (Saleem ve diğ., 2005; Atak ve diğ., 2004; Hewawasam ve diğ., 2004; Ahloowalia ve diğ., 2004). Fiziksel mutagenler, kimyasal mutagenlere göre birçok yönden daha avantajlıdır (Predieri ve Di Virgilio, 2007). Fiziksel bir mutagen olan gama radyasyonu başta vegetatif bitkiler olmak üzere birçok bitkide tercih edilmiş ve istenilen özelliklerde mutant bireyler elde edilerek yeni varyeteler oluşturulmuştur (Patade ve diğ., 2008; Fu ve diğ., 2008; Muthusamy ve diğ., 2007; Mohamed ve Haggag, 2006; Saleem ve diğ., 2005; Das ve diğ., 2000).

Biyoteknolojinin hızla ilerlemesi, *in vitro* bitki hücre ve doku kültürü tekniklerinin ıslah çalışmalarında kullanımını oldukça yaygınlaştırmıştır. *In vitro* tekniklerin, tek başına veya mutagenlerle kombine halde kullanımı, büyük populasyonlar içerisinde istenilen

genotipin seçilmesi ve çoğaltılması için bitki ıslahçılarında yeni ve geniş imkanlar sağlar. Vejetatif olarak üretilen bitkilerin ıslah çalışmalarında, *in vitro* tekniklerle beraber mutagenезin kombinasyonu etkili bir yöntem olup bu bitkilerde çeşitliliğin artmasına, istenilen genotipin klasik metodlardan daha kısa bir sürede ve küçük bir alanda çoğaltılmasına ve bu aşamayı takiben seleksiyonuna imkan verir (Lu ve diğ., 2007; Szarejko ve Forster, 2007; El-Sayed ve diğ., 2007; Saleem ve diğ., 2005; Hewawasam ve diğ., 2004; Lee ve diğ., 2003; Saif-Ur-Rasheed ve diğ., 2001; Ahloowalia ve Maluszynski, 2001; Das ve diğ., 2000, Alikamanoğlu, 1999).

In vitro kültür ortamında vejetatif bitkilerde yapılan mutasyon ıslahı çalışmalarında, genetik bir açılım olmadan çok kısa bir sürede istenilen özelliklere sahip çok sayıda mutant bireylerin elde edilmesi için bitki kısımlarının klonal çoğaltılması yani M_1V_1 , M_1V_2 , M_1V_3 ... generasyonlarının oluşturulması önemlidir (Hewawasam ve diğ., 2004; Ahloowalia ve Maluszynski, 2001). İzole edilen mutantlar, M_1V_2 ve M_1V_3 generasyonlarında, stabilite testleri yapılmak suretiyle istenilen özelliklere sahip somatik mutantlar olarak değerlendirilebilirler (Gulsen ve diğ., 2007; Zhen, 2001; Saif-Ur-Rasheed ve diğ., 2001). Özellikle vejetatif çoğalan bitkilerde elde edilen bireyler, kısa sürede doku kültürü sistemleri içerisinde klonal olarak çoğaltılıp M_1V_3 generasyonundan itibaren tuza dirençli veya toleranslı mutant olup olmadıkları, tarla denemelerinden önce belirlenebilir. Belirlenen ıslah hatları, *in vitro* vejetatif çoğaltma yöntemi ile saklanabilir ve böylece ıslahçının elinde tarla denemelerinde kullanılacak bir gen havuzu oluşturulabilir (Lokko ve Amoatey, 2001; Majid ve diğ., 2001; Zhen, 2001; Saif-Ur-Rasheed ve diğ., 2001; Alikamanoğlu, 1999).

Solanum cinsine ait vejetatif bir bitki olan patates (*Solanum tuberosum* L.), nişasta tüberleri için yetiştirilen ve özellikle karbonhidrat kaynakları arasında ilk sırada yer alan en önemli bitkisel besinlerden biridir. Anayurdu Güney Amerika'daki And Dağları olup 16.yüzyılda Avrupa'ya getirilmiştir. Patates bitkisi, dünya gıda üretiminde en önemli dördüncü ürün olmasına rağmen çeşitli abiyotik stres şartlarına ve hastalıklarına olan hassasiyetinden dolayı üretimi kısmen de olsa sınırlandırılmıştır (Aghaei ve diğ., 2008; Byun ve diğ., 2007; Nyende ve diğ., 2005; Arıcan, 2001).

Çalışmamızda, vejetatif yolla üreyen patates bitkisinde somatik mutasyonların gama radyasyonu ile teşvik edilerek mutant bireylerin elde edilmesi ve elde edilen bu mutant bireyler arasındaki farklılıkların moleküler düzeyde belirlenmesi amaçlanmıştır. *In vitro* ortamda patates doku kültürü kurularak, belli bir doz aralığında gama radyasyonu uygulanması sonucu kültürlerde somatik mutasyonların teşvik edilerek, tuz stresine karşı toleranslı mutant bitkilerin elde edilmesi, patates bitkisinde önemli stres faktörlerinden biri olan tuzluluğun neden olduğu kayıpların giderilmesi için büyük avantajlar sağlayacak ve bu konuda yapılacak mutasyon ıslahı çalışmalarına ışık tutacaktır.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. PATATES (*Solanum tuberosum* L.)

Solanum cinsine ait vejetatif bir bitki olan patates (*Solanum tuberosum* L.), yüksek karbonhidrat içeriğine sahip nişastalı tüberleri için yetiştirilen ve yaklaşık 300 milyon ton yıllık üretimi ile pirinç, buğday ve mısırdan sonra dünyanın dördüncü en önemli tarım ürünüdür. Tüberli bitkilerin en önemlisi olan patates, birim alanda sağladığı yüksek üretim kapasitesinden dolayı 18 milyon hektarlık ekim alanı ile dünyada sekizinci sıradadır ve günümüzde gün geçtikçe artan gıda ihtiyacını karşılayacak önemli besin kaynaklarının başında gelmektedir (Nadolska-Orczyk ve diğ., 2007; Byun ve diğ., 2007; Nhut ve diğ., 2006; Nyende ve diğ., 2005; Mohanty ve diğ., 2004; Arıcan, 2001; Manrique, 2000).

Patates (*Solanum tuberosum* L.), 90 cins ve 2500 türden oluşan *Solanaceae* familyasına ait $2n=4x=48$ kromozomlu bir bitkidir. Patates'in birçok çeşidinin anayurdu Güney Amerika'daki And Dağları olup bazı çeşitlerinin de kökeni A.B.D'ye kadar uzanmaktadır (Nadolska-Orczyk ve diğ., 2007; Byun ve diğ., 2007; Mohanty ve diğ., 2004; Hooker, 1981). Tarımına 3500 ile 4000 yıl önce başlanan patates bitkisinin Avrupa, Asya ve Kuzey Amerika'ya getirilişi 16. yy'ın sonlarına ve 17. yy'ın başlarına dayanmaktadır. Patates bitkisinin üretiminde başı çeken ülkeler sıralamasında % 22 pay ile Çin ilk sırada yer alırken daha sonra % 12 ile Rusya, % 7 ile A.B.D. ve Hindistan gelmektedir. Patates üretiminde verimin hektar başına en yüksek olduğu ülkeler ise sırasıyla A.B.D., Almanya, Türkiye, Hindistan, Polonya, Çin ve Rusya'dır (Byun ve diğ., 2007; Kim, 2005; Gül ve Tan, 2003).

Patates (*Solanum tuberosum* L.), yüksek kalitede protein, mineral, C vitamini, besinsel lif, B grubu vitaminlerin bir kısmı ve eser elementlerin çoğunu içermektedir. Bunlara ek olarak nişasta miktarı bakımından tahıllarla karşılaştırıldığında birim ünite başına 3–4 kat daha fazla kalori içerdiğinden gıda endüstrisinde oldukça önemli bir yere sahiptir (Nyende ve diğ., 2005; Mohanty ve diğ., 2004; Khan, 1993). Özellikle geri kalmış ülkelerde, içerdiği değerli besin maddeleri nedeniyle halkın temel gıda

gereksinimini karşılayan patates, gıda sanayinde değişik şekillerde işlenerek cips, kızartma ve püre şeklinde de tüketilmektedir. Ayrıca, ekmek ununa belirli oranda patates unu karıştırıldığında, ekmeklerde bayatlamayı geciktirmektedir. Gıda sanayinde kullanılmayan ve yemeklik olarak tüketilemeyen patates tüberleri ise hayvan yemi olarak değerlendirilebilmektedir. Bunların dışında patates nişastası özellikle şekerlik, alkol üretimi, dokuma, kağıt ve tutkal endüstrisinde de yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Nhut ve diğ., 2006; Yıldırım ve diğ., 2005; Mohanty ve diğ., 2004; Vermerris ve diğ., 2001; Arıcan, 2001; Arıoğlu, 1997).

Türkiye'de son yıllarda kaliteli ve verim oranı yüksek tohumluk kullanımının yaygınlaşması sonucu patates üretiminde önemli gelişmeler kaydedilmiştir. Türkiye'de toplam patatesin ekim alanı 200 000 hektar, üretimi 5 milyon ton ve verimi ise yaklaşık hektar başına 25 ton'dur. Türkiye bugün dünyada, patates üretim alanı bakımından 10., üretim miktarı açısından ise 11. sırada yer almaktadır. Ülkemizde üretilen patatesin büyük bir çoğunluğu yurt içinde tüketilmektedir. Türkiye'nin bütün bölgelerinde patates üretimi yapılmakla birlikte, başlıca patates üretim bölgeleri Orta Anadolu, Karadeniz, Ege ve Kuzey Doğu Anadolu bölgeleridir. En fazla üretim yapılan iller ise sırasıyla Niğde, Nevşehir, İzmir, Bolu, Afyon, Trabzon, Konya, Erzurum ve Ordu'dur. Bu illerin ekim alanı bakımından toplamı, Türkiye'nin toplam patates ekim alanının % 59,5'inin oluştururken, bu illerin toplam üretimi ise Türkiye'nin toplam patates üretiminin % 68,8'ini oluşturmaktadır (Birinci ve Küçük, 2006; Yıldırım ve diğ., 2005; Gül ve Tan, 2003).

Ülkemiz ve dünyada önemli bir yere sahip olmasına rağmen patates bitkisi, çeşitli abiyotik stres koşullarına ve hastalıklara karşı hassas olduğundan üretim alanı gün geçtikçe daralmaktadır. Bu nedenle abiyotik stres koşullarına dayanıklı, hastalıklara karşı dirençli veya toleranslı patates çeşitlerinin geliştirilmesi büyük önem taşımaktadır.

2.2. DOKU KÜLTÜRÜ

Günümüzde tarımsal bölge topraklarının gün geçtikçe azalması ve buna bağlı olarak elde edilen tarım ürünlerinin, artan nüfusun beslenme ihtiyaçlarını karşılamaya yeterli olmaması, bitki ıslahçıların birim alandan elde edilen ürün verimini artırma çalışmalarına yönlendirmiştir.

Bitki doku kültürü, totipotensi yeteneğine sahip bitki hücre, doku ve organlarının ana bitkiden izole edilerek mikroorganizmalardan arındırılmış uygun yapay besiyeri içeren bir ortamda yetiştirilmesidir. Bitkiden alınarak büyümesi için yapay ortama taşınan hücre, doku ve organ kısımlarına eksplant denir. Eksplantlardan amaca uygun şekilde organogenez, embriyogenez veya kallus dokusu teşvik edilerek *in vitro* şartlarda bitki oluşumu sağlanabilir. Bitki doku kültürü teknikleri ile embriyo kültürleri, meristem kültürleri, kallus kültürleri, haploid kültürler, süspansiyon kültürleri, protoplast kültürleri kurulabilir (George, 2008; Thorpe ve diğ., 2006; Babaoğlu ve diğ., 2001; Alikamanoğlu, 1999).

Bitki ıslah programlarında doku kültürü tekniklerinin kullanılması, klasik yöntemlerle 15–20 yıl kadar uzun sürelerde geliştirilen bitkilerin çok daha kısa süreler içerisinde elde edilmesine imkan sağlamıştır. Ayrıca doku kültürü çalışmaları, generatif ve vejetatif olarak çoğaltılmasında zorluk çekilen bitkilerin üretilmesinde meydana gelen sorunları da ortadan kaldırmıştır (Sağel ve diğ., 2002; Alikamanoğlu, 1999; Rasol ve diğ., 1999).

Bitki doku kültürü çalışmalarının temelini bitki rejenerasyonu oluşturmaktadır. Yapılacak doku kültürü çalışmalarının amacı doğrultusunda bitki rejenerasyonu, tüm bitki kısımlarından elde edilebileceği gibi meristematik hücreleri içeren somatik dokulardan da sağlanabilir. Meristem, sürekli olarak bölünebilme yeteneğine sahip hücrelerin oluşturduğu dokulardır. Bitki doku kültüründe aksiler tomurcuk, lateral tomurcuk, sürgün ucu gibi meristematik dokulardan meristem kültürleri kurulabilir. Meristematik hücrelerden rejeneren bitkilerin çoğaltımına klonal çoğaltım denir. Kültür ortamında meristematik dokulardan rejeneren bitkilerin genetik yapısında herhangi bir değişim meydana gelmez ve bu dokulardan çoğaltılan bitkilerin tümü

genetik bakımdan donör bitkinin aynısı olur. Ayrıca bitkinin apikal sürgün ve kök meristemi hücrelerinin, mikroorganizma içerme ihtimalinin çok düşük olması, kurulan meristem kültürlerinde oluşabilecek kontaminasyon riskini oldukça azaltmaktadır (Babaoğlu ve diğ., 2001). Özellikle vejetatif bitkiler ile yapılan bitki ıslahı çalışmalarında, klonal çoğaltım yapılarak meristem kültürleri kurulmuş ve mikroorganizmalardan arı, genetik stabilitesi korunmuş bitkiler elde edilmiştir (Sarkar ve diğ., 2004; Sağel ve diğ., 2002; Bergmann ve Moon, 1997; Rao ve diğ., 1996).

Yapılan birçok *in vitro* çalışmada, vejetatif olarak üretilen patates bitkisinin meristem kültürü kurulmuş ve uygun koşullarda nod eksplantlarından tam bitki veya mikro tüber eldesi sağlanmıştır (Sarkar ve diğ., 2004; Saif-Ur-Rasheed ve diğ., 2001; Vermerris ve diğ., 2001; Zobayed ve diğ., 2001; Veramendi ve diğ., 1999; Gopal ve diğ., 1998; Anjum ve Villiers, 1997; Ranalli ve diğ., 1994; Roca ve diğ., 1979). *In vitro* ortamda, mikro tüberlerin kısa sürede üretilmesi, üretiminin mevsimlere bağlı olmadan gerçekleştirilmesi ve maliyetinin fideliğe göre daha düşük olması, tohumluk patates eldesinde mikro tüberlerin üretimine değer kazandırmıştır (Yıldırım ve Tugay, 2002).

Bitki doku kültürü çalışmalarında en iyi rejenerasyonu elde edebilmek için uygulanacak doku kültürü yönteminin belirlenmesinin yanı sıra, kullanılacak eksplant, besi ortamı ve bitki büyüme düzenleyicilerinin seçimini yapmakta oldukça önemlidir.

Meristem kültüründe başarıyı etkileyen etmenlerin başında, çalışmada kullanılacak bitki materyalinin seçimi gelmektedir. Donör bitkinin yetiştirildiği çevre koşulları ile eksplantın alındığı bölge, rejenerasyonu etkileyen diğer önemli faktörlerdir. Yapılan bir çalışmada, patates bitkisinde *in vitro* ortamda yetiştirilen bitkilerden alınan eksplantların, topraktaki tüber sürgünlerinden alınan eksplantlara göre daha yüksek rejenerasyon gösterdiği belirtilmiştir (Babaoğlu ve diğ., 2001). Patates doku kültüründe tüber ve yaprak eksplantlarının kullanımının yanısıra en iyi sürgün rejenerasyonunun, meristem hücrelerinin bulunduğu nod eksplantlarından sağlandığı yapılan birçok çalışma ile gösterilmiştir (Sarkar ve diğ., 2004; Pompe-Novak ve diğ., 2002; Chang ve diğ., 2002; Yıldırım ve Tugay, 2002; Vermerris ve diğ., 2001; Zobayed ve diğ., 2001; Duffy ve Cassells, 2000; Gopal ve diğ., 1998; Anjum ve Villiers, 1997).

Doku kültüründe başarıyı etkileyecek bir diğer önemli faktör ise kullanılacak besi ortamı ve içerdiği bitki büyüme düzenleyicileridir. Meristem kültürünün ilk uygulandığı yıllarda bitki rejenerasyonunun sağlanmasında White ortamı kullanılmış fakat daha sonra Murashige ve Skoog (MS) ortamının rejenerasyon için daha uygun olduğu saptanmıştır. Meristem kültürlerinde en fazla kullanılan ve başarı sağlanan ortam olan MS besi ortamı, *in vitro* patates sürgün ve mikrotüber üretiminin yapıldığı birçok doku kültürü çalışmasında da başarıyla kullanılmaktadır (Graskova ve diğ., 2004; Sarkar ve diğ., 2004; Pompe-Novak ve diğ., 2002; Babaoğlu ve diğ., 2001; Zobayed ve diğ., 2001; Duffy ve Cassells, 2000).

Meristem kültürleri için gerekli bitki büyüme düzenleyicileri, bitkinin türüne ve doku kültürü amacına bağlı olarak belirlenmektedir. Bazı bitki türlerinde, doku kültürünün ilk aşamasında bitki büyüme düzenleyicilerine gereksinim duyulmazken çoğu türlerde, doku kültürünün başlangıç aşamasında, büyümeyi ve meristemin gelişimini destekleyen düşük konsantrasyonlarda bitki büyüme düzenleyicileri mutlaka gerekmektedir. *In vitro* ortamda yapılan patates doku kültürü çalışmalarında, MS besi ortamına amaca göre bitki büyüme düzenleyicilerinden oksin olarak, 2,4-Diklorofenoksi asetik asit (2,4-D) ve Indol-3-Asetik Asit (IAA), sitokinin olarak ise 6-Benzil amino pürin (BAP), Zeatin Ribosid (ZR) ve Kinetin (K) eklenerek, mikrotüber ve sürgün rejenerasyonu başarı ile teşvik edilmiştir (Graskova ve diğ., 2004; Chang ve diğ., 2002; Yıldırım ve Tugay, 2002; Arıcan, 2001; Duffy ve Cassells, 2000; Gopal ve diğ., 1998; Anjum ve Villiers, 1997).

2.3. SOMATİK MUTASYON

Kalıtım materyalinin fiziksel veya kimyasal yapısının iç veya dış etkenlerle değişmesi sonucunda canlı organizmada meydana gelen kalıcı değişikliklere mutasyon denir. Mutasyon terimi kromozomlardaki yapı, sayı ve genlerdeki değişiklikleri ifade eder. Mutasyonlar hem eşey hücrelerinde hem de somatik hücrelerde meydana gelebilir. Eşey hücresi dışında diğer bütün hücrelerde meydana gelen mutasyonlar somatik mutasyonlardır. Vejetatif çoğalan bitkilere istenilen özelliklerin kazandırılmasında somatik mutasyonların rolü büyüktür. Büyüme noktasındaki tek bir hücrenin mutasyona uğramasıyla bu hücreden gelişen bitki mutant özellik taşır. Bitkilerde çeşitli mutagenler

kullanılarak somatik mutasyonların teşvik edildiği ve istenilen özelliklerin kazandırıldığı birçok çalışma yapılmıştır (Collet ve diğ., 2005).

Fiziksel veya kimyasal mutagenler, mutasyonların teşvik edilmesinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Saleem ve diğ., 2005; Atak ve diğ., 2004; Hewawasam ve diğ., 2004; Sağel ve diğ., 2002; Das ve diğ., 2000). Fiziksel mutagenler, kimyasal mutagenlere göre toksik kalıntılarının ve zararlı maddelerinin çevreye karışma riskinin olmaması, kolay uygulanabilirliği ve uygulanan dozun net olarak belirlenebilmesi gibi önemli avantajlara sahiptirler (Predieri ve Di Virgilio, 2007). Fiziksel bir mutagen olan gama radyasyonu kullanılarak hastalıklara direnç, tuzluluğa direnç, soğuğa ve sıcaklığa karşı mukavemet, yüksek yağ, protein ve verim kalitesi gibi agronomik özellikleri taşıyan mutant bireyler elde edilmiş ve bunların çoğaltılmasıyla yeni varyeteler oluşturulmuştur (Patade ve diğ., 2008; Fu ve diğ., 2008; Muthusamy ve diğ., 2007; Mohamed ve Haggag, 2006; Saleem ve diğ., 2005; Lee ve diğ., 2003; Lage ve diğ., 2002; Das ve diğ., 2000) .

In vitro tekniklerle beraber mutagenezin kombinasyonu, vejetatif olarak üretilen bitkileri geliştirmek için etkili bir yöntemdir. Bu teknikler varyasyonun artmasına, istenilen genotipin klasik metodlardan daha kısa bir sürede ve küçük bir alanda çoğaltılmasına ve bu aşamayı takiben seleksiyonuna imkan verir (Lu ve diğ., 2007; Szarejko ve Forster, 2007; Saleem ve diğ., 2005; Hewawasam ve diğ., 2004; Lee ve diğ., 2003; Saif-Ur-Rasheed ve diğ., 2001; Ahloowalia ve Maluszynski, 2001). Günümüze kadar bitkilerde direkt ve indirekt olmak üzere toplam 2570 mutant varyete elde edilmiş bunların 1023'ünde gama radyasyonu, 19'unda ise *in vitro* teknikler ile birlikte gama radyasyonu kombine edilerek kullanılmıştır. Patates ile yapılan mutasyon çalışmaları sonucunda ise patatese ait 6 mutant varyete elde edilmiş ve bu çalışmaların birinde gama radyasyonu kullanılmıştır (FAO/IAEA veritabanı, 2009).

Mutasyon çalışmalarında uygulanacak radyasyon dozunun saptanması önemlidir. Radyasyon dozunun artmasıyla mutasyon oranı artmakta ancak, bitkilerde morfolojik ve fizyolojik zararlanma oluşmakta ve sonuç olarak bitki yaşamını sürdürmemekte, sürdürse bile steril olmaktadır. Bu nedenle mutasyon ıslahı çalışmalarında uygulanacak dozların çok iyi belirlenmesi gerekmektedir. Yapılan birçok mutasyon ıslahı çalışmasında ED₃₀ (Etkin doz, büyüme parametresini kontrole göre % 30 azaltan doz)

dozunun % 15–20 alt ve üst sınırları, istenilen özelliklere sahip mutant bitkilerin elde edilmesi için tercih edilmektedir (Predieri ve Di Virgilio, 2007; Mba ve diğ., 2007; Toker ve diğ., 2007; Sağel ve diğ., 2002).

Somatik mutasyonların teşvik edilmesinde ve saptanmasında mutasyona uğrayan hücrelerin, meristematik doku tabakalarındaki konumu çok önemlidir. Mutant hücrelerin meristematik doku tabakasındaki konumlarına göre meriklinal, sektöriyel ve periklinal olmak üzere üç farklı şekilde kimera oluşumu mevcuttur. Mutasyon uygulamaları sonucu oluşan periklinal kimera stabil olup bu yapılarda oluşturulan somatik mutasyonlar, klonal çoğaltım yapılarak saptanabilirler. Fakat, meriklinal ve sektöriyel kimeralar stabil olmadıklarından bu yapıdaki mutant hücreler, normal hücreler ile girdikleri gelişim rekabetini çoğunlukla kaybederler ve böylelikle oluşturulan somatik mutasyonlar saptanamazlar. Bu olaya diplontik seleksiyon adı verilir. Fakat, *in vitro* teknikler kullanılarak meriklinal ve sektöriyel kimeralarda oluşturulan somatik mutasyonlar belirlenebilir. Çünkü *in vitro* doku kültürleri, *in vivo* tekniklere göre büyümenin yavaş geliştiği sistemlerdir ve bu yavaş gelişim, uygulanan radyasyon sonucu hücre aktivitesi yavaşlayan, kromozomlarında zararlanma ve mitoz bölünmesinde gecikmeler meydana gelen mutant hücrelere gelişim fırsatı sağlayabilir. Yeniden hücrel faaliyetlerine başlayan mutant hücreler, normal hücreler ile girdikleri rekabeti kazanıp, somatik mutantlar olarak saptanabilirler (Çoban, 2003; Sağel ve diğ., 2002; Babaoğlu ve diğ., 2001; Alikamanoğlu, 1999).

Teşvik edilen somatik mutasyonların tespit edilmesi ile ayrılmasında ortaya çıkan problemlerin giderilmesi için *in vitro* klonal çoğaltım uygulaması tercih edilen bir yöntemdir. Kültür ortamında M_1V_1 (Mutasyon bir, Vegetasyon bir) gövdelerinden aksilar tomurcukların gelişmesini sağlamak klonal çoğaltımın esasını oluşturur. *In vitro* ortamda radyasyona maruz bırakılmış ilk vejetatif sürgünlere M_1V_1 adı verilir. Benzer olarak uygulamayı takip eden ikinci ve daha sonraki vejetatif generasyonlar ise M_1V_2 ve M_1V_3 olarak isimlendirilir. İstenilen özelliklere sahip mutant bireylerin elde edilmesi için geniş populasyonların oluşturulması gerekmektedir. Genetik bir açılım olmadan çok kısa bir sürede *in vitro* klonal çoğaltım ile oluşturulan M_1V_3 , M_1V_4 , M_1V_5 generasyonları, istenilen karakterlerin bitkide ortaya çıkartılmasına olanak sağlayabilir (Hewawasam ve diğ., 2004; Ahloowalia ve Maluszynski, 2001) . Mutasyon ıslahı ile

in vitro kültür ortamında sürgün uçları, adventif filizler, nod bölgeleri ve aksiler tomurcuklardan gelişen kısımların mikro üretim ile çoğaltılması yani M_1V_1 , M_1V_2 , M_1V_3 generasyonlarının oluşturulması, somatik mutasyonların izolasyonları için önemlidir. Yapılan birçok mutasyon çalışmasında, M_1V_3 generasyonundan itibaren uygulanan stabilite testleri sonucu istenilen özelliklere sahip mutant bitkilerin tespit edilmesi sağlanmıştır (Gulsen ve diğ., 2007; Lokko ve Amoatey, 2001; Majid ve diğ., 2001; Zhen, 2001; Saif-Ur-Rasheed ve diğ., 2001; Sharabash, 2001; Gosal ve diğ., 2001; Das ve diğ., 2000; Alikamanoğlu, 1999).

2.4. TUZ STRESİ

Çevresel stres faktörleri bitkilerin ürün verimi ve kalitesi üzerinde oldukça etkilidir. Bitkinin yetiştirildiği ortamda biyotik veya abiyotik kökenli, bir veya daha fazla stres faktörünün etkisiyle bitki büyüme ve gelişmesinde meydana gelen her türlü olumsuz değişimler bitkisel üretimde azalmaya neden olur. Bitkilerde stres, önemli fizyolojik ve metabolik değişimlere yol açarak büyüme ve gelişmeyi olumsuz şekilde etkilerken, ürün kalitesinin ve miktarının azalmasına, bitki kısımlarının veya bitkinin tamamının kaybına yol açabilmektedir. Özellikle dünyada kurak ve yarı kurak topraklarda bitki üretiminin önemli derecede azalmasına neden olan en önemli stres faktörlerinden biri olan tuzluluk, çözünebilir tuz bileşiklerinin ykanarak yer altı suyuna karışması ve tekrar yüksek taban suyu ile birlikte kapilarite yoluyla toprak yüzeyine çıkması ve sonra suyun buharlaşması ile toprak yüzeyinde birikmesi olayıdır. Toprak yüzeyinde biriken bileşiklere örnek, klorür olarak $NaCl$, $CaCl_2$, $MgCl_2$, sülfat olarak Na_2SO_4 , $MgSO_4$, nitrat olarak $NaNO_3$, KNO_3 , karbonatlar ve bikarbonatlar olarak ise Na_2CO_3 , $NaHCO_3$ verilebilir. Ancak genelde toprak tuzluluğu ve tuz stresi denildiğinde $NaCl$ 'nin varlığından söz edilmektedir. Çünkü, $NaCl$ çözünürlüğü çok yüksektir ve bu nedenle toksik etkisi en fazla olan ve rastlanılan tuz bileşiğidir. Tuzlanmanın başlıca nedenleri arasında yetersiz yağış, yüksek buharlaşma, yüksek taban suyu, kötü drenaj, yanlış gübreleme, yanlış toprak işleme ve yanlış sulama teknikleri sayılabilir (Pareek ve diğ., 2007; Sönmez ve Sönmez, 2007; Pan ve diğ., 2006; Şen, 2005; Narita ve diğ., 2004; Foolad ve Chen, 1998).

Günümüzde sulanabilir toprakların % 25'inin üzerinde tuzluluk etkilidir ve özellikle Akdeniz Havzası, California ve Güney Doğu Asya gibi dünyanın en çok üretim potansiyeline sahip bölgelerinde önemli bir sorun olmaya başlamıştır. Yapılan çalışmalar 2050 yılına kadar tarıma uygun toprakların %50'sinin ciddi bir biçimde tuzluluk sorunu ile karşı karşıya kalacağını göstermektedir (Pareek ve diğ., 2007; Shaterian ve diğ., 2005).

Tuzluluk, bitkilerin bütün metabolizmasında etkili olan bir faktördür. Bitkilerde görülen en önemli tuz zararı büyüme ve gelişmenin engellenmesidir. Tuz stresi toleransa bağlı olarak büyümeyi engellemekte, verim ve kaliteyi azaltarak ani bitki ölümlerine neden olabilmektedir. Topraklarda bulunan veya sulama sonucu oluşan tuzların neden olduğu toprak tuzluluğu, bitkiler üzerinde iki şekilde etkili olmaktadır. Birincisi, bitkilerin toprak çözeltisinden su alımını engelleyen ozmotik etki, ikincisi ise bitkilerdeki bazı fizyolojik olayları etkileyen toksik iyon etkisidir (Munns ve Richards, 2007; Mba ve diğ., 2007; Müftüoğlu ve diğ., 2006; Şen, 2005; Sairam ve Tyagi, 2004).

Toprak içerisinde yeterli miktarda su bulunmasına rağmen, bazı koşullar altında bitkilerin solmaya başladıkları görülür ve bu durum genellikle yüksek toprak tuzluluğunun yarattığı fizyolojik kuraklıktan kaynaklanmaktadır. Fizyolojik kuraklık, yüksek ozmotik basınç nedeniyle bitki köklerinin topraktaki mevcut suyu alamaması durumudur (Müftüoğlu ve diğ., 2006; Bandoğlu ve diğ., 2004; Davenport ve diğ., 2003). Tuzlu koşullarda bitkilerde meydana gelen değişiklikler, hormonal dengesizliklere, stoma açılımı ve CO₂ alımının azalmasına, transpirasyon kaybına ve neticede bitkilerde büyümenin azalmasına neden olmaktadır (Müftüoğlu ve diğ., 2006; Pan ve diğ., 2006; Narita ve diğ., 2004).

Tuz stresine bağlı olarak bitki hücrelerinde, suyun azalması ve iyonların artmasıyla enzim aktivitesi azalırken, protein sentezi geriler, zar geçirgenliği azalır, kloroplastlar ve diğer hücresel yapılar önemli ölçüde zarar görür. İyonlar arasındaki denge bozulduğundan tuzu oluşturan iyonlarla bitki için gerekli besin mineralleri arasında rekabet görülür ve bitkiler kendileri için gerekli elementleri yeterli miktarda alamazlar. Bitki protoplazmasında Na⁺ ve Cl⁻ konsantrasyonlarının artışı, iyon dengesizliğine neden olmakta ve özellikle Na⁺ birikimi, K⁺, Mg⁺² ve Ca⁺² alımını engellemektedir.

Ayrıca tuz stresi bitkilerde hidrojen peroksit (H_2O_2), superoksit ($O_2^{\cdot-}$) ve hidroksil (OH^{\cdot}) radikallerini içeren reaktif oksijen türevlerinin üretimini artırır. Bu reaktif oksijen türevleri sitotoksiktir ve lipid, protein ve nükleik asitlerin normal metabolizmasında ciddi hasarlar meydana getirirler. Özellikle hidroksil radikalleri, klorofil, protein, DNA, lipid ve diğer önemli makro moleküllere hasar vererek bitkiyi ölüme götürebilir (Byun ve diğ., 2007; Uddin ve diğ., 2007; Eryılmaz, 2006; Aoki ve diğ., 2005)

Tuza olan tolerans bakımından bitkilerde ailya, cins ve türler arasında farklılıklar bulunduğu gibi, aynı türe ait çeşitler arasında da ayrımların bulunduğu bilinmektedir (Müftüoğlu ve diğ., 2006; Silva ve diğ., 2001). Bitkiler, yüksek konsantrasyonda tuz içeren topraklarda gösterdikleri direnç bakımından halofitler ve glikofitler olarak iki büyük gruba ayrılırlar. Halofitler, topraktaki yüksek tuz konsantrasyonunda yaşam döngülerini sürdüren bitkilerdir. Glikofitler ise tuzlu ortamlara halofitler kadar dayanıklı olmayan tuza duyarlı bitkilerdir. Pek çok bitki çeşidi glikofit olup, yüksek konsantrasyondaki tuz stresini tolere edemezler. Glikofitler için topraktaki tuz konsantrasyon eşliğinin geçilmesi, bitki büyümesinde duraklamaya ve bitkinin ölümüne neden olur.

Bitkilerde tuz konsantrasyon eşliğinin incelenerek tuza dayanıklılık sınırlarının ortaya konması, özellikle toprak tuzluluğunun belirli bir düzeyin altına düşürülemediği alanlarda ekonomik değere sahip bitkilerin seçilerek yetiştirilmesi amacıyla önemlidir. Toprağın elektrik akımını taşıma kabiliyetinden yararlanılarak tarım alanlarının tuzluluk miktarı ölçülebilir ve bu topraklarda yetiştirilen bitkilerin tuza tolerans durumları saptanabilir. Bu özelliğe elektriksel iletkenlik (EC) adı verilir ve milimhos birim santimetre (mmhos/cm) veya desiSimens birim metre (dS/m) olarak ifade edilir. NaCl çözeltilisinin $25^{\circ}C$ 'de, 1 dS/m birimindeki elektriksel iletkenliğinin ppm (milyonda bir birim) cinsinden değeri: $1 \text{ dS/m} \times 500 = \text{mg} / \text{lt}$ 'dir. Elektriksel iletkenliği 1,5- 3 dS/m (15-30 mM, NaCl konsantrasyonu içeren) olan topraklarda yaşayabilen bitkiler tuza duyarlı bitkiler olarak ifade edilir (mercimek, bezelye, patates, vs...). Elektriksel iletkenliği 3 - 5 dS/m (30-50 mM, NaCl konsantrasyonu içeren) olan topraklarda yaşayabilen bitkiler ise orta derecede tuza toleranslı bitkilerdir (domates, soya fasülyesi, ayçiçeği, vs.). Elektriksel iletkenliği 5 - 10 dS/m (50-100 mM, NaCl

konsantrasyonu içeren) olan topraklarda yaşayabilen bitkiler ise tuza toleranslı bitkilerdir (arpa, pamuk, buğday, vs.) (Byun ve diğ., 2007; Mba ve diğ., 2007; Lee ve diğ., 2007; Şen, 2005; Sairam ve Tyagi, 2004).

Dünya gıda ve nişasta endüstrisinde önemli bir tarım ürünü olan patates (*Solanum tuberosum* L.) çeşitlerinin çoğu, seyrek ve kısa kök sistemi nedeniyle sıcaklık değişiklikleri, kuraklık, yüksek tuzluluk gibi çevresel stres faktörlerine karşı oldukça hassastırlar (Byun ve diğ., 2007; Lee ve diğ., 2007; Silva ve diğ., 2001). Tuz stresi, patates bitkisinin üretim alanını büyük ölçüde kısıtlayan bir etkidir ve bu sebeple patates, tuz stresine karşı hassas bitkiler arasında gösterilmektedir (1,7 dS/m, EC). Elektriksel iletkenliği 1,7 - 3,0 dS/m olan tuzlu ortamda yetiştirilen patates bitkisinin büyümesinde azalma ve ürün veriminde ciddi kayıplar meydana gelmektedir. Diğer tarım ürünleri ile karşılaştırıldığında patates bitkisi tuz stresine karşı biber ve mısıra göre daha dayanıklı fakat domates, pirinç, soya fasulyesi ve arpaya göre daha hassastır (Byun ve diğ., 2007).

2.5. RAPD-PCR YÖNTEMİ

Genetik markörler, bağlantılı bir lokustaki allelleri tanımlamak için kullanılan saptanabilir gen yada DNA parçası olup, morfolojik, biyokimyasal ve moleküler markörler olmak üzere üç gruba ayrılırlar. Genetik haritalamada markörlerin kullanılabilmesi için polimorfik olmaları zorunludur. Polimorfizm, kullanılan bir markörün farklı genotipleri ayırt edebilme yeteneği olup DNA'da yer değiştirmeler, ters dönmeler ve parça eksilmeler ile meydana gelir ve genlerin düzenini dolayısıyla canlı gelişimini, morfolojisini ve davranışını etkiler. Markörlerin farklılık gösterme oranları markör tipine ve bitki türüne göre büyük ölçüde değişmektedir (Babaoğlu ve diğ., 2004; Yıldırım ve Kandemir, 2001).

Yaprak sapı, tüy yapısı ve çiçek rengi gibi karakterlerin oluşturduğu morfolojik markörler, heterozigot bireylerin, homozigot dominant bireylerden ayırt edilmesinde kullanılamazlar. Sadece dominant fenotipi resesif fenotipten ayırabilirler. Bunun yanında çevresel faktörlerden etkilenirler. Pleotropik veya epistatik etkilere maruz kalırlar. Bu morfolojik karakterlerin analizlerinin kolay olması bir avantaj olsa bile

yakın genotipler arasında sınırlı sayıda polimorfizm göstermesi nedeniyle morfolojik markörler, genetik tanı çalışmalarında fazlaca kullanılmamaktadır (Yıldırım ve Kandemir, 2001; Kleinhofs ve diğ., 1993).

Biyokimyasal markörler ise morfolojik karakterlerin çevreden etkilenmelerini ortadan kaldırmak için geliştirilmiş enzim veya protein markörleridir. Enzim ve protein markörler, çevresel faktörlerden ve diğer lokuslardan etkilenmeyen ve genlerin ara ürünü olan biyokimyasal sistemlerdir. Çeşitli biyokimyasal sistemler kullanılarak populasyon içerisinde bulunan mevcut varyasyonların saptanabilmesine rağmen bazı enzimlerin ancak özel dokularda ve belli bir gelişme periyodunda gözlenmesi ve moleküler markörlere göre düşük polimorfizm göstermesi, biyokimyasal markörlerin kullanımını sınırlandırmıştır (Yıldırım ve Kandemir, 2001; Alikamanoğlu, 1999).

Moleküler markörler tanım olarak aynı türe ait bireyler arasındaki farklılığı gösteren, kalıtımı kolaylıkla belirlenebilen bir DNA dizilimidir. Günümüzde bitki türlerinin tanımlanmasında ve genetik varyasyonun araştırılmasında, ıslah programında kullanılacak ebeveynlerin saptanmasında, evrimsel gelişmeler ve kromozomlarda oluşan yapısal değişmelerin belirlenmesinde, genetik haritalamada, transgenik bitkilerin saptanmasında ve mutasyonların belirlenmesinde moleküler markörler yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu markörler, çevresel faktörlerden etkilenmeyen ve yüksek polimorfizm gösteren genetik markörlerdir. Aynı zamanda pleotropik ve epistatik etki göstermeyip son derece stabildirler (Yıldırım ve Kandemir, 2001; Williams ve diğ., 1990). Hibridizasyona dayalı DNA melezleme (RFLP) markörleri ve polimeraz zincir reaksiyonu kullanımına dayalı DNA çoğaltım (PCR) markörleri olmak üzere iki grup altında incelenirler (Yıldırım ve Kandemir, 2001).

DNA zincirinin komplementer yapısı nedeniyle DNA/DNA veya DNA/RNA arasında melez moleküller oluşturması temeline dayanan RFLP (kesilmiş parçaların uzunluk polimorfizmi) yöntemi istenilen DNA parçalarının genomdaki yerlerinin belirlenmesini sağladığı gibi bu parçaların nükleotid dizilerinin araştırılmasında da kullanılmaktadır. RFLP analizlerinin pahalı olması, fazla zaman ve işgücü gerektirmesi, çok miktarda (10-20 µg) ve yüksek kalitede DNA'ya gereksinim duyması ve çoğu durumlarda

radioaktif etiketleme yöntemi kullanılması bu markörün en önemli dezavantajlarıdır (Yıldırım ve Kandemir, 2001; Walton, 1993).

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ise, dizisi bilinen bir DNA bölgesinin *in vitro* olarak çoğaltılmasına ve DNA molekülünün çok sayıda kopyasını kısa zamanda yapmasına olanak sağlayan, uygulanabilirliği basit bir tekniktir (Birben, 2006; Özyayın, 2004; Yıldırım ve Kandemir, 2001).

PCR'a dayalı önemli metodlardan birisi olan RAPD-PCR metodu, tesadüfi bir dizilime sahip 10 bazlık primerleri kullanarak *in vitro* şartlarda enzimatik yollarla DNA'nın çoğaltılması esasına dayanır. RAPD tekniğinin avantajları arasında uygulanmasının kolaylığı, ucuz olması, az iş gücü gerektirmesi ve çabuk sonuç vermesi sayılabilir. Ayrıca, RFLP yönteminin tersine nanogram düzeyinde DNA'ya gereksinim duyulması ve polimorfizm oranının yüksek olması bu yöntemin bir diğer avantajıdır (Yıldırım ve Kandemir, 2001; McGregor ve diğ., 2000).

RAPD markörlerinde herhangi bir spesifik DNA dizin bilgisine ya da spesifik primerlerin sentezine ihtiyaç yoktur. Fragmentler, PCR yönteminde primer olarak kullanılan rastgele ve çok kısa DNA parçacıklarından çoğaltılmaktadırlar. Böylece çoğaltılan DNA'lar kullanılarak, organizmalarda DNA düzeyindeki farklılıklar belirlenebilmektedir. RAPD markörleri genetik haritalamada, bitki ve hayvan ıslahı uygulamalarında, populasyon genetiği çalışmalarında ve genetik farklılığı belirlemede kullanılmaktadır (Abbas ve diğ., 2008; Newbury ve Ford-Lloyd, 1993; Williams ve diğ., 1990).

RAPD tekniği, basit olmasının yanında çok sayıda bitki türünde uygulanabilmesi nedeni ile araştırmalarda yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Örneğin; buğday, soya, mısır, domates, şeker kamışı, muz ve patates, RAPD tekniğinin başarı ile kullanıldığı türlerden bazılarıdır (Abbas ve diğ., 2008; Khan, 2007; Yasmin ve diğ., 2006; Trabelsi ve diğ., 2005; Atak ve diğ., 2004; Isenegger ve diğ., 2003; Gübbük ve Pekmezci, 2001; McGregor ve diğ., 2000; Ochatt ve diğ., 1999;

Doldi ve diğ., 1997; Dweikat ve diğ., 1997; McDonald ve diğ., 1994; Deragon ve Landry, 1992).

3. MALZEME ve YÖNTEM

3.1. DENEY MATERYALİNİN ELDESİ

Çalışmamızda kullanılan patates (*Solanum tuberosum* L. cv. Marfona) tüberleri, Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Menemen, İzmir'den temin edildi.

3.1.1. Patates Sürgünlerinin Eldesi ve Yüzey Sterilizasyonu

Marfona patates (*Solanum tuberosum* L.) çeşidine ait tüberler, oda sıcaklığına sahip karanlık ortamda iki hafta bekletilerek tüber gözeneklerinden sürgünlerin çıkması ve gelişmesi sağlandı. İkinci haftanın sonunda tüberlerden çıkan sürgünlere steril ortamda yüzey sterilizasyonu uygulandı. Bunun için sürgünler, 2 dakika %70 etanolde bekletildikten sonra 10 dakika %5'lik sodyum hipoklorit solusyonuna bırakıldı ve ardından 3 kez steril distile su serisinden geçirilerek steril kurutma kağıdında kurutuldu. Yüzey sterilizasyonu uygulanan sürgünler, içerisinde 30 gr/l sakaroz içeren MS besiyerine (Tablo 3.1) ekildi ve 26°C' de, 16 saat ışık / 8 saat karanlık gün periyoduna sahip büyüme kabineye yerleştirildi. *In vitro* ortamda 10. günün sonunda MS besiyerinde gelişen sürgünlerden, çalışmamızda kullanacağımız nod eksplantları elde edildi (Sharabash, 2001).

3.2. PATATES DOKU KÜLTÜRLERİNİN KURULMASI

3.2.1. Rejenerasyon Besiyerlerinin Hazırlanması

Patates (*Solanum tuberosum* L. cv. Marfona) doku kültüründe rejenerasyonu teşvik etmek için çeşitli büyüme hormonları değişik konsantrasyonlarda MS besiyerine ilave edilerek üç farklı içerikte besiyeri hazırlandı (Tablo 3.2). Bunun için MS besiyerine karbon kaynağı olarak farklı konsantrasyonlarda sakkaroz eklenerek çözelti eritildi. Daha sonra eritilen besiyerine 10 g/l agar ilave edilerek, 1 atmosfer basınç,

121 °C’de 20 dakika otoklavda steril edildi. Steril edilen besiyeri soğuduktan sonra aseptik koşullar altında farklı konsantrasyonlarda bitki büyüme hormonları eklendi (Chang ve diğ., 2002; Yıldırım ve Tugay, 2002; Zobayed ve diğ., 2001; Arıcan, 2001; Anjum ve Villiers, 1997).

Tablo 3.1: Doku kültürleri için hazırlanan MS besiyerinin içeriği

İnorganik Tuzlar	mg/l
Ammonium nitrate	1650,0
Borik acid	6,2
Calcium chloride anhydrous	332,2
Cobalt chloride 6H ₂ O	0,025
Cubric sulfat 5H ₂ O	0,025
Sodium EDTA	37,26
Ferrous sulfat 7H ₂ O	27,8
Magnesium sulfat	180,7
Manganase sulfat H ₂ O	16,9
Molydic acid	0,25
Potassium iodide	0,83
Potassium nitrate	1900,0
Potassium phosphate monobasic	170,0
Zinc sulfat 7H ₂ O	8,6

Tablo 3.2: Patates doku kültüründe rejenerasyonu teşvik etmek için hazırlanan besiyerlerinde kullanılan büyüme hormonları ve şeker konsantrasyonları

Besiyeri No	Besiyeri	Büyüme Hormonları (mg / l)				Şeker (g / l)
		ZR	IAA	BAP	2,4 D	
1	MS	0,5	1,5			30
2	MS			5	0,5	80
3	MS					30

3.2.2. Nod Eksplantlarının Eldesi ve Kültür Ortamına Ekimi

In vitro ortamda yetiştirilen Marfona patates (*Solanum tuberosum* L.) sürgünlerinin nod bölgeleri aseptik koşullar altında steril pens ve bistüri yardımıyla 2-3 mm uzunluğunda kesilerek içerisinde daha önceden hazırlanmış farklı içerikteki MS besiyerleri bulunan kültür şişelerine ekildi ve 26°C' de, 16 saat ışık / 8 saat karanlık gün periyoduna sahip büyüme kabineye yerleştirilerek 28 gün boyunca gözlemleri yapıldı ve bu sürenin sonunda rejenerasyon yüzdesi en yüksek olan besiyeri, patates doku kültüründe kullanılacak rejenerasyon besiyeri olarak belirlendi.

3.3. *İN VİTRO* DOKU KÜLTÜRÜ ÇALIŞMALARI İÇİN OPTİMUM RADYASYON DOZUNUN BELİRLENMESİ

3.3.1. Doku Kültürlerinin Kurulması

Gama radyasyonunun patates doku kültürleri üzerindeki etkisinin belirlenmesi ve doku kültüründe somatik mutasyonların teşviki için uygulanacak optimum radyasyon dozlarının saptanması amacı ile Marfona patates çeşidine ait nod eksplantları 3.1.1 bölümünde anlatıldığı gibi elde edildi ve elde edilen nod eksplantları, rejenerasyon besiyerine 3.2.2' de anlatıldığı şekilde ekilerek nod kültürleri kuruldu.

3.3.2. Eksplantların Işınlanması ve M_1V_1 Generasyonunun Oluşturulması

Rejenerasyon besiyerine ekilen Marfona patates çeşidine ait nod eksplantlarından kurulan kültürlerle, M_1V_1 generasyonunu oluşturmak için İ.Ü. Çapa Tıp Fakültesi, Lösemili Çocuklar Vakfı Kan Işınlama Ünitesinde bulunan, aktivitesi 6.5 Gy / dk olan Sezyum-137 (Cs^{137}) radyasyon kaynağında 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 50 Gray (Gy) gama radyasyon dozları uygulandı (Gosal ve diğ., 2001; Saif-Ur-Rasheed ve diğ., 2001; Sharabash, 2001).

3.3.3. Işınlanmış Eksplantların Taze Besiyerine Aktarılması

M_1V_1 generasyonuna ait nod eksplantları, ışınlamadan hemen sonra steril ortamda içerisinde taze rejenerasyon besiyeri bulunan kültür şişelerine aktarılarak 26 °C'deki 16 saat ışık / 8 saat karanlık periyoduna sahip büyüme kabinine yerleştirildi ve 28 gün boyunca gelişimleri gözlemlendi. Ayrıca çalışmamızda kullanılan kontrol grupları da aynı koşullar altında ve aynı zamanda taze besiyerine aktarılarak büyüme kabinine yerleştirildi.

3.3.4. Kültür Ortamında Rejenere Olan Bitkilerin Boy Uzunluklarının, Yaprak Sayılarının ve Kök Oluşum Yüzdelerinin Saptanması

Kontrol ve farklı dozlarda gama radyasyonu ile ışınlanarak oluşturulan M_1V_1 generasyonuna ait nod eksplantlarından rejenere olan bitkilerin 28. günde yaprak sayıları ve kök oluşum yüzdeleri belirlendi. Aynı zamanda kültür ortamında rejenere olan bu bitkilerin steril ortamda boyları tek tek ölçülerek ortalama bitki boy uzunlukları hesaplandı.

3.3.5. Işınlanmış Bitkilerin Vejetatif Üretimi ile M_1V_2 ve M_1V_3 Generasyonlarının Oluşturulması

Marfona patates çeşidi M_1V_1 generasyonuna ait bitkilerden, 28.günün sonunda aseptik koşullarda nod eksplantları elde edilerek M_1V_2 generasyonu, yine aynı şekilde 28 günlük M_1V_2 generasyonuna ait bitkilerden de M_1V_3 generasyonu oluşturularak rejenerasyon besiyerine ekildi ve büyüme kabininde 28 gün boyunca gelişimleri gözlemlendi. Bu sürelerin sonunda M_1V_2 ve M_1V_3 generasyonlarında rejenere olan bitkilerin yaprak sayıları, kök oluşum yüzdeleri ve boy uzunlukları tespit edildi.

3.4. TUZ UYGULANMASI

3.4.1. Kullanılacak Tuz Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

Marfona patates çeşidine ait nod eksplantları, 0, 50, 100, 125, 150, 175 ve 200 mM NaCl içeren rejenerasyon besiyerine ekildi ve büyüme kabinine yerleştirildi. Kültürlerin, farklı konsantrasyonlarda tuz içeriğine sahip besiyerlerindeki rejenerasyonları 28 gün boyunca gözlemlendi. Bu sürenin sonunda kültür ortamında bitki rejenerasyon yüzdeleri dikkate alınarak, yapacağımız stres denemesinde kullanacağımız selektif besiyerleri belirlendi.

3.4.2. Selektif Besiyerinin Hazırlanması ve Kültürlerin Ekimi

Marfona Patates çeşidine ait nod eksplantlarının farklı tuz içerikli besiyerlerindeki rejenerasyon yüzdeleri göz önünde bulundurularak 50, 100, 125 mM tuz konsantrasyonu içeren selektif besiyerlerine, Marfona patates çeşidine ait M_1V_3 generasyonu nod eksplantları ekilerek büyüme kabinine yerleştirildi ve 28.gün sonunda rejenerasyon ve kök oluşum yüzdeleri saptandı.

3.5. MOLEKÜLER ANALİZLER

Çalışmamızda Marfona patates (*Solanum tuberosum* L.) çeşidine ait kontrol ve tuza toleranslı mutant bitkiler arasında oluşan DNA düzeyindeki farklılıklar, polimeraz zincir reaksiyonuna (PCR) dayanan RAPD (Rastgele Çoğaltılmış DNA farklılığı) tekniği kullanılarak gösterildi.

3.5.1. Deney Materyalinin Eldesi

Bitki büyüme kabininde yetiştirilen Marfona patates (*Solanum tuberosum* L.) çeşidi M₁V₃ generasyonuna ait 28 günlük kontrol ve mutant bitkilerin yaprak örnekleri tek tek alınarak tartıldı ve genomik DNA izolasyonunun yapılması için -70 °C'deki deep-freeze'de muhafaza edildi.

3.5.2. Genomik DNA izolasyonu

Bitkisel materyalden genomik DNA izolasyonu için Walbot (1988)'nin yöntemi, CTAB (setil three metil amonyum bromid) Sangwan ve diğ. (2000) yöntemi ve Fujifilm'e ait bitki DNA izolasyon kiti kullanıldı ve yapılan ön denemelerde en iyi sonucu veren QG - mini 80 (Fujifilm) marka genomik DNA izolasyon cihazı ve bu cihaza özel bitkisel DNA izolasyon kiti (QuickGene DNA tissue kit S) çalışmamızda genomik DNA izolasyonu için kullanıldı. Çalışmamızda, kontrol ve mutant bitkilere ait 100'er mg yaprak örnekleri soğuk havanda sıvı azot içerisinde ezilerek toz haline getirildi ve üzerine DNA izolasyon kitine ait 360µl t ezme tamponu ilave edilerek mikrotüplere aktarıldı. Tüplerin içerisine RNA'yı uzaklaştırmak için 10 mg/ml RNaz eklendi ve 55 °C'deki su banyosunda 1 saat bekletildi. Daha sonra tüplerin içerisine proteinleri çöktürmek için yine DNA izolasyon kitine ait 40 µl solüsyon ilave edildi ve 55 °C'deki su banyosunda 1 saat bekletildi. Bu işlemi takiben oda sıcaklığında 10 dakika 15000 devir/dakika'da santrifüjleme yapıldı ve karışımların üst sıvılarından 200 µl alınarak yeni tüplere aktarıldı. Üzerilerine 180 µl DNA izolasyon kitine ait lizis tamponu eklendi ve 15 sn vortekste karıştırılarak 70 °C'deki su banyosunda 10 dakika bırakıldı. Daha sonra 240 µl, % 99'luk etanol ilave edilerek tüpler tekrar

15 sn vortekste karıştırıldı. Karışımların bulunduğu tüpler genomik DNA izolasyon cihazına yerleştirilerek filtre edildi. Daha sonra DNA izolasyon kitine ait yıkama tamponundan üç kez geçirildi. Son aşama olarak tüplere yine DNA izolasyon kitine ait 200 µl çözme tamponu ilave edilerek filtre edildi. Elde edilen solüsyon yeni mikrotüplere aktarılarak genomik DNA izolasyonu tamamlandı.

3.5.3. Genomik DNA Analizi

3.5.3.1. Spektral Analiz

İzole edilen genomik DNA'nın miktar tayinlerinin yapılması için Tris-EDTA tamponu kullanılarak 1/200'lük sulandırımaların UV spektrofotometresinde (Biophotometer) 260 nm dalga boyundaki absorpsiyon değerlerine bakıldı ve çift zincirli DNA moleküllerinin konsantrasyonu aşağıdaki formül (Maniatis ve diğ., 1989) kullanılarak hesaplandı.

DNA miktarı ($\mu\text{g} / \text{ml}$) = $\text{OD}_{260} \times 50 \times \text{seyreltme katsayısı}$.

3.5.3.2. Elektroforetik Analiz

İzole edilen genomik DNA'lar % 0.8 Agaroz jel kullanılarak elektroforez yöntemi ile analiz edildi. 0.8 gr agaroz tartılıp 100 ml 1xTris-Borat tamponunda (Tablo 3.3) eritildi. 5 µl Etidium bromid (10 mg/ml) ilave edilerek jel elektroforez tankına döküldü. İzole edilen genomik DNA örneklerinden 20'şer µl, yükleme tamponundan (6x) 2'şer µl (Tablo 3.3) ile karıştırılarak jeldeki ceplere yüklendi. Örnekler jelde 1 saat süresince sabit 80 voltta yürütüldü. Daha sonra UV translüminatör ile DNA örnekleri görüntülenerek fotoğrafı çekildi.

Tablo 3.3: Agaroz jel elektroforezinde kullanılan tamponlar.

Tamponun İsmi	İçerdiği Maddeler	Konsantrasyon
Tris-Borat Tamponu (5x)	Tris Bazı	90 mM
	Borik Asit	90 mM
	EDTA, pH 8.2	2 mM
Elektroforez Yükleme Tamponu (6x)	Bromofenol mavisi	% 0.25
	Sukroz	% 40(w/v)

3.5.4. RAPD Analizinde Kullanılan Primerler ve Özellikleri

Çalışmamızda, % 60 GC oranına sahip, 10 baz uzunluğundaki Operon marka oligonükleotid primerler kullanılmıştır (Tablo 3.4). RAPD-PCR analizi için OPH serisine ait 10 primer, 0,4 µM konsantrasyonlarda reaksiyon karışımlarına eklenmiştir.

Tablo 3.4: RAPD analizinde kullanılan primerler, baz dizilişleri ve GC (%) oranları

Primer Kod	Primer İsmi	Primer Dizimi (5'.....3')	% GC Oranı
P11	OPH-11	CTTCCGCAGT	60
P12	OPH-12	ACGCGCATGT	60
P13	OPH-13	GACGCCACAC	60
P14	OPH-14	ACCAGGTTGG	60
P15	OPH-15	AATGGCGCAG	60
P16	OPH-16	TCTCAGCTGG	60
P17	OPH-17	CACTCTCCTC	60
P18	OPH-18	GAATCGGCCA	60
P19	OPH-19	CTGACCAGCC	60
P20	OPH-20	GTGATCGCAG	60

3.5.5. PCR Optimizasyonu ve Uygulanması

Genomik DNA izolasyonu yapıldıktan sonra DNA'ya uygun çoğaltma ve PCR döngü koşullarını belirlemek için ön denemeler yapıldı ve optimum reaksiyon koşulları tespit edildi (Tablo 3.5 ve 3.6). Bütün denemelerde reaksiyon karışımının toplam hacmi 50 µl olarak hazırlandı.

Tablo 3.5: PCR Karışımı

PCR Karışımı	Test Edilen Reaksiyon Koşulları	Elde Edilen Optimum Reaksiyon Koşulları
PCR Tamponu (10x) (μ l)	5	5
DNA Konsantrasyonu (ng)	10, 25, 50, 75	50
MgCl ₂ (mM)	1,1.5, 2, 2.5, 3	2.5
dNTP Karışımı (mM)	0.1, 0.15, 0.2	0.1
Primer Konsantrasyonu (μ M)	0.4	0.4
Taq DNA Polimeraz (U)	0.5, 0.75, 1	0.5

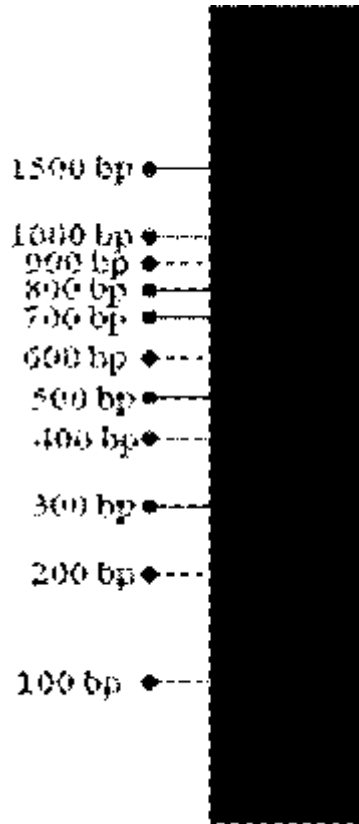
Tablo 3.6: PCR Döngü Koşulları

PCR Döngü Koşulları	Test Edilen Döngü Koşulları	Elde Edilen Optimum Döngü Koşulları
Ön Denatürasyon	94°C – 10 dk, 94°C -2 dk, 94°C- 1,5 dk, 94°C- 1 dk	94°C -2 dk
Denatürasyon	94°C -1 dk, 94°C- 1,5 dk, 94°C- 2 dk	94°C -1.5 dk
Primer Bağlanma	36°C-1 dk, 36°C-1.5 dk, 37°C-1.5 dk, 37°C-1 dk	36°C-1 dk,
Primer Uzama	72°C- 3dk, 72°C- 2dk,	72°C- 3 dk,
Son Uzama	72°C- 10 dk, 72°C- 7 dk, 72°C- 5 dk,	72°C- 7 dk,
Döngü Sayısı	35, 40	40

3.5.6. Agaroz Jel Elektrofrez ve Fotoğraflama

Çalışmamızda RAPD-PCR sonuçlarının jel elektrofrezinde gösterilip fotoğraflanabilmesi amacıyla 100 ml 1x TBE tamponuna, 1.7 gr agaroz ilave edildi ve kaynatılarak eritildi. Daha sonra oda sıcaklığında soğutulan 100 ml'lik agaroz jele, 6 µl etidyum bromüd eklenerek karıştırıldı ve jel tankına döküldü. PCR ürünlerini jelde yürütmek için 10 µl örnek ile 5 µl yükleme tamponu karıştırılarak jeldeki ceplere yüklendi. PCR ürünleri % 1.7'lik agaroz jel elektrofrezinde 90 Volt akım verilerek 2 saat yürütüldü. Yürütme tamamlandıktan sonra DNA bantları UV translimünatörü altında gözlenerek RAPD profilleri fotoğraflandı.

RAPD bantlarının büyüklüklerini belirlemek için 100-1500 baz çifti içeren 11 fragmentten oluşan 'Directload Wide Range' DNA markörü kullanılmıştır (Şekil 3.1). Amplifikasyon sonucu oluşan RAPD bantlarının büyüklükleri DNA markörlerindeki bantların büyüklükleri ile kıyaslanarak yapıldı.



Şekil 3.1: RAPD bant profillerini belirlemede kullanılan DNA markörü

3.5.7. RAPD Polimorfizmin Belirlenmesi

Çalışmamızda elde ettiğimiz kontrol ve mutant bitkilerin RAPD-PCR analizinde amplifike olan primerlerdeki RAPD bantlarına “1”, olmayanlara “0” sayısal değeri verildi ve bantların varlığı ve yokluğu göz önünde bulundurularak polimorfizm oranı belirlendi.

3.6. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

Marfona patates (*Solanum tuberosum* L.) çeşidine ait kontrol ve farklı dozlarda gama radyasyonu uygulanmış M_1V_1 , M_1V_2 ve M_1V_3 generasyonuna ait kültürlerde 28. gündeki büyüme parametrelerinden bitki boy uzunluğu ve yaprak sayısının istatistiksel değerlendirilmesi GraphPad Prism 4 istatistiksel programındaki tek yönlü ANOVA analizine göre yapıldı. İstatistiksel olarak anlamlı bulunan bitkilerin karşılaştırılmasında Student – Newman Keuls testi uygulandı (Zar, 1984).

Marfona patates (*Solanum tuberosum* L.) çeşidine ait kontrol ve tuza toleranslı mutant bitkilerin birbirlerine olan genetik mesafelerinin hesaplanması için bitkiler arasındaki genetik benzerlik ‘S’ olarak adlandırıldı ve $S = 2 \times N_{AB} / N_A + N_B$ (N_{AB} : A ve B bireylerinin ortak bant sayısı, N_A : A bireyinin toplam bant sayısı, N_B : B bireyinin toplam bant sayısı) formülünde yerine konuldu. Bitkilerin birbirlerine olan genetik uzaklıkları ise D olarak adlandırılıp $D = 1-S$ formülünde yerine konularak hesaplandı (Atak ve diğ., 2004; Babaoğlu ve diğ., 2004; Wolf ve Rijini, 1993).

Marfona patates (*Solanum tuberosum* L.) çeşidine ait kontrol ve tuza toleranslı mutant bitkilerin birbirlerine olan genetik mesafelerine göre dendrogramları, SPSS bilgisayar istatistik programındaki hiyerarşik kümeleme analiz yöntemi kullanılarak çizildi (Abbas ve diğ., 2008; Atak ve diğ., 2004; Babaoğlu ve diğ., 2004; Wolf ve Rijini, 1993).

4. BULGULAR

4.1. DOKU KÜLTÜRÜNDE REJENERASYON ÜZERİNE BESİYERİ İÇERİĞİNİN ETKİSİ

Patates doku kültüründe kullanılacak uygun rejenerasyon besiyerinin belirlenmesi amacı ile Marfona patates çeşidine ait nod eksplantları hazırlanan farklı içerikli MS besiyerlerine ekildi ve büyüme kabineye yerleştirildi. Eksplantların 28 gün boyunca kültürdeki gelişimleri gözlemlendi ve 28.günün sonunda bu bitkilere ait rejenerasyon yüzdeleri saptanarak Tablo 4.1’de gösterildi.

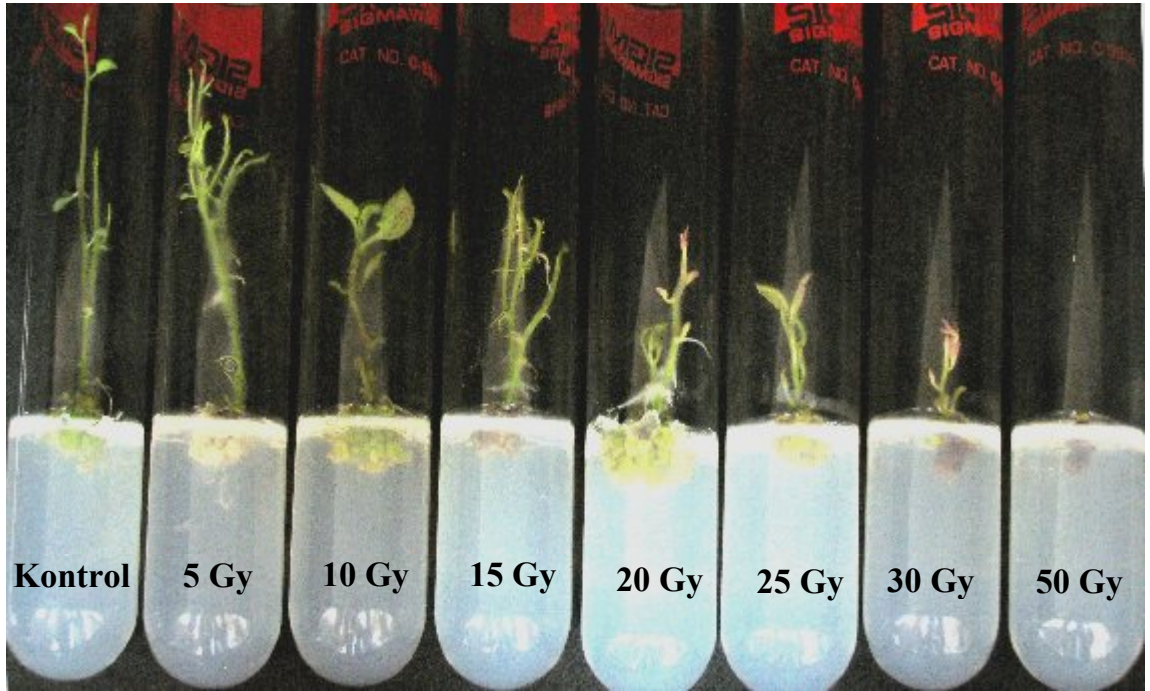
Tablo 4.1: Marfona patates (*Solanum tuberosum* L.) çeşidine ait nod eksplantlarından farklı içerikli MS besiyerlerinde kurulan 28 günlük kültürlerdeki eksplant sayısı, rejeneren bitki sayısı ve yüzdesi.

MS Besiyeri No	Eksplant Sayısı	Rejeneren bitki	
		Sayısı	%
1	40	37	93
2	40	26	65
3	40	19	48

Tablo 4.1’de görüldüğü gibi patates (*Solanum tuberosum* L. cv. Marfona) doku kültürü için en iyi rejenerasyon % 93 ile 1 nolu MS besiyerinde elde edilmiştir. Çalışmamızda elde edilen rejenerasyon sonuçlarına göre 0.5 mg/l Zeatin Ribosid ve 1.5 mg/l Indol Asetik Asit içerikli MS besiyeri (1 nolu MS), patates doku kültürü için en uygun rejenerasyon besiyeri olarak tespit edilmiştir.

4.2. DOKU KÜLTÜRLERİNE GAMA RADYASYONUNUN ETKİSİ

Çalışmamızda farklı radyasyon dozlarının patates doku kültürü üzerine etkisini ortaya koymak, ED₅₀ dozunu belirlemek ve patates doku kültürlerinde mutant bitkilerin eldesinin teşvik edilmesi amacıyla Marfona patates çeşidine ait nod eksplantları rejenerasyon besiyerine ekilerek, Sezyum-137 (Cs¹³⁷) kaynağında 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 ve 50 Gy gama radyasyonu ile ışınlandı ve M₁V₁ generasyonu elde edildi. Büyüme kabinine yerleştirilen M₁V₁ generasyonu nod eksplantlarının 28 gün boyunca gelişimleri gözlemlendi (Şekil 4.1). Bu sürenin sonunda rejenerasyon yüzdesi, ortalama bitki boyu, ortalama yaprak sayısı ve kök oluşum yüzdesi değerlendirilerek Tablo 4.2’de gösterildi.



Şekil 4.1: Marfona Patates (*Solanum tuberosum* L.) çeşidine ait kontrol ve ışınlanmış M₁V₁ generasyonu nod eksplantlarından kurulan 28 günlük kültürler

Tablo 4.2: Marfona patates (*Solanum tuberosum* L.) çeşidine ait M₁V₁ generasyonu nod eksplantlarından kurulan 28 günlük kültürlerdeki eksplant sayısı, rejenerasyon yüzdesi, ortalama bitki boyu, ortalama yaprak sayısı ve kök oluşum yüzdesi.

M ₁ V ₁ Deney Grupları	Eksplant sayısı	Rejenerasyon (%)	Ortalama Bitki Boyu (cm)	Ortalama Yaprak Sayısı	Kök Oluşumu (%)
Kontrol	40	93	4,61±0,27 a*	4,8±0,26 a	60
5 Gy	40	90	3,91±0,26 ab	5,3±0,35 a	53
10 Gy	40	83	3,43±0,28 b	4,7±0,38 a	47
15 Gy	40	73	3,05±0,32 bc	4,6±0,48 a	47
20 Gy	40	60	2,27±0,33 cd	2,6±0,35 b	37
25 Gy	50	50	1,95±0,3 d	2,53±0,38 bc	23
30 Gy	60	30	1,83±0,37 d	1,6±0,33 c	13
50 Gy	50	6,5	0,21±0,12 e	0,23±0,13 d	0

* Aynı harfle gösterilmeyenler, kontrol ve ışınlanmış deney gruplarının ortalama bitki boyu ve ortalama yaprak sayısı bakımından aralarındaki farkların, Student-Newman-Keuls Metodu testine göre en az 0.05 önemli olduğunu ifade etmektedir.

± Standart Hata

Tablo 4.2’de görüldüğü gibi Marfona patates çeşidine ait M₁V₁ generasyonu nod eksplantlarından kurulan kültürlerin 28. gündeki rejenerasyon yüzdesi değerlendirildiğinde uygulanan radyasyon dozunun artmasıyla rejenerasyon yüzdesinde belirgin bir düşüş meydana geldiği saptanmıştır. Çalışmamızın kontrol grubunda % 93 oranında bir rejenerasyon gerçekleştiği gözlenirken, 20 Gy gama radyasyonu uygulanan grupta % 60, 50 Gy gama radyasyonu uygulanan grupta ise % 6.5 oranında rejenerasyon gerçekleştiği gözlenmiştir.

Yine Tablo 4.2’de görüldüğü gibi 28. günde kontrol grubunda ortalama bitki boyu 4,61 cm iken, 15 Gy gama radyasyonu uygulanan deney grubunda ortalama bitki boyu 3,05 cm’dir. Ortalama bitki boyu değerlendirilerek yapılan istatistiksel analiz sonucu kontrol grubu ile 5 Gy’lik gama radyasyon dozu uygulanan deney grubu arasında oluşan

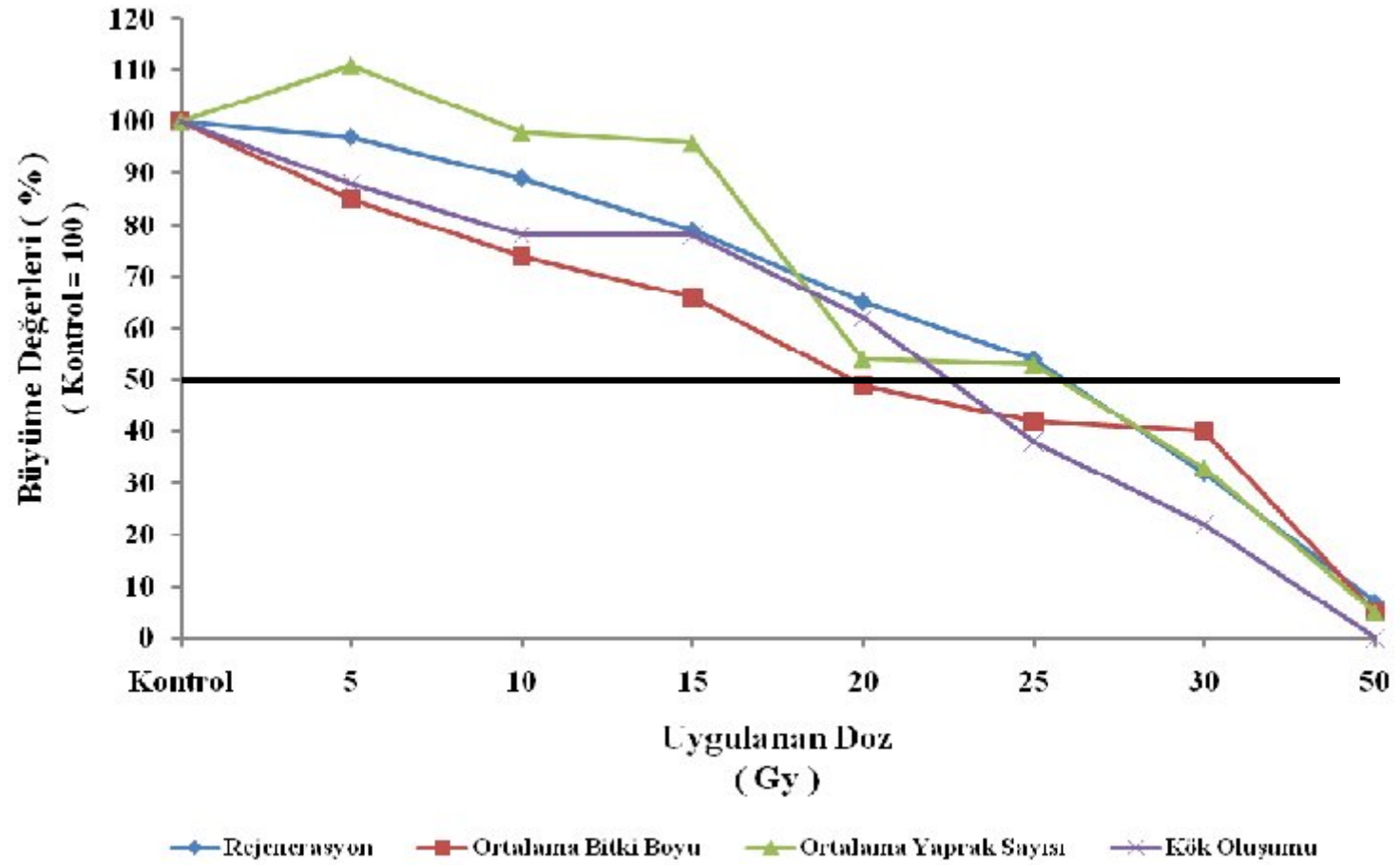
fark önemsiz ($P > 0.05$), ancak, kontrol ile diğer deney grupları arasında oluşan farkların önemli ($P < 0.05$) olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca çalışmamızda en yüksek doz olan 50 Gy gama radyasyonu uyguladığımız deney grubu ile diğer deney grupları arasındaki farkların önemli olduğu saptanmıştır ($P < 0.05$).

Bir başka büyüme parametresi olan ortalama yaprak sayısı, rejenere olan kültürlerde değerlendirildiğinde kontrol grubunda ortalama 4,8 yaprak saptanırken 5 Gy gama radyasyonu uygulanan deney grubunda ortalama 5,3 yaprak, 30 Gy gama radyasyonu uygulanan deney grubunda ise ortalama 1,6 yaprak saptanmıştır. Ortalama yaprak sayısı değerlendirilerek yapılan istatistiksel analiz sonucu kontrol grubu ile 5 Gy, 10 Gy ve 15 Gy gama radyasyon dozu uygulanan deney grupları arasında oluşan farkların önemsiz ($P > 0.05$), kontrol grubu ile 20 Gy, 25 Gy, 30 Gy ve 50 Gy gama radyasyon dozu uygulanan deney grupları arasında oluşan farkların ise önemli olduğu bulunmuştur ($P < 0.05$). Yine ortalama bitki boyu dikkate alınarak yapılan istatistiksel değerlendirmede olduğu gibi 50 Gy gama radyasyonu uyguladığımız deney grubunun, diğer deney grupları ile arasında oluşan farkların önemli olduğu saptanmıştır ($P < 0.05$).

Gama radyasyonu ile ışınlanmış olan 28 günlük kültürlerde köklenme yeteneği tespit edilmiştir. Marfona patates (*Solanum tuberosum* L.) çeşidine ait kontrol grubu bitkilerinde kök oluşum yüzdesi, % 60 değerine sahip iken 30 Gy gama radyasyonu uygulanan deney grubundaki bitkilerde kök oluşumunun % 13 değerine düşerek gama radyasyonunun artan dozlarından etkilendiği görülmektedir. Çalışmamızda en yüksek doz olan 50 Gy gama radyasyonu uygulanan deney grubunda ise kök oluşumunun gerçekleşmediği saptanmıştır.

Patates (*Solanum tuberosum* L.) doku kültüründe mutant bitkilerin elde edilmesi için uygulanacak radyasyon dozlarını belirlemek amacı ile gama radyasyonunun etkinliğini ortaya koymak için incelenen büyüme parametreleri değerlendirilerek gelişimi kontrole göre % 30 (ED₃₀) ve % 50 (ED₅₀) azaltan gama radyasyon dozları tespit edilmiştir (Şekil 4.2).

Şekil 4.2’de görüldüğü gibi rejenerasyon yüzdesini kontrole göre %30 azaltan doz 18 Gy, %50 azaltan doz 26 Gy olarak saptanırken, ortalama bitki boyunu kontrole göre %30 azaltan doz 15 Gy, %50 azaltan doz ise 20 Gy olarak saptanmıştır. Diğer büyüme parametrelerinden ortalama yaprak sayısı değerlendirildiğinde kontrole göre yaprak sayısını %30 azaltan doz 18 Gy, %50 azaltan doz 26 Gy, kök oluşum yüzdesi değerlendirildiğinde ise kontrole göre kök oluşumunun %30 azaltan doz 18 Gy, %50 azaltan doz ise 23 Gy olarak hesaplanmıştır. Elde edilen bu sonuçlar Marfona patates (*Solanum tuberosum* L.) çeşidi için optimum doz olarak kabul edilmiştir.

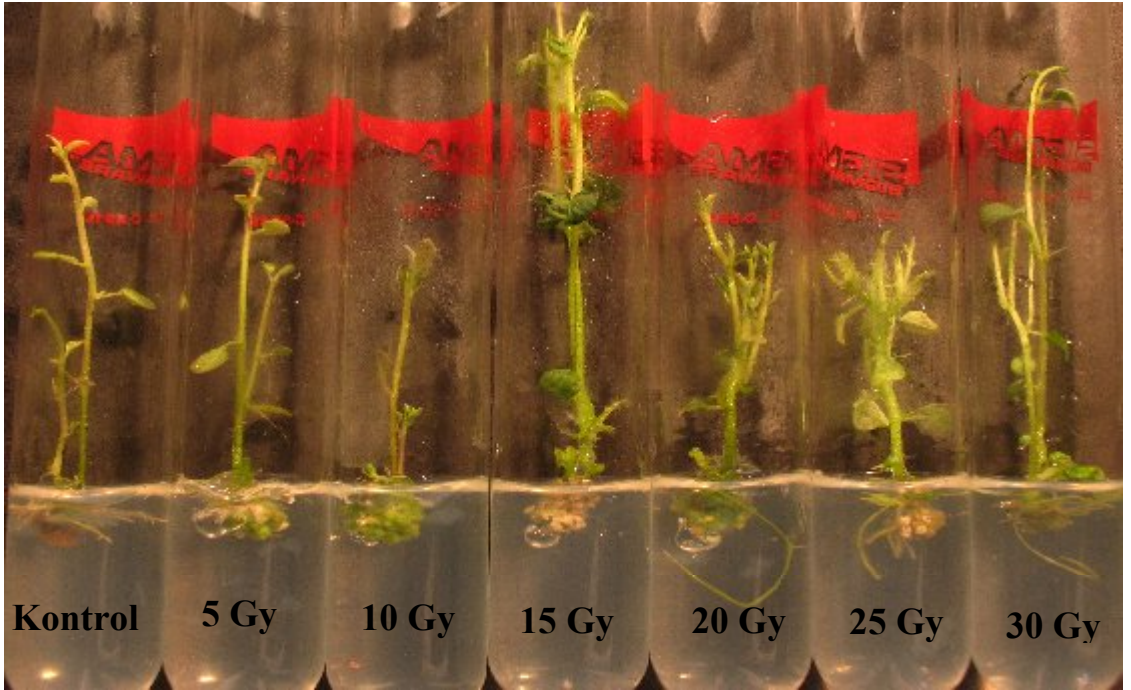


Şekil 4.2: Kontrol ve ışınlanmış Marfona patates çeşidine ait M₁V₁ generasyonu nod eksplantlarından kurulan kültürlerin 28. gününde, rejenerasyon yüzdesi, ortalama bitki boy uzunluğu yüzdesi, ortalama yaprak sayısı yüzdesi ve kök oluşum yüzdesine göre büyüme değerleri.

4.3. IŞINLANMIŞ BİTKİLERİN VEJETATİF ÜRETİMİ

4.3.1. M_1V_2 Generasyonu

Marfona patates çeşidine ait M_1V_1 generasyonlarındaki kültürlerden elde edilen M_1V_2 generasyonunda 28. günde (Şekil 4.3) rejenerasyon yüzdesi, ortalama bitki boyu, ortalama yaprak sayısı ve kök oluşum yüzdesi saptanarak Tablo 4.3'de gösterildi.



Şekil 4.3: Marfona patates (*Solanum tuberosum* L.) çeşidine ait M_1V_2 generasyonu nod eksplantlarından kurulan 28 günlük kültürler

Tablo 4.3: Marfona patates (*Solanum tuberosum* L.) çeşidine ait M₁V₂ generasyonu nod eksplantlarından kurulan 28 günlük kültürlerdeki eksplant sayısı, rejenerasyon yüzdesi, ortalama bitki boyu, ortalama yaprak sayısı ve kök oluşum yüzdesi.

M ₁ V ₂ Deneç Grupları	Eksplant sayısı	Rejenerasyon (%)	Ortalama Bitki Boyu (cm)	Ortalama Yaprak Sayısı	Kök Oluşumu (%)
Kontrol	40	100	5,77±0,17 ab*	6,4±0,26 ab	100
5 Gy	40	100	5,15±0,17 ac	5,8±0,35 a	90
10 Gy	30	86	3,64±0,31 d	4,3±0,38 c	77
15 Gy	30	100	7,27±0,27 e	5,9±0,48 ad	100
20 Gy	30	90	4,55±0,34 cd	7,3±0,35 b	90
25 Gy	40	83	4,24±0,27 d	6,2±0,38 ab	73
30 Gy	40	93	6,18±0,24 b	5,3±0,33 ac	90

* Aynı harfle gösterilmeyenler, kontrol ve ışınlanmış deneç gruplarının ortalama bitki boyu ve ortalama yaprak sayısı bakımından aralarındaki farkların, Student-Newman-Keuls Metodu testine göre en az 0.05 önemli olduğunu ifade etmektedir.
± Standart Hata

Yapılan gözlemler sonucu, uygulanan gama radyasyon dozlarının etkisiyle Marfona patates çeşidine ait M₁V₁ generasyonu deneç gruplarında meydana gelen fizyolojik zararlanmaların M₁V₂ generasyonunda ortadan kalktığı saptanmıştır. Ayrıca, M₁V₁ generasyonu ile karşılaştırıldığında M₁V₂ generasyonu deneç gruplarına ait büyüme parametrelerinin hepsinde olumlu yönde bir artış olduğu belirlenmiştir.

Tablo 4.3’de görüldüğü gibi kontrol, 5 Gy ve 15 Gy gama radyasyonu uygulanmış M₁V₂ generasyonu deneç gruplarındaki eksplantların tamamı rejenere olurken, 10 Gy, 20 Gy, 25 Gy ve 30 Gy gama radyasyonu uygulanmış M₁V₂ generasyonu deneç gruplarında ise rejenerasyon yüzdesi sırasıyla 86, 90, 83 ve 93 değerlerine ulaşmıştır.

Kültür ortamındaki bitkilerin boy uzunlukları değerlendirildiğinde, kontrol grubunda ortalama bitki boyu 5,77 cm.’ye yükselirken 15 Gy gama radyasyonu uygulanan M₁V₂ deneç grubunda ortalama bitki boyu 7,27 cm.’ye yükseldiği ve oluşan bu farkın

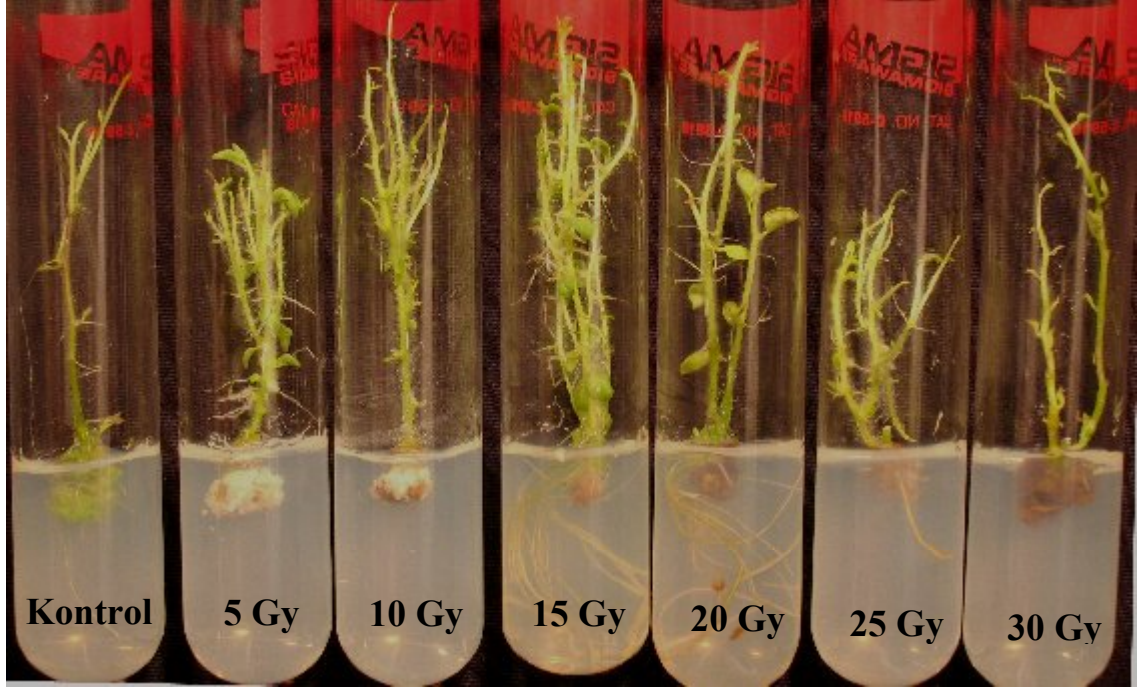
istatistiksel olarakta önemli olduğu ($P < 0.05$) ortaya konmuştur. Yine kontrol grubu ile 10 Gy, 20 Gy ve 25 Gy gama radyasyon dozu uygulanan deney grupları arasında oluşan farkın önemli olduğu ($P < 0.05$) fakat 10 Gy ile 20 Gy ve 25 Gy gama radyasyon dozu uygulanan deney grupları arasında oluşan farkların önemsiz olduğu saptanmıştır ($P > 0.05$). Ayrıca, 15 Gy gama radyasyonu uyguladığımız deney grubunun, diğer tüm deney grupları ile arasında oluşan farkların önemli olduğu tespit edilmiştir ($P < 0.05$).

M_1V_2 generasyonuna ait en fazla ortalama yaprak sayısının 7,3 ile 20 Gy'lik gama radyasyon dozu uygulanan deney grubunda olduğu görülmektedir. Fakat bu grup ile kontrol grubu ve 25 Gy gama radyasyonu uygulanan grup arasında ortalama yaprak sayısı bakımından oluşan farkların önemsiz olduğu ($P > 0.05$), diğer tüm deney grupları ile arasında oluşan farkların ise önemli olduğu tespit edilmiştir ($P < 0.05$). Yine ortalama yaprak sayısı değerlendirildiğinde 10 Gy gama radyasyon dozu uygulanan deney grubu hariç diğer tüm deney grupları ile kontrol grubu arasında oluşan farkların istatistiksel açıdan önemsiz olduğu saptanmıştır ($P > 0.05$).

Tablo 4.3'de görüldüğü gibi kontrol ve 15 Gy gama radyasyonu uygulanmış M_1V_2 generasyonu deney gruplarındaki bitkilerin tamamının köklenme yeteneği gösterdiği saptanırken, 5 Gy, 20 Gy ve 30 Gy gama radyasyonu uygulanmış M_1V_2 generasyonu deney grubundaki bitkilerde ise köklenme yeteneğinin % 90 değerine ulaştığı belirlenmiştir.

4.3.2. M_1V_3 Generasyonu

Patates (*Solanum tuberosum* L.) doku kültüründe 28 günlük M_1V_2 generasyonuna ait rejenerantlardan M_1V_3 generasyonu oluşturuldu ve büyüme kabine yerleştirilerek 28 gün boyunca gelişimleri gözlemlendi (Şekil 4.4). Kültür süresinin sonunda, M_1V_3 generasyonuna ait bitkilerin rejenerasyon yüzdesi, ortalama bitki boyu, ortalama yaprak sayısı ve kök oluşum yüzdesi saptanarak Tablo 4.4'de gösterildi.



Şekil 4.4: Marfona patates (*Solanum tuberosum* L.) çeşidine ait M₁V₃ generasyonu nod eksplantlarından kurulan 28 günlük kültürler

Tablo 4.4: Marfona patates (*Solanum tuberosum* L.) çeşidine ait M₁V₃ generasyonu nod eksplantlarından kurulan 28 günlük kültürlerdeki eksplant sayısı, rejenerasyon yüzdesi, ortalama bitki boyu, ortalama yaprak sayısı ve kök oluşum yüzdesi.

M ₁ V ₃ Deneç Grupları	Eksplant sayısı	Rejenerasyon (%)	Ortalama Bitki Boyu (cm)	Ortalama Yaprak Sayısı	Kök Oluşumu (%)
Kontrol	40	100	4,66±0,1 a*	6,1±0,2 a	100
5 Gy	40	100	3,73±0,12 b	7,8±0,2 b	100
10 Gy	30	100	5,28±0,15 a	9,3±0,37 b	100
15 Gy	40	100	5,2±0,1 a	12,8±0,43 c	100
20 Gy	40	100	4,93±0,13 a	8,6±0,32 b	100
25 Gy	30	63	3,11±0,45 c	6,2±0,91 a	50
30 Gy	40	98	4,72±0,16 a	8,3±0,24 b	93

* Aynı harfle gösterilmeyenler, kontrol ve ışınlanmış deneç gruplarının ortalama bitki boyu ve ortalama yaprak sayısı bakımından aralarındaki farkların, Student-Newman-Keuls Metodu testine göre en az 0.05 önemli olduğunu ifade etmektedir.

± Standart Hata

Tablo 4.4' de görüldüğü gibi Marfona patates çeşidine ait M₁V₃ generasyonu nod eksplantlarından kurulan kültürlerde kontrol, 5 Gy, 10 Gy, 15 Gy ve 20 Gy gama radyasyonu uygulanmış deney gruplarındaki eksplantların tamamında rejenerasyon gözlenirken, 30 Gy gama radyasyonu uygulanmış deney grubunda % 98 oranında, 25 Gy gama radyasyonu uygulanmış deney grubunda ise % 63 oranında rejenerasyon sağlanmıştır.

Marfona patates çeşidine ait 28 günlük M₁V₃ deney gruplarında bulunan bitkilerin ortalama boyları değerlendirilerek yapılan istatistik analizde kontrol grubu ile 10 Gy, 15 Gy, 20 Gy ve 30 Gy gama radyasyonu uygulanan deney grupları arasında oluşan farkların önemsiz olduğu (P> 0.05), 5 Gy ve 25 Gy gama radyasyon dozu uygulanan deney grupları ile arasında oluşan farkların ise önemli olduğu saptanmıştır (P< 0.05).

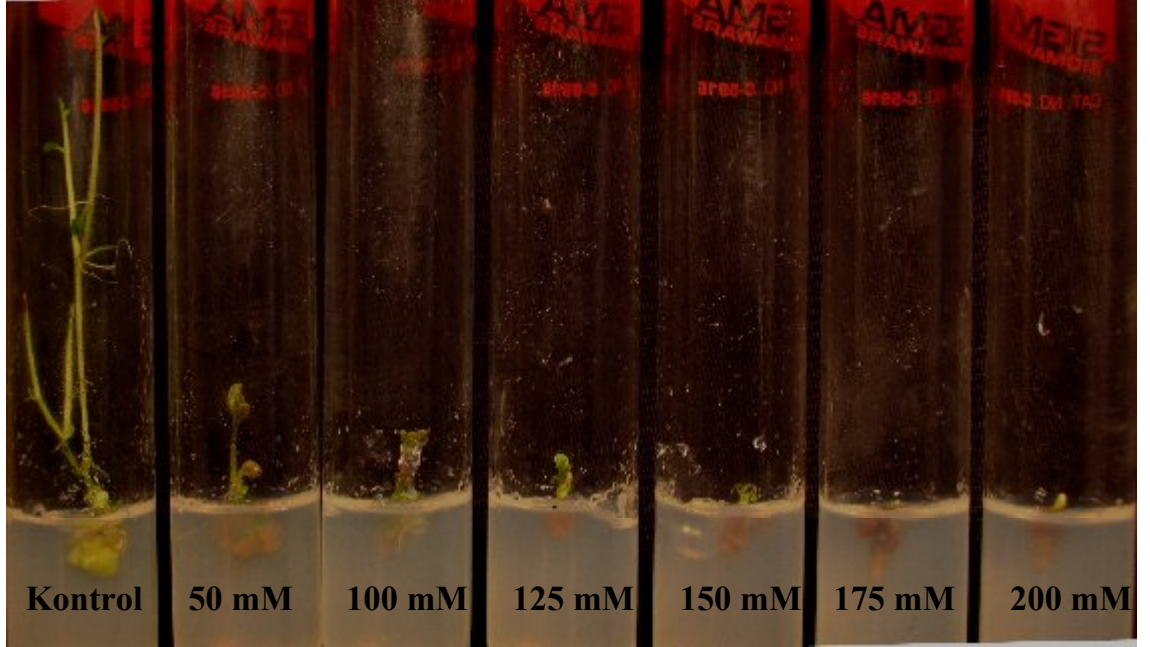
M₁V₃ generasyonuna ait en fazla ortalama yaprak sayısının 12,8 ile 15 Gy gama radyasyon dozu uygulanan deney grubunda olduğu saptanmış ve bu grup ile diğer bütün deney grupları arasında oluşan farkın önemli olduğu yapılan istatistiksel değerlendirme sonucu belirlenmiştir (P< 0.05). Kontrol grubu ile 5 Gy, 10 Gy, 20 Gy ve 30 Gy gama radyasyon dozu uygulanan deney grupları arasında oluşan farkların önemli olduğu (P< 0.05) fakat 25 Gy gama radyasyonu uygulanan deney grubu ile kontrol grubu arasında oluşan farkın ise önemsiz olduğu (P> 0.05) saptanmıştır.

Kontrol, 5 Gy, 10 Gy, 15 Gy ve 20 Gy gama radyasyonu uygulanmış M₁V₃ generasyonu deney gruplarının tamamında kök oluşumu gözlenirken 30 Gy gama radyasyonu uygulanmış deney grubunda % 93 oranında, 25 Gy gama radyasyonu uygulanmış deney grubunda ise % 50 oranında kök oluşumu tespit edilmiştir. Özellikle 15 ve 20 Gy gama radyasyonu uygulanmış deney gruplarında köklenme yeteneğinin diğer gruplara göre çok daha iyi olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.4).

4.4. DOKU KÜLTÜRÜNE TUZ STRESİNİN ETKİSİ

Patates doku kültüründe gelişen bitkilerin tuza duyarlılıklarını ortaya koymak amacıyla Marfona patates çeşidine ait nod eksplantları, 0, 50, 100, 125, 150, 175 ve 200 mM NaCl ilave edilerek hazırlanan rejenerasyon besiyerine ekildi. Kültürler, 26 °C'deki

16 saat ışık / 8 saat karanlık gün periyoduna sahip büyüme kabine yerleştirilerek 28 gün boyunca gelişimleri gözlemlendi (Şekil 4.5) ve 28.gün sonunda rejenerasyon yüzdeleri saptanarak Tablo 4.5’de gösterildi.



Şekil 4.5: Marfona patates çeşidine ait nod eksplantlarının 28. günde değişik konsantrasyonlarda tuz içeren selektif besiyerindeki görünümleri

Tablo 4.5: Marfona patates çeşidine ait nod eksplantlarının 28. günde farklı konsantrasyonlarda tuz içeren selektif besiyerindeki rejenerasyon yüzdeleri.

Deney Grupları (mM)	Eksplant Sayısı	% Rejenerasyon
Kontrol	40	93
50	40	63
100	40	33
125	40	20
150	40	10
175	40	0
200	40	0

Kültürlerde, tuz konsantrasyonuna bağlı olarak rejenerasyon yüzdelerinde bir azalış meydana geldiği ve 28. günde kontrol grubu eksplantlarında % 93 oranında rejenerasyon gözlenirken, 125 mM tuz konsantrasyonuna sahip deney grubundaki eksplantlarda bu oranın % 20'lere düştüğü ve 150 mM'den yüksek tuz konsantrasyonuna sahip kültürlerde ise rejenerasyonun gerçekleşmediği görülmektedir. Bu sonuçlara göre çalışmamızın amacına uygun olarak yüksek tuz konsantrasyonunda rejenerasyon olan bitkileri tespit edebilmek için 50, 100 ve 125 mM tuz konsantrasyonu içeren ortamlar, selektif besiyeri olarak belirlenmiştir.

4.4.1. Selektif Besiyerinde Somatik Mutantların Eldesi

Tuza toleranslı mutant bitkilerin tespiti amacıyla M₁V₃ generasyonu nod eksplantları, 50, 100, 125 mM tuz konsantrasyonuna sahip selektif besiyerine ekildi. Kültürlerin 28. günde rejenerasyon ve kök oluşum yüzdeleri saptanarak Tablo 4.6'da gösterildi.

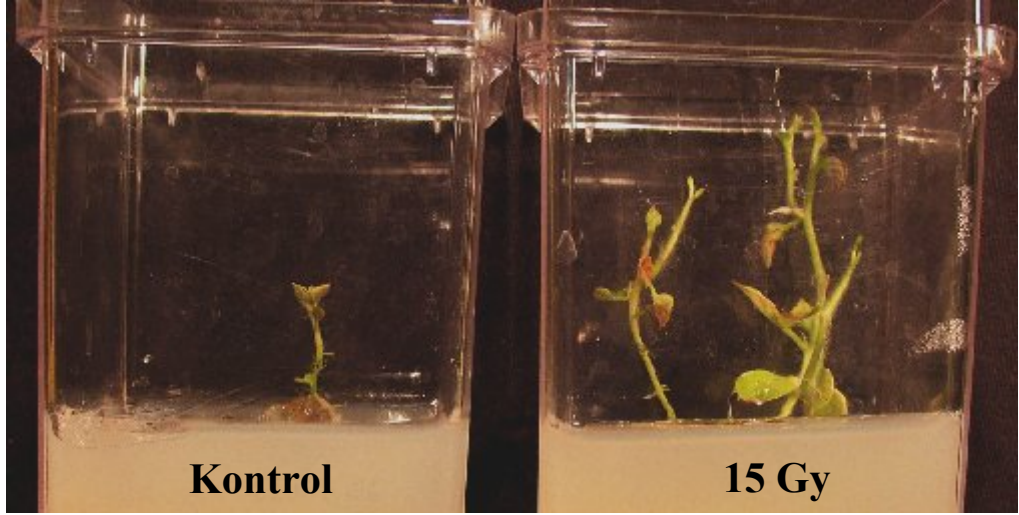
Tablo 4.6: Marfona patates (*Solanum tuberosum* L.) çeşidine ait M₁V₃ generasyonu nod eksplantlarının 50, 100, 125 mM tuz konsantrasyonuna sahip selektif besiyerinde 28.gün sonunda rejenerasyon yüzdesi ve kök oluşum yüzdesi

Deney Grupları	Eksplant sayısı			Rejenerasyon (%)			Kök oluşumu (%)		
	50mM	100mM	125mM	50mM	100mM	125mM	50mM	100mM	125mM
Kontrol	40	40	40	55	38	23	20	13	0
5 Gy	40	40	40	50	33	20	15	7	0
10 Gy	30	30	30	53	35	20	18	10	0
15 Gy	40	40	40	75	63	43	75	33	30
20 Gy	40	40	40	60	58	48	50	44	39
25 Gy	30	30	30	42	30	17	10	0	0
30 Gy	40	40	40	58	43	38	42	17	17

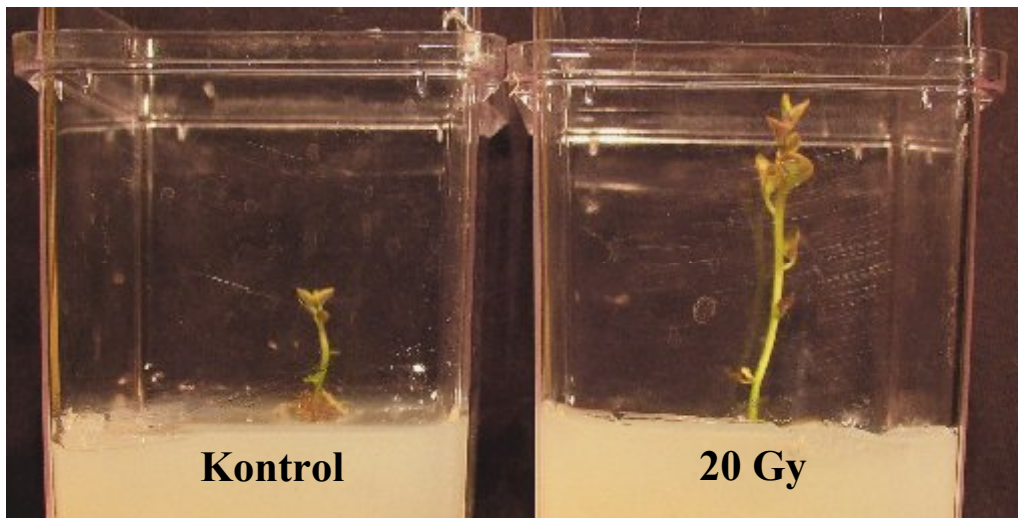
Tablo 4.6’da görüldüğü gibi M_1V_3 generasyonuna ait kontrol bitkisinin 50 mM tuz içeren selektif besiyerindeki rejenerasyon yüzdesi 55 iken, 15 Gy, 20 Gy ve 30 Gy gama radyasyonu uygulanan gruplarda bu değerler sırasıyla % 75, % 60 ve % 58’ e yükselmiştir. Deney gruplarının, 100 mM tuz içeren selektif besiyerindeki rejenerasyon yüzdeleri değerlendirildiğinde kontrol grubunda % 38 oranında rejenerasyon tespit edilirken, bu oran 15 Gy, 20 Gy ve 30 Gy gama radyasyonu uygulanan gruplarda sırasıyla % 63, % 58 ve % 43 değerinde tespit edilmiştir. Çalışmamızda uygulanan en yüksek tuz konsantrasyonu olan 125 mM tuz konsantrasyonuna sahip selektif besiyerinde kontrol grubu eksplantlarının rejenerasyonu % 23 oranında saptanırken, 20 Gy gama radyasyonu uygulanan grupta % 48 değerine ulaşmıştır. 15 Gy ve 30 Gy gama radyasyonu uygulanan gruplarda ise sırasıyla % 43 ve % 38 oranlarında saptanmıştır. Ayrıca tüm selektif besiyerlerinde, 5 Gy, 10 Gy ve 25 Gy gama radyasyonu uygulanan gruplarındaki rejenerasyon yüzdelerinin, kontrol grubunda oluşan rejenerasyon yüzdesinden daha düşük yüzdeye sahip olduğu belirlenmiştir.

Diğer büyüme parametresi kök oluşum yüzdesi değerlendirildiğinde M_1V_3 generasyonuna ait kontrol bitkilerinin, 50 mM tuz içeren selektif besiyerindeki kök oluşumu % 20 değerlerine sahip iken, 15 Gy, 20 Gy ve 30 Gy gama radyasyon uygulanan gruplardaki bitkilerde bu değerlerin belirgin bir şekilde artarak sırasıyla % 75, % 50 ve % 42 değerlerine ulaştığı saptanmıştır. Ayrıca, diğer deney gruplarındaki kök oluşum yüzdelerinin, kontrol grubundaki kök oluşum yüzdesinden daha düşük değerlere sahip olduğu tespit edilmiştir. Kültürlerin, 100 mM tuz içeren selektif besiyerindeki köklenme yeteneği değerlendirildiğinde ise kontrol grubunda % 13 oranında kök oluşumu gözlenirken, 20 Gy gama radyasyonu uygulanan grupta % 44 oranında, 15 Gy ve 30 Gy gama radyasyonu uygulanan gruplarda ise sırasıyla % 33 ve % 17 oranlarında kök oluşumu gözlenmiştir. 5 Gy ve 10 Gy gama radyasyonu uygulanan gruplarda ise sırasıyla % 7 ve % 10 oranlarında kök oluşumu gözlenirken, 25 Gy gama radyasyonu uygulanan grupta kök oluşumu gözlenmemiştir. 125 mM tuz içeren selektif besiyerinde rejenere olan kontrol grubu ile 5 Gy, 10 Gy ve 25 Gy gama radyasyonu uygulanan gruplarda kök oluşumu gözlenmezken, 15 Gy, 20 Gy ve 30 Gy gama radyasyonu uygulanan gruplarda sırasıyla % 30, % 39 ve % 17 oranında kök oluşumu gerçekleşmiştir.

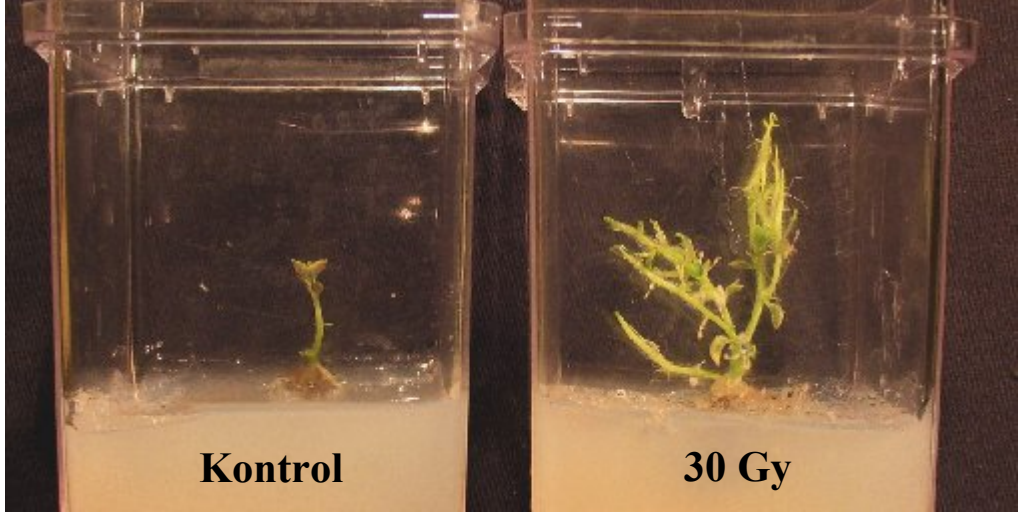
Çalışmamızda 50, 100 ve 125 mM tuz konsantrasyonu içeren selektif besiyerinde kontrol grubuna göre daha iyi gelişme gösteren, 15 Gy, 20 Gy ve 30 Gy gama radyasyonu uygulanan bitkiler saptanarak, tuza toleranslı mutant bitkiler olarak kabul edilmiştir (Şekil 4.6-10).



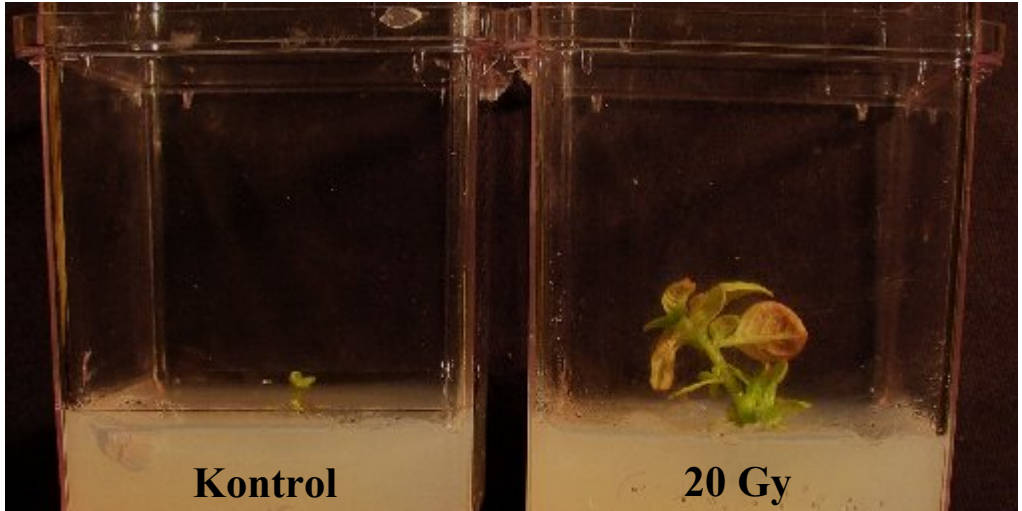
Şekil 4.6: Kontrol ve 15 Gy gama radyasyon dozuna maruz bırakılmış Marfona patates (*Solanum tuberosum* L.) çeşidine ait M_1V_3 generasyonu nod eksplantlarının 28.gün sonunda 50 mM tuz konsantrasyonuna sahip selektif besiyerindeki görünümü



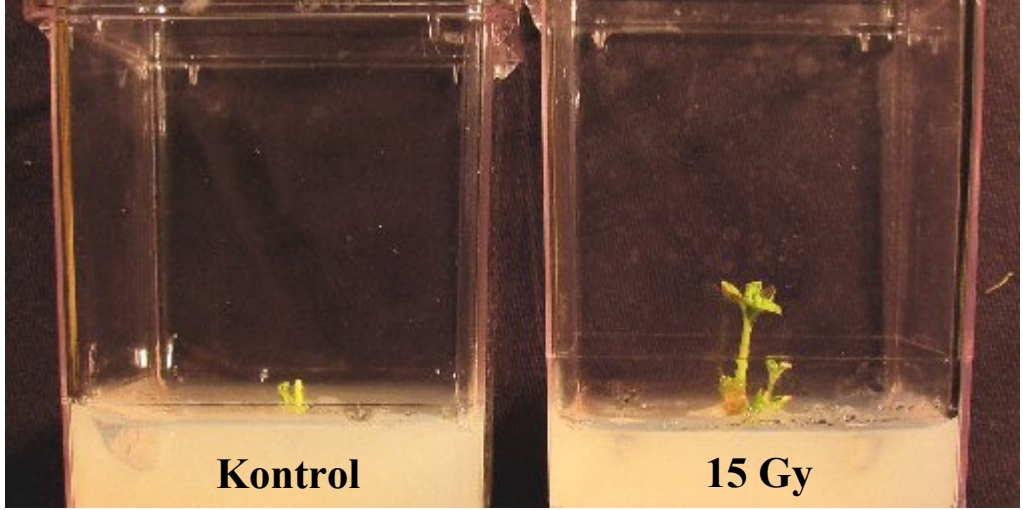
Şekil 4.7: Kontrol ve 20 Gy gama radyasyon dozuna maruz bırakılmış Marfona patates (*Solanum tuberosum* L.) çeşidine ait M_1V_3 generasyonu nod eksplantlarının 28.gün sonunda 50 mM tuz konsantrasyonuna sahip selektif besiyerindeki görünümü



Şekil 4.8: Kontrol ve 30 Gy gama radyasyon dozuna maruz bırakılmış Marfona patates (*Solanum tuberosum* L.) çeşidine ait M₁V₃ generasyonu nod eksplantlarının 28.gün sonunda 50 mM tuz konsantrasyonuna sahip selektif besiyerindeki görünümü



Şekil 4.9: Kontrol ve 20 Gy gama radyasyon dozuna maruz bırakılmış Marfona patates (*Solanum tuberosum* L.) çeşidine ait M₁V₃ generasyonu nod eksplantlarının 28.gün sonunda 100 mM tuz konsantrasyonuna sahip selektif besiyerindeki görünümü



Şekil4.10: Kontrol ve 15 Gy gama radyasyon dozuna maruz bırakılmış Marfona patates (*Solanum tuberosum* L.) çeşidine ait M_1V_3 generasyonu nod eksplantlarının 28.gün sonunda 125 mM tuz konsantrasyonuna sahip selektif besiyerindeki görünümü

4.4.2. Tuz Stresine Toleranslı Bitki Yüzdesinin Belirlenmesi

Çalışmamızda 50, 100 ve 125 mM tuz konsantrasyonları içeren selektif besiyerlerine ekilen M_1V_3 generasyonundaki Marfona patates çeşitlerine ait kontrol ve ışınlanmış eksplant sayılarının deney gruplarına göre dağılımı göz önünde bulundurularak seçilen tuza toleranslı bitki yüzdesi belirlenerek Tablo 4.7’de gösterildi.

Tablo 4.7: Selektif besiyerine ekilen M_1V_3 generasyonundaki Marfona patates çeşidine ait kontrol ve ışınlanmış eksplantların sayısının deney gruplarına göre dağılımı ve elde edilen tuza toleranslı bitki yüzdesi

Deney Grupları	M_1V_3			Tuza toleranslı bitki (%)
	Uygulanan Tuz Konsantrasyonu			
	50 mM	100 mM	125 mM	
Kontrol	40	40	40	0
5 Gy	40	40	40	0
10 Gy	30	30	30	0
15 Gy	40	40	40	17
20 Gy	40	40	40	14
25 Gy	30	30	30	0
30 Gy	40	40	40	12

Tablo 4.7’de görüldüğü gibi Marfona patates çeşidine ait 15 Gy gama radyasyonu uygulanan M_1V_3 generasyonu deney grubunda % 17 oranında tuza toleranslı bitki gelişirken, 20 ve 30 Gy gama radyasyonu uygulanan gruplarda sırasıyla % 14 ve % 12 oranında tuza toleranslı bitki saptanmıştır.

Çalışmamızda selektif besiyerinde gelişim gösteren Marfona patates (*Solanum tuberosum* L.) çeşidine ait mutant bitkiler ile kontrol grubu arasında oluşan genetik farklılıkların belirlenmesi amacıyla 50 mM tuz konsantrasyonu içeren besiyerinde gelişen en iyi 6 bitki, 100 mM tuz konsantrasyonu içeren besiyerinde gelişen en iyi 8 bitki ve 125mM tuz konsantrasyonu içeren besiyerinde gelişen en iyi 5 bitki olmak üzere toplam 19 mutant bitki (Tablo 4.8) seçilmiş ve kontrol ile beraber toplam 20 bitki arasındaki farklılıklar moleküler düzeyde ortaya konmuştur.

Tablo 4.8: Marfona patates (*Solanum tuberosum* L.) çeşidine ait seçilen 19 tuza toleranslı mutant bitki ve bu bitkilere uygulanan gama radyasyon dozları ile tuz (NaCl) konsantrasyonları.

Mutant Bitki No	Uygulanan Gama Radyasyon Dozu (Gy)	Uygulanan Tuz Konsantrasyonu (mM)
1	15	125
2	15	125
3	20	125
4	20	125
5	30	125
6	15	100
7	15	100
8	15	100
9	20	100
10	20	100
11	30	100
12	15	50
13	15	50
14	15	50
15	20	50
16	20	50
17	30	50
18	15	100
19	30	100

4.5. RAPD-PCR YÖNTEMİYLE GENETİK FARKLILIKLARIN BELİRLENMESİ

Gama radyasyonunun etkisiyle Marfona patates (*Solanum tuberosum* L.) çeşidine ait kontrol ve tuza toleranslı mutant bitkiler arasında oluşan farklılıkların DNA düzeyinde belirlenmesi amacıyla polimeraz zincir reaksiyonuna (PCR) dayanan moleküler markör tekniklerinden biri olan RAPD (Rastgele Çoğaltılmış DNA farklılığı) tekniği kullanıldı.

4.5.1. Genomik DNA İzolasyonu ve Analizi

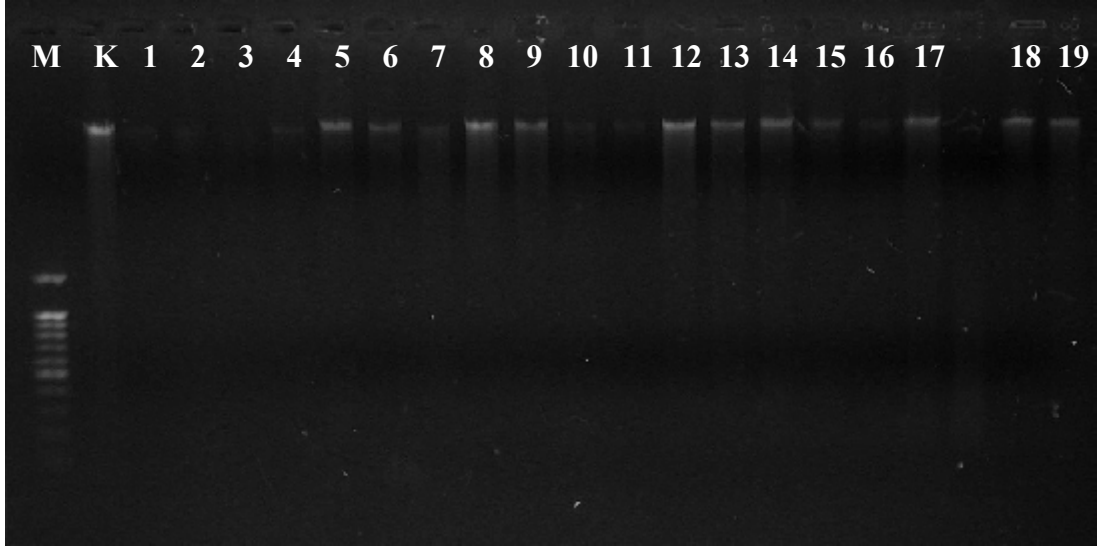
Çalışmamızda, Bölüm 3.5.2’de anlatılan ve en iyi sonuç aldığımız yöntem kullanılarak genomik DNA izolasyonu yapıldı ve Marfona patates (*Solanum tuberosum* L.) çeşidine ait kontrol ve tuza toleranslı bitkilerin genomik DNA analizleri spektral ve elektroforetik yöntemler kullanılarak ortaya konuldu.

4.5.1.1. Spektral Analiz

İzole edilen genomik DNA’nın miktar tayinleri Tris-EDTA tamponu kullanılarak 1/200’lük sulandırımın UV spektrofotometresinde 260 nm dalga boyundaki absorpsiyon değerlerine bakılarak belirlendi ve çift zincirli DNA moleküllerinin konsantrasyonu, $DNA\ miktarı = OD_{260} \times 50 \times \text{seyreltme katsayısı}$, formülü kullanılarak hesaplandı. Yapılan hesaplama sonucunda Marfona patates (*Solanum tuberosum* L.) çeşidine ait kontrol ve tuza toleranslı bitkilerden izole edilen genomik DNA miktarları μl ‘de 40-70 ng arasında tespit edildi.

4.5.1.2. Elektroforetik Analiz

İzole edilen genomik DNA’lar % 0.8 Agaroz jel kullanılarak elektroforez yöntemi ile analiz edildi. UV ışığı altında Ethidium Bromide (EtBr) boyasının kullanımı ile DNA molekülünün jel üzerinde yürütülmesi sağlandı. Kontrol ve tuza toleranslı bitkilere ait genomik DNA’lar, UV traslüminatör ile görüntülenerek fotoğraflandı (Şekil 4.11).



Şekil 4.11: Marfona patates (*Solanum tuberosum* L.) çeşidine ait kontrol ve tuza toleranslı mutant (1–19) bitkilerin UV translimülatörde görünümü (M: Markör K: Kontrol 1-19: Numaralandırılmış tuza toleranslı mutant bitkiler)

4.5.2. Genomik DNA Amplifikasyonu

Bölüm 3.5.5’de anlatıldığı gibi elde edilen optimum PCR karışımı ve döngü koşulları, RAPD-PCR analiz yönteminde uygulanarak kontrol ve tuza toleranslı mutant bitkilerin genomik DNA amplifikasyonları gerçekleştirildi.

4.5.3. Amplifiye Olmuş Ürünlerin Saptanması

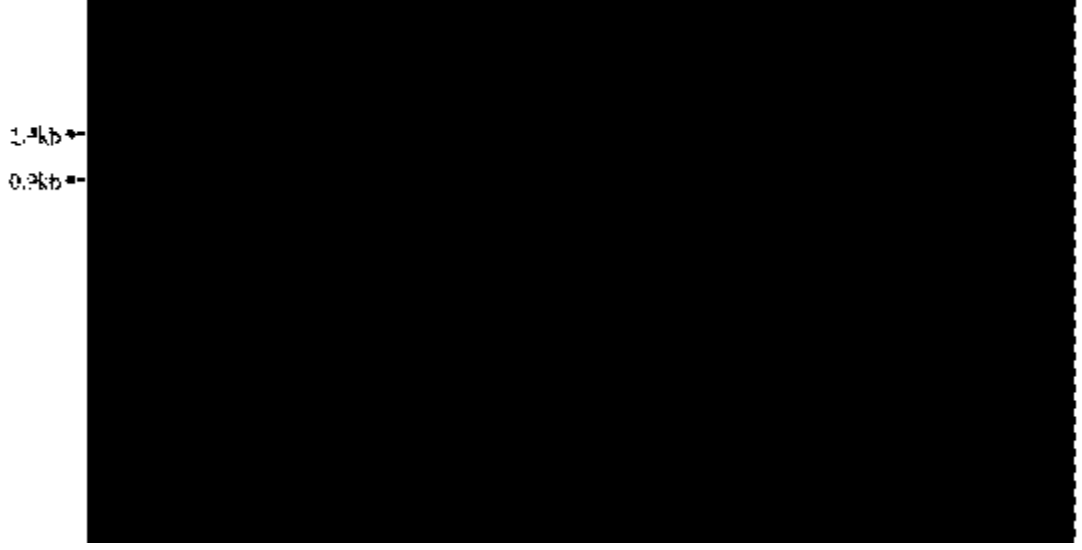
RAPD-PCR analizinde kullandığımız primerlere ait çoğaltma ürünleri % 1.7’ lik agaroz jel elektroforezinde 1x TBE tampon çözeltisi içerisinde 90 V’da yaklaşık 2 saat yürütülerek etidium bromid (10 mg/ml) ile UV ışığında görünür hale getirilerek fotoğraflandı (Şekil 4.12-17).



Şekil 4.12: OPH-12 primerine ait amplifikasyonun agaroz jel elektroforezindeki görünümü



Şekil 4.13: OPH-13 primerine ait amplifikasyonun agaroz jel elektroforezindeki görünümü



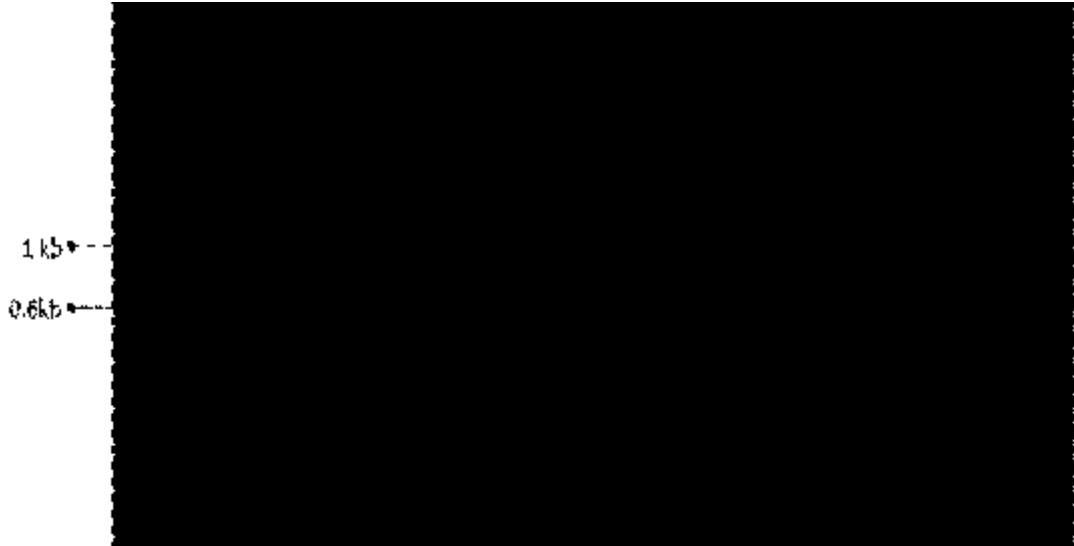
Şekil 4.14: OPH-14 primerine ait amplifikasyonun agaroz jel elektroforezindeki görünümü



Şekil 4.15: OPH-16 primerine ait amplifikasyonun agaroz jel elektroforezindeki görünümü



Şekil 4.16: OPH-17 primerine ait amplifikasyonun agaroz jel elektroforezindeki görünümü



Şekil 4.17: OPH-19 primerine ait amplifikasyonun agaroz jel elektroforezindeki görünümü

4.5.4. Primerlere ait Amplifikasyon Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Çalışmamızda RAPD bantlarının büyüklüklerini belirlemek için 100 ile 1500 baz çifti arasında 11 fragment içeren DNA markörü kullanılmıştır. Primerlere ait amplifikasyon sonuçları, oluşan RAPD bantlarının büyüklüklerinin, DNA marköründeki bantların büyüklükleri ile kıyaslanarak değerlendirilmiştir.

Çalışmamızdaki primerlere ait amplifikasyon sonuçları RAPD bantlarının agaroz jel elektroforezinde görüntülenmesi ile elde edildi. Bu sonuçlara göre RAPD-PCR analizinde kullandığımız OPH-11, OPH-15, OPH-18 ve OPH-20 primerlerinde herhangi bir amplifikasyon gözlenmezken, OPH-12, OPH-13, OPH-14, OPH-16, OPH-17 ve OPH-19 primerlerinde amplifikasyon gözlenerek, Tablo 4.9 ve Tablo 4.10'da gösterilmiştir.

Tablo 4.9: Çalışmamızda kullanılan OPH-12, OPH-13 ve OPH-14 primerlerine ait amplifikasyon sonuçları.

Amplifike Olan Primerler (kbç)	Deney Grupları (Kontrol ve Mutant Bitkiler)																			
	K	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12	M13	M14	M15	M16	M17	M18	M19
P12_{1.5Ü*}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P12_{1.5}	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+
P12_{1.4}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P12_{1.1}	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
P12_{0.8}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P12_{0.5}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
P13_{1.5Ü}	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
P13_{1.5}	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+
P13_{1.3}	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+
P13_{1.0}	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+
P13_{0.7}	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
P13_{0.5}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+
P14_{1.4}	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+
P14_{0.9}	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

* Amplifike olan primerlerde oluşan bantların büyüklüğü (kilobaz çifti (k.b.ç.)) ifade edilmektedir. (RAPD bantları + ve - olarak ifade edildi ve “+” bandın varlığını “-” bandın yokluğunu ifade etmektedir)

Tablo 4.10: Çalışmamızda kullanılan OPH-16, OPH-17 ve OPH-19 primerlerine ait amplifikasyon sonuçları

Amplifike Olan Primerler (kbç)	Deney Grupları (Kontrol ve Mutant Bitkiler)																			
	K	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12	M13	M14	M15	M16	M17	M18	M19
P16_{1.5Ü}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+
P16_{1.5}	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P16_{1.4}	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P16_{0.8}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+
P17_{1.4}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
P17_{1.2}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
P17_{1.0}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
P17_{0.9}	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+
P17_{0.6}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
P17_{0.4}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
P19_{1.4}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
P19_{1.0}	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
P19_{0.9}	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
P19_{0.8}	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-
P19_{0.6}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-

* Amplifike olan primerlerde oluşan bantların büyüklüğü (kilobaz çifti (k.b.ç.)) ifade edilmektedir. (RAPD bantları + ve - olarak ifade edildi ve “+” bandın varlığını “-” bandın yokluğunu ifade etmektedir)

RAPD analizinde test edilen 10 primerden 6 tanesi Marfona patates (*Solanum tuberosum* L.) çeşidine ait deney örneklerinde çalışmıştır. Tablo 4.9 ve Tablo 4.10'da görüldüğü gibi bu 6 primerin 4'ü kontrol bitkisinde amplifikasyon gösterirken, OPH-14 ve OPH-17 primerleri kontrol bitkisinde amplifike olmamıştır. Kullanılan tüm primerler, 5 ve 19 numaralı mutant bitkilerde amplifikasyon gösterirken, sadece OPH 12 primeri kontrol ve mutant bitkilerin tümünde amplifikasyon göstermiştir. Tüm primerler göz önünde bulundurulduğunda toplam 238 DNA bandı kontrol ve mutant bitkilerde amplifike olmuştur. Deney grupları içerisinde en fazla amplifikasyon 20 DNA bandı ile 15 numaralı mutant bitkisinde oluşurken, kontrol bitkisinde 11 DNA bandı oluşmuştur. Çalışmamızda kullanılan 6 primerin ortalama polimorfizm oranı, polimorfik bant sayısının toplam bant sayısına oranlanması ile saptanarak Tablo 4.11'de gösterilmiştir.

Tablo 4.11: RAPD sonucu oluşan bantlar ve polimorfizm oranları

Primer Adı	Toplam Bant Sayısı	Polimorfik Bant Sayısı	Polimorfizm oranı %
OPH-12	6	3	50
OPH-13	6	6	100
OPH-14	2	2	100
OPH-16	4	4	100
OPH-17	6	6	100
OPH-19	5	5	100
Toplam	29	26	89.66

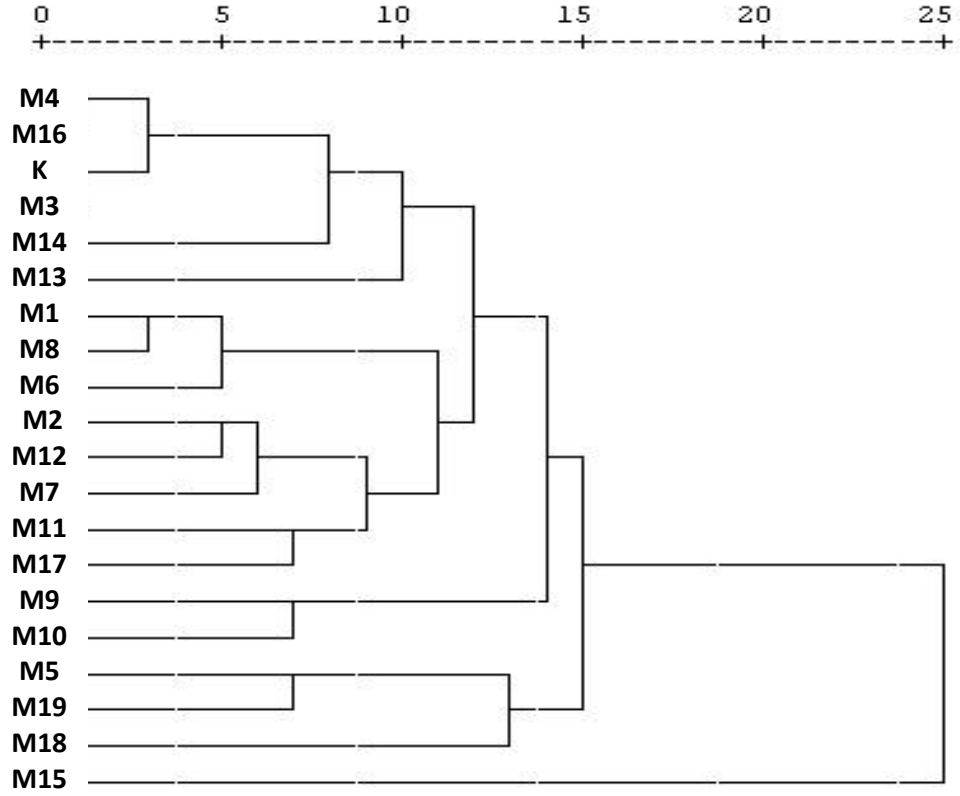
Tablo 4.11'de görüldüğü gibi çalışmamızda kullandığımız 6 primerden sadece OPH-12 primerinde polimorfizm oranı %50 iken diğer 5 primerin tamamında polimorfizm meydana gelmiştir. Çalışmada kullanılan tüm primerlerin toplam polimorfizm oranı ise yüksek seviyede olup, % 89.66 olarak hesaplanmıştır.

4.5.5. Genetik Mesafenin Hesaplanması

Marfona patates (*Solanum tuberosum* L.) çeşidine ait kontrol ve mutant bitkilerin birbirlerine olan genetik uzaklıklarını belirlemek için RAPD-PCR analizinde amplifike olan primerlerdeki RAPD bantlarına “1”, olmayanlara “0” sayısal değeri verildi ve bu değerler, SPSS istatistik programındaki kümeleme analiz yönteminde kullanılarak mutant bitkilerinin birbirlerine ve kontrole olan genetik uzaklıkları hesaplandı. Tuza direnç veya tolerans gösteren Marfona patates (*Solanum tuberosum* L.) çeşidine ait kontrol ve mutant bitkilerin birbirlerine olan genetik uzaklıkları Tablo 4.12’ de ve bu bitkilere ait dendogram ise Şekil 4.18’ de sunulmuştur.

Tablo 4.12: Çalışmamızda kullanılan primerlere göre Marfona patates (*Solanum tuberosum* L.) çeşidine ait kontrol ve mutant bitkilerin birbirlerine olan genetik uzaklıkları

RAPD Deney Grupları	K	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12	M13	M14	M15	M16	M17	M18	M19
K	0																			
M1	0,25	0																		
M2	0,13	0,12	0																	
M3	0,05	0,22	0,18	0																
M4	0,13	0,28	0,25	0,09	0															
M5	0,46	0,21	0,33	0,44	0,33	0														
M6	0,26	0,1	0,21	0,23	0,29	0,23	0													
M7	0,18	0,17	0,13	0,14	0,22	0,39	0,19	0												
M8	0,31	0,04	0,19	0,28	0,33	0,27	0,1	0,23	0											
M9	0,37	0,24	0,4	0,33	0,4	0,3	0,33	0,47	0,3	0										
M10	0,47	0,53	0,5	0,43	0,5	0,58	0,6	0,6	0,58	0,33	0									
M11	0,47	0,33	0,3	0,44	0,5	0,3	0,42	0,26	0,39	0,5	0,5	0								
M12	0,27	0,17	0,13	0,24	0,3	0,3	0,26	0,18	0,23	0,37	0,47	0,26	0							
M13	0,27	0,33	0,3	0,24	0,22	0,39	0,33	0,27	0,39	0,58	0,47	0,37	0,27	0						
M14	0,12	0,19	0,23	0,17	0,23	0,38	0,27	0,28	0,24	0,27	0,56	0,55	0,36	0,36	0					
M15	0,29	0,33	0,38	0,33	0,38	0,49	0,33	0,42	0,37	0,43	0,67	0,64	0,48	0,48	0,18	0				
M16	0,09	0,25	0,22	0,05	0,04	0,39	0,26	0,18	0,31	0,37	0,47	0,47	0,27	0,18	0,2	0,36	0			
M17	0,33	0,22	0,18	0,3	0,36	0,28	0,31	0,24	0,32	0,33	0,43	0,22	0,24	0,43	0,42	0,53	0,33	0		
M18	0,46	0,25	0,3	0,43	0,48	0,35	0,26	0,36	0,31	0,47	0,47	0,37	0,18	0,27	0,44	0,55	0,46	0,43	0	
M19	0,31	0,21	0,19	0,28	0,19	0,13	0,23	0,23	0,27	0,48	0,58	0,3	0,15	0,23	0,38	0,49	0,23	0,28	0,23	0



Şekil 4.18: Marfona patates (*Solanum tuberosum* L.) çeşidine ait kontrol ve mutant bitkilerin, kullanılan primerlerin RAPD-PCR sonuçlarına göre dendrogramları (M: Mutant; K: Kontrol)

Tablo 4.12’de görüldüğü gibi çalışmamızda kullandığımız tüm primerlerin RAPD sonuçları bir arada değerlendirildiğinde 10 ve 11 numaralı mutant bitkilerin kontrole olan genetik uzaklıkları % 47 olarak hesaplanırken, 5 ve 18 numaralı mutant bitkilerin kontrole olan genetik uzaklıkları % 46 olarak hesaplanmıştır. Aynı şekilde 9 numaralı mutant bitkinin, kontrolden uzaklığı % 37 bulunurken, 17 numaralı mutant bitkinin kontrolden uzaklığı % 33, 8 ve 19 numaralı mutant bitkilerin kontrole olan genetik uzaklıkları ise % 31 olarak bulunmuştur. Çalışmamızda 3 numaralı mutant bitkinin kontrole olan uzaklığı % 5 olarak saptanırken 16 numaralı mutant bitkinin kontrole uzaklığı % 9 olarak saptanmıştır. Yapılan hesaplamalar sonucunda 14 numaralı mutant bitkinin kontrole olan genetik uzaklığının % 12 olduğu belirlenirken, 2 ve 4 numaralı mutant bitkilerin kontrole olan genetik uzaklıklarının % 13 olduğu belirlenmiştir.

Tüm deney grupları göz önünde bulundurulduğunda kullanılan primerlere göre en fazla genetik farklılığın % 67 oranıyla 10 ile 15 numaralı mutant bitkiler arasında olduğu hesaplanırken, 11 ve 15 numaralı mutant bitkiler arasındaki genetik farklılığın ise % 64 olduğu hesaplanmıştır. Yine 10 numaralı mutant bitkinin, 7 ve 6 numaralı mutant bitkilere göre % 60 oranında genetik farklılığa sahip olduğu yapılan hesaplamalarla belirlenmiştir. En az genetik açılımın ise % 4 farklılıkla 1 ile 8 ve 4 ile 16 numaralı mutant bitkiler arasında olduğu saptanırken, 3 ile 16 numaralı mutant bitkiler arasındaki genetik farklılık % 5 olarak saptanmıştır.

Şekil 4.18'deki genetik mesafelere göre çıkarılan dendrogram değerlendirildiğinde, Marfona patates (*Solanum tuberosum* L.) çeşidine ait 3, 4, 16 numaralı mutant bitkilerin kontrole çok yakın, 5, 9, 10, 11, 17, 18 ve 19 numaralı mutant bitkilerin ise kontrole çok uzak olduğu belirlenmiştir.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmamızda dünyanın en önemli tarım ürünlerinden biri olan patates (*Solanum tuberosum* L. cv. Marfona) bitkisinin nod eksplantlarından doku kültürü kurulmuştur. Patates bitkisinde, *in vitro* mutasyon çalışmaları için optimum ışınlama dozları tespit edilmiştir. Kurulan kültürlerle belli dozlarda gama radyasyonu uygulanması sonucu somatik mutasyonlar teşvik edilerek *in vitro* ortamda tuza toleranslı mutant bitkiler elde edilmiştir. Ayrıca, elde edilen tuza toleranslı mutant bitkiler ile kontrol bitkileri arasındaki farklılıklar, moleküler düzeyde saptanmıştır.

Çalışmamızda patates (*Solanum tuberosum* L. cv. Marfona) nod eksplantlarından kurulan kültürlerde en yüksek rejenerasyon, nod eksplantlarının 0.5 mg/l ZR ve 1.5 mg/l IAA içerikli MS besiyerine ekilmesiyle elde edilmiştir. *In vitro* ortamda, bitki dokularından yüksek seviyede rejenerasyon elde edebilmek için kullanılacak en uygun besiyeri içeriğinin tespit edilmesi gerekmektedir. Patates çeşitlerine ait doku kültürü çalışmalarında birçok araştırmacı tarafından MS besiyeri, rejenerasyonu teşvik etmek için kullanılmaktadır (George, 2008; Aghaei ve diğ., 2008; Torabi ve diğ., 2008; Sarkar ve diğ., 2004; Graskova ve diğ., 2004; Chang ve diğ., 2002; Pompe-Novak ve diğ., 2002; Yıldırım ve Tugay, 2002; Arıcan, 2001; Zobayed ve diğ., 2001; Duffy ve Cassells, 2000; Veramendi ve diğ., 1999; Gopal ve diğ., 1998; Anjum ve Villiers, 1997). Patates (*Solanum tuberosum* L.) bitkisiyle yapılan doku kültürü çalışmalarında, özellikle sürgün rejenerasyonunun teşvik edilmesi için bitki büyüme düzenleyicilerinden ZR ile IAA hormonlarının kombine edilerek kullanıldığı bildirilmiştir (Chang ve diğ., 2002; Arıcan, 2001).

Çalışmamızda patates bitkisine ait Marfona çeşidinin radyasyona olan hassasiyetinin belirlenmesi için Marfona çeşidine ait nod eksplantlarından doku kültürleri kurulmuş ve kurulan kültürlerle çeşitli dozlarda gama radyasyonu uygulanmıştır. Bitkilerin sahip oldukları genotipik farklılıklar nedeni ile radyasyon dozlarına karşı verdikleri cevap değişken olduğundan mutasyon çalışmalarında kullanılacak etkin dozun (ED₅₀) saptanması büyük önem taşımaktadır (Sağel ve diğ., 2002; Alikamanoğlu,

1999). Bu nedenle çalışmamızda kontrol ve ışınlanan deney gruplarının 28. gündeki rejenerasyon yüzdesi, ortalama bitki boyu, ortalama yaprak sayısı ve kök oluşum yüzdesine göre ED₅₀ dozu belirlenerek patates bitkisine ait Marfona çeşidinin radyasyona olan hassasiyeti ortaya konmuştur.

Çalışmamızın 28.gününde, kültür ortamındaki ışınlanmış deney gruplarının büyüme parametrelerinde kontrole göre meydana gelen zararlanma, uygulanan radyasyon dozuna bağlı olarak artmıştır. Kontrol ve ışınlanmış kültürlerin tüm dozlarında rejenerasyon görülmektedir. Kontrol ve düşük radyasyon dozu uygulanan deney grupları arasında belirgin bir fark olmamakla birlikte, 25 Gy gama radyasyonu uygulanan deney grubunda bitki rejenerasyonu % 50 olarak gerçekleşirken, çalışmamızdaki en yüksek doz olan 50 Gy gama radyasyon dozunun kullanıldığı deney grubunda ise rejenerasyonun % 6,5 olarak gerçekleştiği gözlenmiştir. Marfona çeşidine ait bitki rejenerasyon yüzdesinin, uygulanan radyasyon dozunun artışına bağlı olarak azaldığı belirlenmiştir. Radyasyon uygulanan bitkilerin meristematik hücrelerinde meydana gelen kromozom zararlanmaları, hücre döngüsünün yavaşlaması ve mitoz bölünmenin gecikmesi gibi radyasyonun olumsuz etkileri yüksek dozlarda bitki rejenerasyonunu ve gelişimini oldukça azaltmaktadır. Uygulanan radyasyon dozunun artışı, mutasyon frekansını artırmasına rağmen aynı zamanda bitkideki zararlanmayı da arttırmaktadır (Toker ve diğ., 2007; Gulsen ve diğ., 2007; Hewawasam ve diğ., 2004; Zhen, 2001; Sharabash, 2001; Alikamanoğlu, 1999).

Çin narcissus bitkisinin doku kültürü üzerine gama radyasyonunun etkisini ortaya koymak için yapılan bir çalışmada, sürgün ucu eksplantlarına 0-100 Gy gama radyasyonu uygulanmış ve 28. günün sonunda, kontrol grubunun tamamı rejenere olurken, 15 Gy gama radyasyonu uygulanan grupta rejenerasyonun % 66 oranına düştüğü ve uygulanan radyasyon dozuna bağlı olarak bitki rejenerasyonunda azalma meydana geldiği bildirilmiştir (Lu ve diğ., 2007).

Çalışmamızda Marfona çeşidine ait ışınlanmış nod eksplantlarından kurulan kültürlerde gama radyasyonunun bitki gelişmesi üzerine etkisini belirlemek amacıyla bitki boyu, yaprak sayısı ve kök oluşum yüzdesi saptanmıştır. Kültür ortamında her

üç gelişim parametresinde gama radyasyonunun artan dozlarından etkilendiği görülmektedir. Deneysel grupları arasında ortalama bitki boyu değerlendirildiğinde uygulanan radyasyon dozuna bağlı olarak bitki boyunda bir gerileme olduğu ve bu gerilemenin 20 Gy gama radyasyonu uygulanmış deneysel grubundan itibaren bariz bir şekilde ortaya çıktığı görülmektedir.

Gulsen ve ark. limon bitkisiyle yaptıkları çalışmada, bitkileri 0, 30, 50, 70 ve 90 Gy gama radyasyonu ile ışınlamışlar ve uygulanan radyasyon dozuna bağlı olarak bitki boyunda azalış meydana geldiğini bildirmişlerdir. Yapılan bu çalışmada, kontrol bitkisinde ortalama bitki boyu 57 cm olarak belirlenirken, 90 Gy gama radyasyonu uygulanmış deneysel grubunda ise ortalama bitki boyunun 4 cm'e gerilediği belirlenmiştir (Gulsen ve diğ., 2007).

Crossandra bitkisinde yapılan *in vitro* mutasyon çalışmasında sürgün ucu eksplantları, 0-90 Gy gama radyasyonuna maruz bırakılmış ve artan radyasyon dozuna bağlı olarak sürgün boylarında anlamlı bir azalış meydana geldiği bildirilmiştir (Hewawasam ve diğ., 2004).

Çalışmamızda, ortalama yaprak sayısı bakımından incelendiğinde, kontrol ve 20 Gy gama radyasyonu uygulanmış deneysel gruplarına kadar hemen hemen ortalama yaprak sayılarının aynı olduğu fakat 20 Gy'den itibaren yaprak oluşumunun, artan radyasyon dozlarından etkilenerek yaprak boyutunda ve sayısında azalmanın meydana geldiği gözlenmiştir. Radyasyon uygulanmasıyla yapraklarda, apikal meristem ve yaprak primordiasının radyasyon dozlarından etkilenmesi sonucu büyümede yavaşlama ve morfolojik bozukluklar meydana geldiği araştırmacılar tarafından bildirilmektedir (De Guzman ve diğ., 1982).

Hewawasam ve ark. *Crossandra* bitkisinde yaptıkları *in vitro* mutasyon çalışmasında gama radyasyon dozunun artması ile kültürlerde bulunan bitki yapraklarında zararlanmanın arttığını bildirmişlerdir. 30 Gy gama radyasyonu uygulanan gruplarda bulunan yapraklardaki ortalama zararlanma % 25 iken bu oranın 60 Gy gama radyasyonu uygulanan gruplarda % 45'e çıktığı bildirilmiştir (Hewawasam ve diğ., 2004). Yapılan bir başka doku kültürü çalışmasında muz sürgün ucu

eksplantlarına, 10 ve 25 Gy gama radyasyonu uygulanmış ve uygulanan gama radyasyon dozlarının sürgün oluşumu ve yaprak sayısını azalttığı gösterilmiştir (De Guzman ve diğ., 1982) .

Çalışmamızda bir başka büyüme parametresi olan kök oluşum yüzdesi değerlendirildiğinde kontrol grubunda kök oluşumu % 63 iken, bu oran 15 Gy gama radyasyonu uygulanan grupta % 45'e düşmüş ve 50 Gy gama radyasyonu uygulanan grupta ise kök oluşumu gözlenmemiştir.

Crossandra bitkisi ile yapılan *in vitro* mutasyon çalışmasında gama radyasyonunun, kök oluşumuna etkisi değerlendirildiğinde kontrol bitkisinde kök oluşumunun % 94 olduğu saptanırken, 30 Gy gama radyasyon dozu uygulandığında kök oluşumunun % 55'e, 60 Gy gama radyasyon dozu uygulandığında ise kök oluşumunun % 20'ye düştüğü bildirilmektedir (Hewawasam ve diğ., 2004).

Çalışmamızda yaptığımız istatistiksel değerlendirmeler sonucunda, ortalama bitki boyu ve ortalama yaprak sayısının uygulanan gama radyasyonunun artan dozlarından etkilendiği ve bu etkileşimin önemli olduğu görülmektedir ($P < 0.05$). Ancak her iki büyüme parametresi değerlendirildiğinde, kontrol grubu ile 5 Gy gama radyasyonu uygulanan grup arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı saptanmıştır.

Yapılan radyobiyojik çalışmalarda bitki gelişiminin belirlenebilmesi ve bitkiye uygulanacak mutasyon dozlarının saptanabilmesi için ED₅₀ dozunun tespit edilmesi önemlidir. Çalışmamızda dört bitki gelişim parametresi de değerlendirilerek ED₃₀ ve ED₅₀ dozları tespit edilmiştir.

Narcissus bitkisinde yapılan *in vitro* mutasyon çalışmasında sürgün ucundan elde edilen eksplantlara uygulanan tüm dozların bitki rejenerasyonu üzerine etkili olduğu ve özellikle 20 Gy'den yüksek uygulanan dozlarda rejenerasyonun hızla düştüğü ve 100 Gy gama radyasyonu uygulanan grupta ise bitki rejenerasyonunun gerçekleşmediği ve yapılan hesaplamalar sonucunda ED₅₀ dozunun 28 Gy olarak saptandığı bildirilmiştir (Lu ve diğ., 2007).

Patade ve ark. 2008 yılında yaptıkları *in vitro* mutasyon çalışmasında şeker kamışı (*Saccharum officinarum* L.) bitkisinde embriyogenik kallus kültürlerini, 0-50 Gy'lik gama radyasyon dozu ile ışınlayarak LD₅₀ dozunu 20 Gy olarak saptamışlardır (Patade ve diğ., 2008)

Rasheed ve ark. *in vitro* ortamda şeker kamışı ve patates bitkisinde mutant bitkilerin eldesi için 0, 20, 40 ve 60 Gy gama radyasyonu kullanmışlar ve LD₅₀ dozunu 20 Gy olarak saptamışlardır. Ayrıca, patates bitkisine LD₅₀ dozunun üzerinde uygulanan radyasyonun, bitkide lethal etkiye neden olduğunu bildirmişlerdir (Saif-Ur-Rasheed ve diğ., 2001)

Vejetatif üreyen bitkilerde yapılan radyasyon çalışmalarında ED₅₀ dozu genellikle üst sınır olarak tercih edilirken, özellikle mutasyon ıslahı çalışmalarında ED₃₀ civarındaki dozlar tercih edilmektedir (Preidieri ve Di Virgilio,2007; Alikamanoğlu,1999). Nitekim çalışmamızda tuza toleranslı bireylerin eldesi, 15-30 Gy arasındaki radyasyon dozuna maruz bırakılan kültürlerde gerçekleşmiştir.

Sharabash ve ark. yaptıkları *in vitro* mutasyon çalışmasında patates doku kültüründe tuza toleranslı mutantların eldesi için 0, 20 ve 40 Gy gama radyasyonu uyguladıklarını ve mutasyon dozunu 20 Gy olarak saptadıklarını bildirmişlerdir (Sharabash,2001).

Bitkiler arasında genetik farklılıklar olsada, *in vitro* doku kültürü çalışmalarında somatik mutasyonların teşvik edilmesinde bitki hücre ve dokularına uygulanacak dozların yaklaşık 20 Gy civarında olması gerektiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Donini ve Sanino, 1998).

Somatik mutasyon çalışmalarında, doku kültürü ortamında mikroçoğaltım tekniklerinin kullanımı ile kısa sürede M₁V₃, M₁V₄, M₁V₅ generasyonları oluşturularak istenilen özelliklere sahip mutant bitkilerin *in vitro* seleksiyonu başarıyla yapılabilmektedir (Hewawasam ve diğ., 2004; Ahloowalia ve Maluszynski, 2001; Alikamanoğlu,1999). Çalışmamızda patates doku kültüründe somatik

mutasyonları teşvik etmek için, nod eksplantlarından doku kültürleri kurulmuş ve kurulan kültürlere gama radyasyonu uygulanmıştır. Araştırmamızda, kontrol ve ışınlanmış M_1V_1 generasyonuna ait 360 eksplanttan M_1V_2 generasyonuna ait 650 eksplant ve M_1V_2 generasyonundan da M_1V_3 generasyonuna ait 1024 eksplant elde edilmiştir. Elde edilen M_1V_3 generasyonuna ait eksplantlar, tuza toleranslı bitkilerin tespit edilmesi amacıyla 0, 50, 100 ve 125 mM NaCl konsantrasyon içerikli selektif besiyerine ekilmiştir.

Sharabash ve ark. yaptıkları çalışmada patates doku kültüründe tuza toleranslı mikrotüber üretimi için gama radyasyonu kullanıldığı ve stabilite testlerinin M_1V_3 generasyonundaki bitkilerde yapıldığını bildirmişlerdir (Sharabash, 2001). Patates bitkisi ile *in vitro* ortamda yapılan bir başka çalışmada, sıcağa karşı toleranslı mutantların stabilite testleri yine M_1V_3 generasyonuna ait bitkilerde yapılmıştır (Das ve diğ., 2000).

Gulsen ve ark. gama radyasyonu kullanarak *Mal Secco*'ya toleranslı ve çekirdeksiz limon mutantları elde etmişler ve stabilite testlerini M_1V_3 bitkilerinde yaptıklarını bildirmişlerdir (Gulsen ve diğ., 2007).

Çalışmamızda patates doku kültürlerinde çevresel stres faktörlerinden biri olan tuz stresinin etkisini belirlemek amacı ile Marfona çeşidine ait nod eksplantları çeşitli konsantrasyonlarda NaCl içeren selektif besiyerine ekilmiş ve kültürlerin tuz stresine olan hassasiyeti tespit edilmiştir. Uygulanan tuz konsantrasyon artışına bağlı olarak eksplantların rejenerasyon yüzdesi azalmış ve 150 mM'den yüksek tuz konsantrasyonuna sahip selektif besiyerinde rejenerasyon gözlenmemiştir. Bitki metabolizmasının tümünde etkili olan tuz stresinin en önemli etkisinin büyüme ve gelişmenin engellenmesi olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmektedir (Uddin ve diğ., 2007; Müftüoğlu ve diğ., 2006; Baek ve diğ., 2005; Nguyen ve diğ., 2004).

Yüksek tuz konsantrasyonlarının pirinç tohumlarının çimlenme yüzdeleri düşürdüğü, şeker kamışı bitkisinde nod, dal ve köklenmede gerilemeye neden olduğu ve *Solanum* türlerinde ise mikrotüber üretimini tamamen inhibe ettiği yapılan

çalışmalarda gösterilmiştir (Aghaei ve diğ., 2008; Baek ve diğ., 2005; Saif-Ur-Rasheed ve diğ., 2001; Silva ve diğ., 2001).

Ayrıca, Aghaei ve ark. 2008 yılında yaptıkları *in vitro* çalışmada, uygulanan yüksek tuz konsantrasyonlarının patates (*Solanum tuberosum* L.) doku kùltüründe gelişimi olumsuz etkilediğini belirterek özellikle 60 mM ve üzerindeki konsantrasyonlarda uygulanan tuzun, yapraklarda zararlanmaya yol aadığını ve büyümeyi inhibe ettiğini bildirmişlerdir (Aghaei ve diğ., 2008).

Yüksek konsantrasyonlarda NaCl stresine maruz bırakılan bitkilerde, hücre içine su alımının azalması sonucunda, kloroplastlardaki elektron transfer zincirinin etkilenmesi ve fotosentetik aktivitenin azalması gibi etkilerin meydana geldiği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (şen, 2005; El-Baky ve diğ., 2003). Tuz stresinin bitkilerde önemli zararlar meydana getirdiği ve birçok bitki türünün de tuz stresine karşı hassas olduğu düşünöldüğünde, yüksek tuz konsantrasyonlarına toleranslı bitkileri elde etmek büyük önem kazanmaktadır.

Çalışmamızda yüksek tuz konsantrasyonuna toleranslı patates Marfona çeşidine ait bitkilerin tespit edilmesi amacıyla 50, 100, 125 mM tuz konsantrasyonuna sahip selektif besiyerlerine ekilen nod eksplantlarının rejenerasyon yüzdeleri ve kök oluşum yüzdeleri hesaplanarak değerlendirilmiştir. 50 mM tuz içeren selektif besiyerinde M₁V₃ generasyonuna ait kontrol grubu rejenerasyonu % 55 değerine gerilerken bu oran 15 Gy gama radyasyon uygulanan grupta % 75 olarak tespit edilmiştir. Kontrol grubunun 125 mM tuz içeren selektif besiyerinde rejenerasyonu % 23 değerine kadar düşerken bu oran 20 Gy gama radyasyon uygulanan grupta % 48 değerine, 30 Gy gama radyasyon uygulanan grupta ise % 38 değerine ulaştığı belirlenmiştir. Bir başka büyüme parametresi olan kök oluşumu değerlendirildiğinde, 50 mM tuz içeren selektif besiyerinde rejenere olan kontrol grubunun kök oluşumu % 20 değerine gerilerken bu oran 15 Gy gama radyasyon uygulanan grupta % 75 olarak saptanmıştır. Kontrol grubunun 125 mM tuz içeren selektif besiyerinde kök oluşumu gözlenmezken 20 Gy gama radyasyon uygulanan grupta

% 39 oranında, 30 Gy gama radyasyon uygulanan grupta ise % 17 oranında kök oluşumu gözlenmiştir.

Gama radyasyonunun mutagen olarak kullanıldığı bir mutasyon çalışmasında pirinç tohumlarının 100 mM tuz konsantrasyonu içeren ortamda çimlenme oranı ortalama % 6.1 değerine düşerken, 8 Gy gama radyasyonu uygulanmış tohumların çimlenme oranı ise ortalama % 13.8 değerine yükseldiği bildirilmiştir (Baek ve diğ., 2005).

Das ve ark. sıcaklık stresine maruz bıraktıkları patates (*Solanum tuberosum* L.) bitkisinin kontrol grubunda ortalama 4.89 tüber geliştiğini bildirirken, 20 Gy gama radyasyonu uygulanan grupta ortalama tüber sayısının 10.18'e yükseldiğini ve 40 Gy gama radyasyonu uygulanan grupta ise ortalama tüber sayısının daha da artarak 20.18 tübere ulaştığını bildirmişlerdir (Das ve diğ., 2000).

Sharabash ve ark. *in vitro* ortamda yaptıkları çalışmada, 2000 ppm tuz konsantrasyonuna sahip besiyerinde rejenere olan patates (*Solanum tuberosum* L.) nod eksplantlarının ortalama boyunun 5.3 cm olarak ölçerken, 20 Gy gama radyasyonu uygulanan eksplantların ortalama boyunun 8.2 cm olarak ölçüldüğünü ve uygulanan radyasyon dozunun tuz stresinin meydana getirdiği zararlanmayı azalttığını bildirilmişlerdir. Yine aynı çalışmada bir başka büyüme parametresi olan bitki taze ağırlığı değerlendirildiğinde, tuz stresi etkisiyle kontrol grubunda ortalama bitki taze ağırlığının 1.18 g'a düştüğü, 20 Gy gama radyasyonu uygulanmasıyla ortalama bitki taze ağırlığının 4.1g'a yükseldiği saptanmış ve taze ağırlık üzerine tuz stresinin meydana getirdiği zararlanmanın, 20 Gy gama radyasyonunun uygulanması ile yaklaşık 4 kat azaltıldığı belirtilmiştir (Sharabash, 2001).

Yaptığımız çalışmada 15, 20, 30 Gy gama radyasyonu uygulanan deney gruplarının, selektif besiyerinde rejenerasyon ve kök oluşum yüzdelerinde gözlenen stimülasyona karşın 25 Gy gama radyasyonu uygulanan deney grubunun selektif besiyerinde rejenerasyon ve kök oluşum yüzdesinin kontrol grubundan daha düşük olmasının sebepleri arasında, bu deney grubunda bulunan bitkilerde meydana gelen mutasyonun, gen anlatımının düzenlenmesinde görev alan regülatör bölgelerde, gen

ürünlerinin kaybını ve/veya farklı ürünlerin oluşumunu tetikleyerek bitki rejenerasyonu ve kök oluşumunu baskılamış olabileceğini düşündürmektedir.

Nitekim, uygulanan radyasyon sonucunda organizmada meydana gelen mutasyonlar, genlerde regülatör bölgede transkripsiyonu ve/veya translasyonu engelleyerek fonksiyon kaybına yol açabileceği gibi ilgili gen ifadesinin artmasına neden olarak biyokimyasal fenotipi değiştirebilir ve ilgili gen ürününün yeni fonksiyonlar kazanmasını da sağlayabilir (Lüleyap, 2008).

Araştırmamızda gama radyasyonu uygulayarak tuz toleransına karşı yaptığımız bu mutasyon çalışmasında kontrole göre daha iyi geliştiği tespit edilen, 15 Gy radyasyon uygulanan grupta 20 bitki, 20 Gy radyasyon uygulanan grupta 17 bitki ve 30 Gy radyasyon uygulanan grupta ise 14 bitki olmak üzere toplam 51 bitkinin, 50, 100 ve 125 mM tuz konsantrasyonuna sahip selektif besiyerinde geliştiği saptanmıştır.

Hewawasam ve ark. yaptıkları mutasyon çalışmasında *Crossandra* bitkisinde yaprak şekli ve rengi değiştirilmiş mutant bitkileri gama radyasyonu ve kolşisin kullanarak elde ettiklerini, kontrol grubunda 920 bitkiden hiç mutant elde edilemezken, 30 Gy gama radyasyonu uygulanan grupta 960 bitkiden 1 mutant bitki, % 0.03'lük kolşisin uygulanan grupta 585 bitkiden 5 mutant bitki ve % 0.05'lik kolşisin uygulanan grupta ise 370 bitkiden 2 mutant bitki elde ettiklerini bildirmişlerdir (Hewawasam ve diğ., 2004).

Çalışmamızda gama radyasyonu uygulayarak elde ettiğimiz Marfona patates (*Solanum tuberosum* L.) çeşidine ait tuza toleranslı mutant bitkiler ile kontrol bitkisi arasında oluşan DNA düzeyindeki farklılıklar, polimeraz zincir reaksiyonuna dayanan moleküler markör tekniklerinden biri olan RAPD tekniği kullanılarak saptanmıştır. RAPD, genellikle bireyler arasında polimorfizmin bandın varlığı/yokluğu şeklinde ifade edildiği bir dominant markördür (Staub ve diğ., 1996). Patates çeşitleri arasındaki polimorfizmi belirlemede RAPD markörlerinin kullanımı, diğer yöntemlere göre ucuz ve uygulanabilirliğinin kolay olması nedeniyle tercih edilmektedir (Abbas ve diğ., 2008; Yasmin ve diğ., 2006; Ghislain ve diğ., 2006;

Trabelsi ve diğ., 2005; Collares ve diğ., 2004; Sadia ve diğ., 2003; McGregor ve diğ., 2000; Ochatt ve diğ., 1999).

Araştırmamızda bitki DNA izolasyon kiti kullanılarak Marfona patates (*Solanum tuberosum* L.) çeşidine ait kontrol ve tuza toleranslı mutant bitkilerin DNA izolasyonları yapılmış ve μl 'de 40-70 ng DNA elde edilmiştir. Patates ile yapılan birçok moleküler çalışmada genomik DNA izolasyonu için klasik izolasyon yöntemleri yerine bitki DNA izolasyon kitleri kullanılmaktadır (Ghislain ve diğ., 2006; Trabelsi ve diğ., 2005; Sadia ve diğ., 2003; Trindade ve diğ., 2003).

Çalışmamızda Marfona patates çeşidinde kontrol ve tuza toleranslı mutant bitkilere ait DNA'lara uygun çoğaltım yapılabilmesi ve çoğaltılan ürünlerin amplifikasyonlarının gerçekleştirilmesi için PCR reaksiyon karışımının ve uygulanan PCR döngü sayısı ve süresinin optimizasyonu yapılmıştır. PCR ile istenilen DNA dizilerinin hızlı bir şekilde çoğaltılabilmesi için PCR karışımını oluşturan temel bileşenlerin optimizasyonu önemlidir. Ayrıca, genomik DNA'nın kısa oligonükleotid primerler ile amplifikasyonunun gerçekleşmesi için PCR döngü koşullarının da optimizasyonu gereklidir (Özaydın, 2004; Shoyama ve diğ., 1998). Yapılan ön denemeler sonucunda PCR tamponu (10X), 2,5 mM MgCl_2 , 0,1 mM dNTP karışımı, 0,4 μM primer konsantrasyonu, 50 ng DNA konsantrasyonu ve 0,5 U taq DNA polimeraz içerikli toplam hacmi 50 μl olan karışım, PCR karışımı olarak kullanılmıştır. Yapılan ön denemeler sonucunda PCR döngüsü ve süresinin optimizasyonu sağlanmıştır. Buna göre, thermalcycler cihazında optimizasyon programı ayarlanarak PCR ürünlerine, 94 °C'de, 2 dakika ön denatürasyondan sonra, 40 döngü 94 °C'de, 1,5 dakika, 36 °C'de, 1 dakika ve 72 °C'de, 3 dakika işlem yapılmıştır. 40 döngünün ardından 72 °C'de, 7 dakika uygulanarak sentezi tamamlanamayan amplifikasyon ürünlerinin sentezi tamamlaması amaçlanmıştır. Programın son aşamasında bekleme sıcaklığı 4 °C olarak tercih edilmiştir. Uygulanan bu parametreler sonucunda etkili bir amplifikasyon elde edilmiştir. Geliştirdiğimiz PCR karışımı ve uygulanan döngü koşulları patates bitkisiyle yapılan birçok çalışmada kullanılan PCR karışımı ve döngü koşulları ile benzerlik göstermektedir (Abbas ve diğ., 2008; Yasmin ve diğ., 2006; Ghislain ve diğ., 2006;

Boltowicz ve diğ., 2005; Trabelsi ve diğ., 2005; Collares ve diğ., 2004; Mc Gregor ve diğ., 2000).

Çalışmamızın RAPD-PCR analizi kısmında 10 bazlık 10 farklı primer kullanılmış ve test edilen 10 primerden 6 tanesi Marfona patates (*Solanum tuberosum* L.) çeşidine ait deney örneklerinde çalışmıştır. Araştırmamızda kullanılan OPH-12 primerinde 6 DNA bandı amplifike olurken bunların 3 tanesi polimorfik diğer 3 tanesi ise kontrol ve mutant grupların hepsinde gözlemlendiğinden polimorfik olmayan bant olarak adlandırılmıştır. Diğer 5 primerde oluşan DNA bantlarının tümünün polimorfik olduğu saptanmış ve böylelikle tüm primerlerin ortalama polimorfizm oranı % 89.66 olarak tespit edilmiştir.

Birçok araştırmacı fizyolojik parametreler ile birlikte RAPD markörlerini kullanarak bitki türleri ve çeşitleri arasında oluşan polimorfizmi belirlemiştir (Aghaei ve diğ., 2008). Ayrıca, bitki grupları arasında belirlenen polimorfizm yüksek seviyede ise az sayıda kullanılan primerlerin polimorfizmi belirlemede yeterli olabileceği yapılan çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Rajaseger ve diğ.,1997; Schontz ve Rether, 1999; Li ve Midmore, 1999).

Mc Gregor ve ark. 39 patates çeşidi arasındaki polimorfizmi belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada RAPD markörleri kullanarak, içerisinde bizimde çalışmamızda kullandığımız primerlerin bulunduğu 20 farklı primer ile % 73.7 oranında polimorfizm elde ettiklerini bildirmişlerdir (McGregor ve diğ., 2000). Aynı şekilde Patade ve diğ. şeker kamışı bitkisine ait embriyonik kallus kültürlerinde elde ettikleri tuza ve kuraklığa toleranslı mutant bitkilerin kendi ve kontrol bitkisiyle aralarındaki polimorfizmi belirlemek amacıyla içerisinde yine bizimde çalışmamızda kullandığımız OPH-12 ve OPH-19 primerlerinin de bulunduğu 9 primer kullandıklarını bildirmişlerdir (Patade ve diğ., 2005)

Çalışmamızda, gama radyasyonunun etkisiyle Marfona patates çeşidinde elde edilen tuza toleranslı mutant bitkilerin kontrol bitkisiyle ve kendi aralarında oluşan genetik uzaklıklar değerlendirildiğinde 10 ve 11 numaralı mutant bitkilerin kontrole olan genetik uzaklıkları % 47; 5 ve 18 numaralı mutant bitkilerin kontrole olan genetik

uzaklıklarının ise % 46 gibi yüksek seviyede olduğu tespit edilirken, 3 numaralı mutant bitkinin kontrole olan genetik uzaklığının % 5 gibi düşük seviyede kaldığı saptanmıştır. Çalışmamızda gama radyasyonu uygulayarak somatik mutasyonların teşvik edilmesi sonucunda elde edilen tuza toleranslı bitkilerin kontrol bitkisinden ortalama % 27.5 oranında genetik farklılığa sahip olduğu yapılan istatistiksel hesaplamalar ile tespit edilmiştir. Tüm deney grupları göz önünde bulundurulduğunda kullanılan primerlere göre en fazla genetik farklılığın % 67 oranıyla 10 numaralı mutant bitki ile 15 numaralı mutant bitki arasında olduğu hesaplanırken, en az genetik farklılığın ise 1 numaralı mutant bitki ile 8 numaralı mutant bitki ve 4 numaralı mutant bitki ile 16 numaralı mutant bitki arasında % 4 oranında olduğu saptanmıştır.

Uygulanan radyasyon dozuna bağlı olarak canlılarda meydana gelen fiziksel zararlanmalar, M_1V_1 generasyonunda fizyolojik parametreler değerlendirilerek saptanabilirken, uygulanan radyasyonun canlı sistemlerde oluşturduğu genetik etkiler ancak ileri generasyonlarda saptanabilir ve meydana gelen kalıtsal değişimler ortaya konulabilir. Radyasyona maruz bırakılmış canlı organizmanın genetik yapısında meydana gelen bu kalıtsal değişimler hücreden hücreye farklılık gösterebilir. Bu farklılıklar, radyasyonun rastgele etkisi sonucu hücrelerde meydana gelen hasarın giderilmesinde, DNA onarım mekanizmalarındaki farklılıklar (Replikasyon öncesi veya Replikasyon esnasındaki onarımlar) olabileceği gibi gen ekspresyonunun düzenlenmesindeki (Transkripsiyonel, Post-Transkripsiyonel veya Translasyonel) oluşan değişikliklerde olabilir (Lüleyap, 2008). Buna bağlı olarak aynı radyasyon dozuna maruz bırakılmış bitki gruplarında farklı genotipik ve fenotipik değişimlerin saptanması söz konusu olabilir.

Elde ettiğimiz tuza toleranslı mutant bitkiler arasında da aynı radyasyon dozuna maruz bırakılmış bitkilerin genotipik farklılıklar içerdiği kullandığımız primerlere göre çizilen dendrogramlarda ortaya konmuştur.

Khan ve diğ. şeker kamışında somatik mutasyonları teşvik etmek amacıyla klonlara 0, 10, 20, 30 ve 40 Gy gama radyasyonu uyguladıklarını ve mutasyon dozunu 20 Gy olarak tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Araştırmacılar, elde ettikleri RAPD

amplifikasyon sonuçlarına göre mutant bitkilerin, kontrol bitkisiyle ve kendi aralarındaki genetik uzaklıkları hesaplamışlar ve kontrol bitkisine en uzak genetik mesafeye % 62 ile 20 Gy gama radyasyonu uygulanmış L3 mutant bitkisinin sahip olduğunu, en az genetik uzaklığın ise % 54 ile 20 Gy gama radyasyonu uygulanmış L4 mutant bitkisinin sahip olduğunu belirtmişlerdir. Çalışmalarında tüm deney grupları değerlendirildiğinde en fazla genetik farklılığın % 67 oranıyla 10 Gy gama radyasyonu uygulanmış L1 ile L2 mutant bitkiler arasında olduğu hesaplanırken, en az genetik farklılığın % 7 oranıyla 40 Gy gama radyasyonu uygulanmış L2 ile L3 mutant bitkiler arasında olduğu bildirilmiştir (Khan ve diğ., 2007).

Patade ve diğ. çevresel stres faktörlerinden tuz ve kuraklığa toleranslı mutant bireyler elde etmek amacıyla şeker kamışı embriyonik kallus kültürlerine farklı dozlarda gama radyasyonu uyguladıklarını bildirmişlerdir. Çalışmalarındaki RAPD amplifikasyon sonuçlarına göre elde ettikleri mutant bitkiler ile kontrol bitkileri arasında oluşan ortalama genetik farklılığın % 37 olarak saptandığını ve kontrol bitkisiyle en fazla genetik farklılığa % 69 ile 20 Gy gama radyasyonu ile ışınlanmış % 0.625 PEG (Polyethylene glycol) uygulanmış mutant bitkisinin sahip olduğunu bildirmişlerdir (Patade ve diğ., 2005)

Çalışmamızda genetik mesafelere göre çizilen dendrogram değerlendirildiğinde, Marfona çeşidine ait 3, 4, 16 numaralı mutant bitkilerinin kontrole çok yakın, 5, 9, 10, 11, 17, 18 ve 19 numaralı mutant bitkilerinin ise kontrole çok uzak olduğu belirlenmiştir. Özellikle 30 Gy gama radyasyonu uygulayarak elde ettiğimiz mutant bitkilerin tümü genetik açılım bakımından kontrol bitkisinin çok uzağında kalmıştır.

Sonuç olarak;

Çalışmamızda *in vitro* ortamda patates (*Solanum tuberosum* L.) Marfona çeşidine ait eksplantlardan doku kültürleri kurulmuştur. Kurulan patates doku kültürleri üzerine farklı dozlarda gama radyasyonunun etkisi ortaya konularak ED₅₀ dozu belirlenmiştir.

Gama radyasyon dozları ile ışınlanan eksplantlarda, somatik mutasyonlar teşvik edilmiş ve tuz stresine karşı toleranslı bitkilerin saptanabilmesi amacıyla mikroçoğaltım teknikleri kullanılarak M_1V_1 , M_1V_2 ve M_1V_3 generasyonları oluşturulmuştur.

Marfona çeşidine ait nod eksplantları, farklı konsantrasyonlarda NaCl içeren selektif besiyerlerine ekilmiştir. Ekilen eksplantların *in vitro* ortamda rejenerasyonları gözlenmiş ve tuz stresine olan hassasiyetleri ortaya konmuştur.

Marfona çeşidine ait M_1V_3 generasyonu nod eksplantları, 50, 100 ve 125 mM tuz içerikli selektif besiyerlerine ekilmiş ve gelişimleri gözlenerek, tuza toleranslı mutant bitkiler tespit edilmiştir.

Çalışmamızda, gama radyasyonunun etkisiyle patates (*Solanum tuberosum* L.) bitkisi Marfona çeşidine ait kontrol ve tuza toleranslı mutant bitkiler arasında oluşan DNA düzeyindeki farklılıklar, RAPD-PCR yöntemi kullanılarak saptanmıştır. RAPD-PCR yönteminde kullandığımız 6 primere göre polimorfizm oranı ise % 89.66 olarak hesaplanmıştır.

Patates (*Solanum tuberosum* L.) bitkisi Marfona çeşidine ait kontrol ve tuza toleranslı bitkilerin birbirlerine olan genetik uzaklıkları, SPSS istatistik programı kümeleme analiz yöntemi kullanılarak hesaplanmış ve dendrogramları çizilmiştir. Yapılan hesaplamalar sonucunda elde edilen tuza toleranslı bitkilerin kontrol bitkisinden ortalama % 27.5 oranında genetik farklılığa sahip olduğu ve kontrol bitkisiyle en fazla genetik açılıma sahip mutant bitkilerin ise % 47 oranı ile 10 ve 11 numaralı mutant bitkiler olduğu saptanmıştır.

Küresel ısınma ve beraberinde gelen iklim değişiklikleri nedeniyle tarımsal topraklarda gün geçtikçe tuzluluk hızla artmakta ve bu sebeple tuzlu topraklarda yetişebilecek bitkilerin elde edilmesi önem kazanmaktadır. Çalışmamızda, ülkemizde üretimi yapılan ve beslenme zincirinde önemli bir yeri bulunan patates bitkisinin Marfona çeşidinde, gama radyasyonu uygulayarak çevresel stres faktörlerinden biri olan tuzluluğa karşı toleranslı bitkiler geliştirilmiştir. Bu doktora tezi ile

radyobiyolojik yönden değerlendirilerek somatik mutasyon çalışmaları için optimum radyasyon dozları belirlenen patates bitkisi Marfona çeşidine uygun DNA izolasyonunun ve PCR koşullarının optimizasyonunun yapılmış olması ayrıca, polimorfizm gösteren primerlerin belirlenmesi, bundan sonra bu bitki çeşidi ile yapılacak olan seleksiyon, mutasyon ıslahı ve gen kaynaklarının karakterize edilmesi çalışmalarına ışık tutacaktır.

KAYNAKLAR

- ABBAS, S.J., RASOOL, G., SHAH, S.R.U., IQBAL, A., 2008, Analysis of genetic diversity in Pakistani Potato Cultivars by using Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Primers, *American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture*, 2(1): 50-53, ISSN 1995-0748.
- AGHAEI, K., EHSANPOUR, A.A., BALALI, G., MOSTAJERAN, A., 2008, *In vitro* screening of potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivars for salt tolerance using physiological parameters and RAPD analysis, *American-Eurasian J. Agric. and Environ. Sci.*, 3 (2): 159- 164.
- AHLOOWALIA, B.S., MALUSZYNSKI, M., 2001, Induced mutations - A new paradigm in plant breeding, *Euphytica*, 118: 167-173.
- AHLOOWALIA, B.S., MALUSZYNSKI, M., NICTERLEIN, K., 2004, Global impact of mutation-derived varieties, *Euphytica* 135: 187–204.
- ALİKAMANOĞLU, S., 1999, *İn vitro* tekniklerle haploid şeker pancarı (*Beta vulgaris* L.) bitkisinin eldesi ve somatik mutasyonların oluşturulmasında gama radyasyonunun kullanılması, Doktora Tezi, İ.Ü. Fen Bilimleri Enst., İstanbul.
- ANJUM, M.A., VILLIERS, T.A., 1997, Induction of microtubers *in vitro* from stem segments of *Solanum tuberosum* L., *S. commersonii* Dun. and *S. acaule* Bitt., *Scientia Horticulturae*, 70: 231-235.
- AOKI, A., KANEGAMI, A., MIHARA, M., KOJIMA, T., SHIRAIWA, M., TAKAHARA, H., 2005, Molecular cloning and characterization of a novel soybean gene encoding a leucine-zipper-like protein induced to salt stress, *Gene*, 356: 135-145.
- ARICAN, E., 2001, *Patates (Solanum tuberosum L.) çeşitlerinde polifenol oksidaz genleri üzerine çalışmalar*, Doktora Tezi, İ.Ü. Fen Bilimleri Enst., İstanbul.
- ARIOĞLU, H.H., 1997, Nişasta ve şeker bitkileri, *Ç.Ü. Ziraat Fak. Genel Yayın No: 188, Ders Kitapları*, 57: 3-230, Adana.
- ATAK, Ç., ALİKAMANOĞLU, S., AÇIK, L., CANBOLAT, Y., 2004, Induced of plastid mutations in soybean plant (*Glycine max* L.Merrill) with gamma radiation and determination with RAPD, *Mutation Research*, 556: 35–44.

- BABAOĞLU, M., YORGANCILAR, M., AKBUDAK, M.A., 2001, Doku kültürü: temel laboratuvar, *Bitki Biyoteknolojisi*, Editörler: M.Babaoğlu, E.Gürel, S. Özcan, 2. Baskı, Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları, Konya, ISBN: 975-6652-04-7.
- BABAOĞLU, S., AÇIK, L., ÇELEBİ, A., ADIGÜZEL, N., 2004, Molecular analysis of Turkish *allysum* L. (*brassicaceae*) species by RAPD-PCR and SDS-PAGE methods, *G.Ü. Fen Bilimleri Dergisi*, 17(3): 25-33.
- BAEK, M.H., KIM, J.H., CHUNG, B.Y., KIM, J.S., LEE, I.S., 2005, Alleviation of salt stress by low dose γ -irradiation in rice, *Biologia Plantarum*, 49 (2): 273-276.
- BANDEOĞLU, E., EYİDOĞAN, F., YÜCEL, M., ÖKTEM, H.A., 2004, Antioxidant responses of shoots and roots of lentil to NaCl-salinity stress, *Plant Growth Regulation*, 42: 69-77.
- BERGMANN, B.A., MOON, H.K., 1997, *In vitro* adventitious shoot production in *Paulownia*. *Plant Cell Rep.*, 16: 315-318.
- BIRBEN, B., 2006, Polimeraz Zincir Reaksiyonu [Polymerase Chain Reaction (PCR)], *Astım Allerji İmmünoloji*, 4(2):92-94.
- BİRİNCİ, A., KÜÇÜK, N., 2006, Erzurum ili tarım işletmelerinde patates üretim maliyetinin hesaplanması, *Tarım Ekonomisi Dergisi*, 12 (2): 31-37.
- BOLTOWICZ, D., SZCZERBAKOWA, A., WIELGAT, B., 2005, RAPD analysis of the interspecific somatic hybrid *Solanum bulbocastanum* (+) *S. tuberosum*, *Cellular & Molecular Biology Letters*, 10: 151-162.
- BYUN, M., KWON, H., PARK, S., 2007, Recent advances in genetic engineering of potato crops for drought and saline stress tolerance, *Jenks, M.A. et. al. (eds.) Advances in Molecular Breeding Toward Drought and Salt Tolerant Crops*, 713-737.
- CHANG, M.M., CULLEY, D., CHOI, J.J., HADWIGER, L.A., 2002, Agrobacterium-mediated co-transformation of a pea β -1,3-glucanase and chitinase genes in potato (*Solanum tuberosum* L. c.v. Russet Burbank) using a single selectable marker, *Plant Science*, 163: 83-89.
- COLLARES, E.A.S., CHOER, E., PEREIRA, A.S., 2004, Characterization of potato genotypes using molecular markers, *Pesq.agropec.bras., Brasilia*, 39 (9): 871-878.
- COLLET, S.A.O., COLLET, M.A., MACHADO, M.F.P.S., 2005, Differential gene expression for isozymes in somatic mutants of *Vitis vinifera* L. (Vitaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 33: 691-703.
- ÇOBAN, H., 2003, Vegetatif olarak üretilen bitkilerde mutasyon ıslahı, *S. Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi*, 17 (31): 62-67.

- ÇOLAK, G., KESER, Ö., CANER, N., 2008, *Lycopersicon esculentum* Mill. ve *Raphanus sativus* L. bitkilerinde çimlenme ve sonrası büyüme aşamalarında Na_2SO_4 tipi tuz stresinin etkileri, *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 24 / 12: 17 – 38.
- DAS, A., GOSAL, S.S., SIDHU, J.S., DHALIWAL, H.S., 2000, Induction of mutations for heat tolerance in potato by using *in vitro* culture and radiation, *Euphytica* 114: 205-209.
- DAVENPORT, S.B., GALLEGRO, S.M., BENAVIDES, M.P., TOMARO, M.L., 2003, Behaviour of antioxidant defense system in the adaptive response to salt stress in *Helianthus annuus* L. cells, *Plant Growth Regulation*, 40: 81–88.
- DE GUZMAN, E.V., DEL ROSARIO, A.G., PAGCALIWAGAN, P.C., 1982, Production of mutants by irradiation of *in vitro* cultured tissues of coconut and banana and their mass propagation by the tissue culture technique, 113-138, *Induced Mutations in Vegetatively Propagated Plants II*, ISBN 90-0-111182-7 IAEA, VIENNA.
- DERAGON, J.M., LANDRY, B.S., 1992, RAPD and other PCR-based analyses of plant genomes using DNA extracted from small leaf disks, *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 1:175-180, ISSN 1054-9803/92.
- DOLDI, M.L., VOLMANN, J. AND LELLEY, T., 1997, Genetic Diversity in Soybean as Determined by RAPD and Microsatellite Analysis, *Plant Breeding*, 116:331-335.
- DONINI, P., SANINO, A., 1998, Induced mutation in plant breeding: Current status and future outlook, in: S. Mohan Lain, D.S. Brar, B.S. Ahloowalia (Eds.), *Somaclonal Variation and Induced Mutations in Crop Improvement*, Kluwer Academic Publishers, London, pp. 255–291.
- DUFFY, E.M., CASSELLS, A.C., 2000, The effect of inoculation of potato (*Solanum tuberosum* L.) microplants with arbuscular mycorrhizal fungi on tuber yield and tuber size distribution, *Applied Soil Ecology*, 15: 137-144.
- DWEIKAT, I., OHM, H., PATTERSON, F., CAMBRON, S. 1997, Identification of RAPD markers of 11 Hessian fly resistance genes in wheat, *Theor. Appl. Genet.*, Berlin, Springer, Verlag., 94 (3/4): 419-423.
- EL-BAKY, A., HANAA, H., AMAL, M.A., HUSSEIN, M.M., 2003. Influence of Salinity on Lipid Peroxidation, Antioxidant Enzymes and Electrophoretic Patterns of Protein and Isoenzymes in Leaves of Some Onion Cultivars. *Asian Journal of Plant Sciences*, 2: 1220-1227.
- EL-SAYED, O.E., RIZKALLA, A.A., SABRI, S.R.S., 2007, *In vitro* mutagenesis for genetic improvement of salinity tolerance in wheat, *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 4 (5): 377- 383.

- ERYILMAZ, F., 2006, The relationships between salt stress and anthocyanin content in higher plants, *Biotechnol. & Biotechnol. Eq.*, 20 (1): 47-52.
- FAO/IAEA: Database of mutant variety and genetic stocks, www.mvd.iaea.org, [ziyaret tarihi: 10.03.2009].
- FOOLAD, M.R., CHEN, F.Q., 1998, RAPD markers associated with salt tolerance in an interspecific cross of tomato (*Lycopersicon esculentum* x *L. pennellii*), *Plant Cell Reports* 17: 306-312.
- FRANKS, T., BOTTA, R., THOMAS, MR., FRANKS, J., 2002, Chimerism in grapevines: implications for cultivar identity, ancestry and genetic improvement, *Theor. Appl. Genet.* 104: 192-199.
- FU, H.W., LI, Y.F., SHU, Q.Y., 2008, A revisit of mutation induction by gamma rays in rice (*Oryza sativa* L.): implications of microsatellite markers for quality control, *Mol Breeding*, DOI 10.1007/s11032-008-9173-7.
- GEORGE, E.F., 2008, Plant tissue culture procedure – background, *Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition Volume 1. The Background*, Edwin F. George, Michael A. Hall, Geert-Jan De Klerk, Published by Springer, P.O. Box 17, 3300 AA Dordrecht, The Netherlands, ISBN 978-1-4020-5005-3 (e-book) , 1-29.
- GHISLAIN, M., ANDRADE, D., RODRIGUEZ, F., HIJMANS, R.J., SPOONER, D.M., 2006, Genetic analysis of the cultivated potato *Solanum tuberosum* L. Phureja Group using RAPDs and nuclear SSRs, *Theor Appl Genet*, 113: 1515–1527, DOI 10.1007/s 00122-006-0399-7.
- GOSAL, S.S., DAS, A., GOPAL, J., MINOCHA, J.L., CHOPRA, H.R., DHALIWAL, H.S., 2001, *In vitro* induction of variability through radiation for late blight resistance and heat tolerance in potato, *In vitro Techniques for Selection of Radiation Induced Mutations Adapted to Adverse Environmental Conditions* IAEA, VIENNA, IAEA-TECDOC-1227 ISSN 1011–4289.
- GOPAL, J., MINOCHA, L., DHALIWAL, H.S., 1998, Microtuberization in potato (*Solanum tuberosum* L.), *Plant Cell Reports*, 17: 794-798.
- GRASKOVA, I.A., ROMANENKO, A.S., VLADIMIROVA, S.V., KOLESNICHENKO, A.V., 2004, Changes in peroxidase activity during potato ring rot infection, *Russian Journal of Plant Physiology*, 51 (4): 476-479.
- GRIFFITHS, A.J.F., MILLER, J.H., SUSUKI, D., LEWONTIN, R.C., GELBART, W.M., 1996, Gene mutation, *In: An Introduction to Genetic Analysis*, sixth ed. W.H. Freeman and Company, New York, 181- 210.
- GULSEN, O., UZUN, A., PALA, H., CANIHOS, E., KAFA, G., 2007, Development of seedless and *Mal Secco* tolerant mutant lemons through budwood irradiation, *Scientia Horticulturae* 112: 184–190.

- GÜBBÜK, H., PEKMEZCİ, M., 2001, değişik muz klonları arasındaki genetik varyasyonların RAPD markörleri ile belirlenmesi, *Bahçe*, 30 (1-2): 71 – 79.
- GÜL, U., TAN, S., 2003, Patates, *T.E.A.E- Bakış*, 2/8: 1-4, ISSN 1303-8346.
- HEWAWASAM, W.D.C.J., BANDARA, D.C., ABERATHNE, W.M., 2004, New phenotypes of *Crossandra infundibuliformis* var. Danica through in vitro culture and induced mutations, *Tropical Agriculture Research*, 16: 253-270.
- HOOKER, W. J., 1981, Compendium of potato diseases, *The American phytopathological society press*, St.Paul, USA.
- ISENEGGER, D.A., TAYLOR, P.W.J., MULLINS, K., MCGREGOR, G.R., BARLASS, M., HUTCHINSON, J.F., 2003, Molecular detection of a bacterial contaminant *Bacillus pumilus* in symptomless potato plant tissue cultures, *Plant Cell Rep.*, 21: 814-820.
- KANBER, R., ÜNLÜ, M., 2008, Türkiye’de Sulama ve Drenaj Sorunları: Genel Bakış, 5. Dünya Su Forumu Bölgesel Hazırlık Süreci DSİ Yurtiçi Bölgesel Su Toplantıları, Sulama- Drenaj Toplantıları, 10-11 Nisan 2008, Adana, 1-45.
- KHAN, I.A., DAHOT, M.U., KHATRI, A., 2007, Study of genetic variability in sugarcane induced through mutation breeding, *Pak. J. Bot.*, 39(5): 1489-1501.
- KHAN, J., 1993. Effects of different levels of NPK fertilizers on potato tuber yield. *Sarhad J. Agric.*, 9: 543–550.
- KLEINHOF, A., KILIAN, A., SAGHAI-MAROOF, M.A., 1993, A molecular, isozyme and morphological map of the barley (*Hordeum vulgare*) genome. *Theor. Appl. Genet.*, 86: 705-712.
- KIM, H. Y., 2005, Potato cytogenetics, *GEO Book*, Seoul, Korea.
- LAGE, C.L.S., VASCONCELLOS, A.G., SILVA, N.C.B., ESQUIBEL, M.A., 2002, Changes in electrophoretic profiles of *Ipomoea batatas* (Sweet Potato) induced by gamma radiation, *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 45(2): 177-182.
- LEE, I.S., KIM, D.S., LEE, S.J., SONG, H.S., LIM, Y.P., LEE, Y., 2003, Selection and characterizations of radiation-induced salinity-tolerant lines in rice, *Breeding Science*, 53: 313-318.
- LEE, H.E., SHIN, D., PARK, S.R., HAN, S., JEONG, M., KWON, T., LEE, S., PARK, S., YI, B.Y., KWON, B., BYUN, M., 2007, Ethylene responsive element binding protein 1 (StEREBP1) from *Solanum tuberosum* increases tolerance to abiotic stress in transgenic potato plants, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 353: 863–868.

- LI, M., MIDMORE, D.J., 1999, Estimating the genetic relationships of Chinese water chestnut (*Eleocharis dulcis* (Burm. f.) Hensch) cultivated in Australia, using Random Amplified Polymorphic DNAs (RAPDs), *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 74(2): 224-231.
- LOKKO, Y., AMOATEY, H., 2001, Improvement of pineapple using *in vitro* and mutation breeding techniques, *In vitro Techniques for Selection of Radiation Induced Mutations Adapted to Adverse Environmental Conditions* IAEA, VIENNA, IAEA-TECDOC-1227 ISSN 1011-4289.
- LU, G., ZHANG, X., ZOU, Y., ZOU, Q., XIANG, X., CAO, J., 2007, Effect of radiation on regeneration of Chinese narcissus and analysis of genetic variation with AFLP and RAPD markers, *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 88: 319-327 DOI 10.1007/s11240-006-9189-9.
- LÜLEYAP, H., 2008, *Moleküler genetiğin esasları*, Nobel Kitabevi, Adana, ISBN: 978-605-397-005-7.
- MAJID, M.A., SHAMSUZZAMAN, K.M., HOWLIDER, M.A.R., ISLAM, M.M., 2001, Development of sugarcane mutants with resistance to red rot, water-logging and delayed or non-flowering through induced mutations, *In vitro Techniques for Selection of Radiation Induced Mutations Adapted to Adverse Environmental Conditions* IAEA, VIENNA, IAEA-TECDOC-1227 ISSN 1011-4289.
- MANIATIS, T., FRITSCH, E. F., SOMBROOK, J., 1989, Molecular cloning: A laboratory manual. Cold spring harbor laboratory. *Cold Spring Harbor laboratory Press*, New York.
- MANRIQUE, L.M., 2000, Potato Production in the Tropics. *Manrique International Agrotech*, Honolulu, HI, USA.
- MBA, C., AFZA, R., JAIN, S.M., GREGORIO, G.B., ZAPATA-ARIAS, F.J., 2007, Induced mutations for enhancing salinity tolerance in rice, *Jenks, M.A. et al. (eds.) Advances in Molecular Breeding Toward Drought and Salt Tolerant Crops*, 413-454.
- McDONALD, M.B., ELLIOT, L.J. AND SWEENEY, P.M., 1994, DNA extraction from dry seeds for RAPD analyses in varietal identification studies, *Seed-Science-and-Technology*, 22 (1): 171-176.
- McGREGOR, C.E., LAMBERT, C.A., GREYLING, M.M., LOUW, J.H., WARNICH, L., 2000, A comparative assesment of DNA fingerprinting techniques (RAPD, ISSR, AFLP and SSR) in tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L.) germplasm, *Euphytica*, 113: 135-144.
- MOHAMED, H.A.L.A., HAGGAG, W.M., 2006, Biocontrol potential of salinity tolerant mutants of *trichoderma harzianum* against *fusarium oxysporum*, *Brazilian Journal of Microbiology*, 37:181-191.

- MOHANTY, I.C., MAHAPATRA, D., MOHANTY, S., DAS, A.B., 2004, Karyotype analyses and studies on the nuclear DNA content in 30 genotypes of potato (*Solanum tuberosum*) L., *Cell Biology International*, 28: 625-633.
- MUNNS, R., RICHARDS, R.A., 2007, Recent advances in breeding wheat for drought and salt stresses, *Jenks, M.A. et. al. (eds.) Advances in Molecular Breeding Toward Drought and Salt Tolerant Crops*, 565-585.
- MUTHUSAMY, A., VASANTY, K., SIVASANKARI, D., CHANDRASEKAR, B.R., 2007, Effects of mutagens on somatic embryogenesis and plant regeneration in groundnut, *Biologia plantarum* 51 (3): 430-435.
- MÜFTÜOĞLU, N.M., DARDENİZ, A., SUNGUR, A., ALTAY, H., 2006, Bazı sofralık üzüm çeşitlerinin tuza toleranslarının belirlenmesi, *Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 20 (40): 37-42.
- NADOLSKA-ORCZYK, A., PIETRUSINSKA, A., BINKA-WYRWA, A., KUC, D., ORCZYK, W., 2007, Diploid potato (*solanum tuberosum* L.) as a model crop to study transgene expression, *Cellular & Molecular Biology Letters*, 12: 206 – 219.
- NARITA, Y., TAGUCHI, H., NAKAMURA, T., UEDA, A., SHI, W., TAKABE, T., 2004, Characterization of the salt-inducible methionine synthase from barley leaves, *Plant Science* 167: 1009–1016.
- NEWBURY, H.J., FORD-LLOYD, B.V., 1993. The Use of RAPD for Assessing Variation in Plants. *Plant Growth Regulation*, 12: 43-51.
- NGUYEN, T.N, MOGHAIEB, R.E.A., SANEOKA, H., FUJITA, K., 2004, RAPD markers associated with salt tolerance in *Acacia auriculiformis* and *Acacia mangium*, *Plant Science*, 167: 797–805.
- NHUT, D.T., NGUHEN, N.H., THUY, D.T.T., 2006, A novel *in vitro* hydroponic culture system for potato (*Solanum tuberosum* L.) microtuber production, *Scientia Horticulturae* 110: 230–234.
- NYENDE, A.B., SCHITTENHELM, S., MIX-WAGNER, G., GREEF, J.M., 2005, Yield and canopy development of field grown potato plants derived from synthetic seeds, *Europ. J. Agronomy*, 175–184.
- OCHATT, S.J., MARCONI, P.L., RADICE, S., ARNOZIS, P.A., CASO, O.H., 1999, *In vitro* recurrent selection of potato: production and characterization of salt tolerant cell lines and plants, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 55: 1–8.
- ÖZAYDIN, S., 2004, RAPD (Rastgele Arttırılmış Polimorfik DNA) belirleyicileri ve bitki sistematığı, *Dumlupınar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 6: 113-130.

- ÖZTÜRK, A., 2004, Tuzluluk ve sodyumluluğun oluşumu, bitki ve toprağa etkileri, *Sulanan Alanlarda Tuzluluk Yönetimi Sempozyumu*, 20-21 Mayıs 2004, DSİ, Ankara, 1-15.
- PAN, Y., WU, L.J., YU, Z.L., 2006, Effect of salt and drought stress on antioxidant enzymes activities and SOD isoenzymes of liquorice (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch), *Plant Growth Regul*, 49:157–16, DOI 10.1007/s10725-006-9101-y.
- PAREEK, A., SINGLA-PAREEK, S., SOPORY, S.K., GROVER, A., 2007, Analysis of salt stress-related transcriptome fingerprints from diverse plant species, *R.K. Varshney and R. Tuberosa (eds.), Genomics-Assisted Crop Improvement: Vol. 1: Genomics Approaches and Platforms*, 267–287.
- PATADE, V.Y., SUPRASANNA, P., BAPAT, V.A., 2008, Gamma irradiation of embryogenic callus cultures and *in vitro* selection for salt tolerance in sugarcane (*saccharum officinarum* L.), *Agricultural Sciences in China*, 7(9): 1147-1152.
- PATADE, V.Y., SUPRASANNA, P., BAPAT, V.A., KULKARNI, U.G., 2005, Selection for abiotic (salinity and drought) stress tolerance and molecular characterization of tolerant lines in sugarcane, *the National Conference on “Biotechnological Aspects Towards Cultivation, Utilization and Disease Management of Plants”*, held at Lal Bahadur Shastri Mahavidyalaya, Dharmabad, Nanded during 24-25 December 2005.
- POMPE-NOVAK, M., POLJSAK-PRIJATELJ, M., POPOVIC, T., STRUKELJ, B., RAVNIKAR, M., 2002, The impact of potato cysteine proteinases in plant growth and development, *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 60: 71-78.
- PONNAMIERUMA, P.N., 1984. Role of cultivars tolerance in increasing rice production on saline land. In: *Staples R.C. Toenniessen G.H. (Eds.) Salinity tolerance in plants—strategies for crop improvement*. Wiley New York, 255–271.
- PREDIERI, S., DI VIRGILIO, N., 2007, *In vitro* mutagenesis and mutant multiplication, *S.M. Jain and H. Häggman (eds.), Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits*, 323–333.
- RAJASEGER, G., TAN, H.T.W., TURNER, I.M., AND KUMAR, P.P., 1997, Analysis of genetic diversity among ixora cultivars (Rubiaceae) using Random Amplified Polymorphic DNA, *Annals of Botany*, 80: 355-361.
- RANALLI, P., BASSI, F., RUARO, G., DELRE, P., DICANDILO, M., MANDOLINO, G., 1994, Microtuber and minituber production and yield performance compared with normal tubers, *Potato Res.*, 37: 383-391.
- RAO, C.D., GOH, C.J., KUMAR, P.P., 1996, High frequency plant regeneration from excised leaves of *Paulownia* spp. cultured *in vitro*, *Plant Cell Rep.* 16: 204-209.

- RASOL, M.K., CIPCIC, H., HAGAGE, D., 1999, Isoesterases related to cell differentiation in plant tissue culture, *Chemico-Biological Interactions*, 119-120: 587-592.
- ROCA, W.M., BRYAN, J.E., ROCA, M.R., 1979, Tissue culture for international transfer of potato genetic resources, *Am Potato J.*, 56: 1-10.
- SADIA, B., ANTHONY, P., LOWE, K.C., POWER, J.B., DAVEY, M.R., 2003, Culture treatments for enhancing post-thaw recovery of cryopreserved suspension cells of potato cv. Desiree, *Cellular & molecular biology letters*, 8: 979 – 989.
- SAĞEL, Z., PEŞKİRCİOĞLU, H., TUTLUER, M.İ., USLU, N., ŞENAY, A., TANER, K.Y., KUNTER, B., ŞEKERCİ, S., YALÇIN, S., 2002, Bitki ıslahında mutasyon ve doku kültürü teknikleri, *TAEK-ANTHAM Nükleer Tarım Radyobioloji Bölümü*, Ankara.
- SAIF-UR-RASHEED, M., ASAD, S., ZAFAR, Y., WAHEED, R.A., 2001, Use of radiation and *in vitro* techniques for development of salt tolerant mutants in sugarcane and potato. *In vitro Techniques for Selection of Radiation Induced Mutations Adapted to Adverse Environmental Conditions* IAEA, VIENNA, IAEA-TECDOC-1227 ISSN 1011–4289.
- SAIRAM, R.K, TYAGI, A., 2004, Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants, *Current Science*, 86(3): 407–421.
- SALEEM, M.Y., MUKHTAR, Z., CHEEMA, A.A., ATTA, B.M., 2005, Induced mutation and *in vitro* techniques as a method to induce salt tolerance in Basmati rice (*Oryza sativa* L.), *Int. J. Environ. Sci. Tech.*, 2/2: 141-145.
- SANGWAN, R. S., YADAV, U., SANGWAN, N. S., 2000, Isolation of genomic DNA from defatted oil seed residue of opium poppy (*Papaver somniferum*), *Plant molecular biology reporter*, 18: 265-270.
- SARKAR, D., PANDEY, S.K., SUD, K.C., CHANEMOUGASOUNDHARAM, A., 2004, *In vitro* characterization of manganese toxicity in relation to phosphorus nutrition in potato (*Solanum tuberosum* L.), *Plant Science*, 167: 977- 986.
- SCHONTZ, D., RETHER, B., 1999, Genetic variability in foxtaü millet, setaria italica (L.) P. Beauv.: Identification and classification of lines with RAPD markers, *Plant Breeding*, 118: 190-192.
- SHARABASH, M.T., 2001, Radiation induced variation in potato for tolerance to salinity using tissue culture technique, *In vitro Techniques for Selection of Radiation Induced Mutations Adapted to Adverse Environmental Conditions* IAEA, VIENNA, IAEA-TECDOC-1227 ISSN 1011–4289.
- SHATERIAN, J., GEORGES, F., HUSSAIN, A., WATERER, D., DE JONG, H., TANINO, K.K., 2005, Root to shoot communication and abscisic acid in

- calreticulin (*CR*) gene expression and salt-stress tolerance in grafted diploid potato clones, *Environmental and Experimental Botany*, 53: 323–332.
- SHOYAMA, Y., KAWACHI, F., TANAKA, H., NAKAI, R., SHIBATA, T., NISHI, K., 1998, Genetic and alkaloid analysis of *Papaver* species and their F1 hybrid by RAPD, HPLC and ELISA, *Forensic science International*, 91; 207-217.
- SILVA, J.A.B., OTONI, W.C., MARTINEZ, C.A., DIAS, L.M., SILVA, M.A.P., 2001, Microtuberization of Andean potato species (*Solanum* spp.) as affected by salinity, *Scientia Horticulturae*, 89: 91-101.
- SÖNMEZ , İ., SÖNMEZ, S., 2007, Tuzluluk ve gübreleme arasındaki ilişkiler, *Tarımın Sesi Dergisi*, 16: 13-16.
- STAUB, J.E., SERQUEN, F.C., GUPTA, M., 1996, Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding. *Hortscience*, 31(5): 729-741.
- SZAREJKO, I., FORSTER, B.P., 2007, Doubled haploidy and induced mutation, *Euphytica* 158: 359–370, DOI 10.1007/s10681-006-9241-1.
- ŞEN, A., 2005, *Buğday (Triticum aestivum L.) doku kültüründe tuz stresinin etkileri*, Yüksek Lisans Tezi, İ.Ü. Fen Bilimleri Enst., İstanbul.
- THORPE, T.A., HARRY, I.S., YEUNG, E.C., 2006, Clonal propagation of softwoods, *Plant Cell Culture Protocols*, Second Edition Edited by Victor M. Loyola-Vargas And Felipe Vázquez-Flot, Humana Press Inc. 999 Riverview Drive, Suite 208 Totowa, New Jersey 07512, 187-201.
- TOKER, C., YADAV, S.S., SOLANKI, I.S., 2007, Mutation breeding, *S.S. Yadav et al. (eds.), Lentil: An Ancient Crop for Modern Times*, 209–224.
- TORABI, F., MAJAD, A., EHSANPOUR, A.A., 2008, Plant regeneration from cell suspension culture of potato (*Solanum tuberosum* L.), *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 11(5): 778-782.
- TRABELSI, S., GARGOURI-BOUZID, R., VEDEL, F., NATO, A., LAKHOVA, A., DRIRA, N., 2005, Somatic hybrids between potato *Solanum tuberosum* and wild species *Solanum vernei* exhibit a recombination in the plastome, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 83: 1–11, DOI 10.1007/s11240-005-3667-3.
- TRINDADE, L.M., HORVATH, B., BACHEM, C., JACOBSEN, E., VISSER, R.G.F., 2003, Isolation and functional characterization of a stolon specific promoter from potato (*Solanum tuberosum* L.), *Gene*, 303: 77–87.
- UDDIN, MD.I., RASHID, MD.H., KHAN, N., PERVEEN, MST.F., TAI, T.H., TANAKA, K., 2007, Selection of promising salt tolerant rice mutants derived from cultivar ‘drew’ and their antioxidant enzymes activity under salt stress, *SABRAO Journal of Breeding and Genetics* 39(2) 89-98.

- UYGAN, D., HAKGÖREN, F., BÜYÜKTAŞ, D., 2006, Eskişehir sulama şebekesinde drenaj sularının kirlenme durumu ve sulamada kullanma olanaklarının belirlenmesi, *Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 19 (1), 47-58.
- VERAMENDI, J., WILLMITZER, L., TRETHERWEY, R.N., 1999, *In vitro* grown potato microtubers are a suitable system for the study of primary carbohydrate metabolism, *Plant Physiol. Biochem.*, 37: 693-697.
- VERMERRIS, W., VREUGDENHIL, D., VISSER, R.G.F., 2001, mRNA localization in *in vitro* grown microtubers of potato as a tool to starch metabolism, *Plant Physiol. Biochem.* 39: 161-166.
- WALBOT, V., 1988, Preparation of DNA from Single Rice Seedlings, *Rice Genet. Newslett*, 5:149-151.
- WALTON, M. 1993. Molecular markers: which one to use? *Seed World*, July:23-29.
- WILLIAMS, J.G.K., KUBELIK, A.R., LIVAK, K.J., RAFALSKI, J.A., TINGEY, S.V., 1990. DNA Polymorphisms Amplified by Arbitrary Primers are Useful as Genetic Markers. *Nucl. Acids Res.*, 18: 6531-6535.
- WOLF, K., RIJINI, J., 1993, Rapid detection of genomic variability in *Chrysanthemum* using random primers, *Heredity*, 71: 335-341.
- YASMIN, S., ISLAM, S., NASIRUTTIN, K., ALAM, S., 2006, Molecular characterization of potato germplasm by random amplified polymorphic DNA markers, *Biotechnology*, 5(1): 27-31.
- YILDIRIM, A., KANDEMİR, N. 2001. Genetik Markörler ve Analiz Metodları. Bölüm 23. In : Özcan, S. Gürel, E., Babaoğlu, M., *Bitki Biyoteknolojisi II. Genetik Mühendisliği ve Uygulamaları*. (ed.). Selçuk Üniv. Vakıf Yayınları, 112-159. ISBN 975-6652-05-5, Konya.
- YILDIRIM, B., TUNÇTÜRK, M., ÇİFTÇİ, C., 2005, Değişik dikim zamanlarının farklı patates (*Solanum tuberosum* L.) çeşitlerinde verim ve verim unsurları üzerine etkisi, *Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarım Bilimleri Dergisi (J. Agric. Sci.)*, 15(1): 1-9.
- YILDIRIM, Z., TUGAY, E., 2002, Beş patates genotipinin *in vitro* koşullarda mikro yumru oluşturması üzerinde bir araştırma, *Ege Üniv. Ziraat Fak. Derg.*, 39 (1): 41-45, ISSN 1018-8851.
- ZAR, J.H., 1984, *Biostatistical Analysis*. Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey.

ZHANG, Y., DONNELLY, D., 1997, In vitro assays for salinity tolerance screening of potato. *Potato Research*, 40: 285-295.

ZHEN, H.R., 2001, *In vitro* technique for selection of radiation induced mutants of sweet potato, *In vitro Techniques for Selection of Radiation Induced Mutations Adapted to Adverse Environmental Conditions* IAEA, VIENNA, IAEA TECDOC 1227, ISSN 1011-4289.

ZOBAYED, S.M.A., ARMSTRONG, J., ARMSTRONG, W., 2001, Micropropagation of potato: Evaluation of closed, diffusive and forced ventilation on growth and tuberization, *Annals of Botany*, 87:53-59.

ÖZGEÇMİŞ

1976 yılında Iğdır’da doğdum. Orta öğrenimimi 1993 yılında İstanbul İzzet Ünver Lisesinde tamamladım. 1994 yılında girdiğim Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü’nden 1998 yılında mezun oldum. Aynı yıl, dil eğitimi almak için Londra’ya gittim. 1999 yılında İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı’nda, Genel Biyoloji Yüksek Lisans programına başladım. 2000 yılının Aralık ayında İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Genel Biyoloji Anabilim Dalı’na, Araştırma Görevlisi olarak atandım. 2003 yılında İ.Ü Fen Bilimleri Enstitüsü’nde “*Paulownia* Doku Kültürü Üzerine Manyetik Alanın Etkileri” başlıklı Yüksek Lisans tezimi tamamlayarak Genel Biyoloji dalında uzman ünvanını aldım. Halen İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Genel Biyoloji Anabilim Dalı’na, Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktayım. Evli ve bir çocuk babasıyım.