

**T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**ALTIN ÇİLEKTE (*Physalis peruviana*) KOLHİSİN UYGULAMALARININ
ETKİLERİ**

Çiğdem CEREN

BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

**ŞANLIURFA
2012**

**T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**ALTIN ÇİLEKTE (*Physalis peruviana*) KOLHİSİN UYGULAMALARININ
ETKİLERİ**

Çiğdem CEREN

BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

**ŞANLIURFA
2012**

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZ	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ	iv
ÇİZELGELER DİZİNİ	v
SİMGELER DİZİNİ	vi
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	10
3. MATERYAL ve YÖNTEM	27
3.1. Bitkisel Materyal	27
3.2. Yöntem	28
3.2.1. Kolhisin Stok Çözeltilerinin Hazırlanması	28
3.2.2. Tohumların Yüzey Dezenfeksiyonu	28
3.2.3. Tohumlara Kolhisin Uygulaması	29
3.2.4. Fide Döneminde Bitki Büyüme Ucuna Kolhisin Uygulaması	30
3.2.5. Denemelerde Yapılan Ölçümler	32
3.2.5.1. Morfolojik Ölçümler	32
3.2.5.1.(1) Kotiledon Yaprak Alanı	33
3.2.5.1.(2) Bitki Boyu	33
3.2.5.1.(3) Gövde Çapı	34
3.2.5.1.(4) Meyve Boyutları	34
3.2.5.1.(5) Meyve Ağırlığı	35
3.2.5.2. Suda Çözünür Kuru Madde (SÇKM) Miktarı	36
3.2.5.3. Flow Sitometri Analizi	37
3.2.5.4. Denemede Yapılan İstatistiksel Analizler	38
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA	39
4.1. Tohumlara Kolhisin Uygulamaları	39
4.1.1. Morfolojik Analizler	39
4.1.1.1. Kotiledon Yaprak Alanı (mm ²)	39
4.1.1.2. Bitki Boyu (cm)	39
4.1.1.3. Gövde Çapı (mm)	40
4.1.1.4. Meyve Boyutları (mm)	41
4.1.1.5. Meyve Ağırlığı (g)	42
4.1.2. SÇKM Miktarı (brix)	43
4.1.3. Flow Sitometri Analizleri	44
4.2. Fide Döneminde Bitki Büyüme Ucuna Kolhisin Uygulaması	48
4.2.1. Morfolojik Analizler ve SÇKM	48
4.2.2. Flow Sitometri Analizleri	48
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER	53
KAYNAKLAR	54
ÖZGEÇMİŞ	59
ÖZET	60
SUMMARY	62

ÖZ

Yüksek Lisans Tezi

ALTIN ÇİLEKTE (*Physalis peruviana*) KOLHİSİN UYGULAMALARININ ETKİLERİ

Çiğdem CEREN

Harran Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Nuray ÇÖMLEKÇİOĞLU
Yıl: 2012, Sayfa: 62

Araştırma 2011-2012 yılları arasında yürütülmüştür. Bu çalışmada farklı kolhisin dozları (Kontrol, % 0.2, 0.4, 0.8) ve uygulama sürelerinin (8, 16, 24 saat) altın çilek (*Physalis peruviana*) bitkilerine etkileri incelenmiştir. Denemede “Goldenberry” çeşidi kullanılmıştır. Tohumlara ve fide dönemindeki bitkilerin büyüme ucuna kolhisin uygulamaları yapılmıştır. Uygulamaların etkilerini belirlemek amacıyla bitkilerin bazı morfolojik özellikleri, suda çözünabilir kuru madde miktarı (SÇKM) incelenmiş ve ploidi seviyesinin belirlenmesi için flow sitometri analizleri yapılmıştır. Araştırma sonunda tohum uygulamalarında, konsantrasyona ve uygulama süresine bağlı olarak, kotiledon yaprak alanı ve bitki boyunda önemli değişiklikler belirlenmiştir. Yüksek doz ve sürenin bitki boyuna olumsuz etkileri olmuştur. Uygulanan kolhisin dozu arttıkça gövde çapı, meyve boyutları ve meyve ağırlığında artış, SÇKM miktarında ise azalma meydana gelmiştir. Büyüme ucuna yapılan uygulamalarda ise sadece bitki boyunda farklılıklar göstermiştir. Flow sitometri sonuçlarına göre kolhisinin, bitkinin kromozom sayısında değişimlere neden olmadığı tespit edilmiştir. Bu çalışma koşullarında, kolhisin uygulamaları yalnız morfolojik varyasyonların oluşumuna neden olmuştur.

ANAHTAR KELİME: *Physalis peruviana*, kolhisin, poliploidi

ABSTRACT

MSc Thesis

EFFECTS OF COLCHICINE APPLICATIONS IN GOLDENBERRY (*Physalis peruviana*) Çiğdem CEREN

Harran University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of HORTICULTURE

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Nuray ÇÖMLEKÇİOĞLU
Year: 2012, Page: 62

This research was carried on 2011-2012. In this study, effects of colchicine treatments applied at different concentrations (0.0, 0.2, 0.4, 0.8 %) and times (8, 16, 24 hours) in goldenberry (*Physalis peruviana*) cv. "Goldenberry" were investigated. Colchicine was applied to seeds and shoot tips of seedlings. Some morphological characteristics such as cotyledon leaf area, plant height, stem diameter, fruit size, fruit weight, soluble solid (SS) content of fruits were measured and also flow cytometry analysis were done to determine the ploidy levels. According to the results of seed treatments, cotyledon leaf area and plant height significantly were changed based on the concentrations and times. The highest colchicine dose and time had adverse effects on plant height. Stem diameter, fruit size and fruit weight increased and SS decreased with increase in concentration of colchicine. Results of shoot tip experiments revealed that, differences were only in plant height. According the results of flow cytometry, it was identified that, colchicine applications were not caused any change in chromosome number of the plants. Colchicine treatments caused only morphological variations under the study conditions.

KEY WORDS: *Physalis peruviana*, colchicine, polyploidy

TEŞEKKÜR

Hazırlamıő olduğumuz bu çalışmada, bana yol gösteren destek ve anlayıőlarını benden esirgemeyen çok değerli danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Nuray ÖMLEKIOėLU’na teőekkürü bir borç bilirim.

Çalıőmam boyunca maddi ve manevi desteklerinden dolayı bölümdeki tüm hocalarıma ve sera çalıőmalarımda bana yardımcı olan Bahçe Bitkileri Bölümü öğrencilerine teőekkürlerimi sunarım.

Eėitim hayatım süresince maddi ve manevi yönden desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen ve yanımda olan sevgili aileme sonsuz teşekkür ederim.

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 1.1. Kolhisinin hücre bölünmesine etkisi	6
Şekil 3.1. Altın çilek bitkisi ve meyveleri	27
Şekil 3.2. Hazırlanmış olan kolhisin stok çözeltileri.....	28
Şekil 3.3. Saksılara dikimleri yapılmış altın çilek bitkileri.....	30
Şekil 3.4. Büyüme ucuna kolhisin uygulaması.....	31
Şekil 3.5. Büyüme ucuna kolhisin uygulanan bitkiler.....	32
Şekil 3.6. Yaprak alan ölçer ile kotiledon yaprak alan ölçümü.....	33
Şekil 3.7. Serada yetişen altın çilek bitkileri	34
Şekil 3.8. Altın çilek kaliksli ve kaliksiz meyveleri	35
Şekil 3.9. Meyve ağırlığı ölçümü.....	35
Şekil 3.10. Altın çilek bitkisi ve olgunlaşmayı bekleyen meyveleri	36
Şekil 3.11. Refraktometre ile SÇKM ölçümü.....	36
Şekil 3.12. Flow sitometri cihazı	37
Şekil 4.1. Kontrol altın çilek bitkisi (M1) ve <i>Brachypodium distachyon</i> (M2)'nin flow sitometri sonucunun bilgisayar ortamındaki görüntüsü	44
Şekil 4.2. Tohumlara 8 saat kontrol (a), % 0.2 (b), % 0.4 (c), % 0.8 (d) kolhisin uygulamasından sonra elde edilen bitkilerin ve flow sitometri sonuçlarının bilgisayar ortamındaki görüntüsü.....	45
Şekil 4.3. Tohumlara 16 saat kontrol (a), % 0.2 (b), % 0.4 (c), % 0.8 (d) kolhisin uygulamasından sonra elde edilen bitkilerin ve flow sitometri sonuçlarının bilgisayar ortamındaki görüntüsü.....	46
Şekil 4.4. Tohumlara 24 saat kontrol (a), % 0.2 (b), % 0.4 (c), % 0.8 (d) kolhisin uygulamasından sonra elde edilen bitkilerin ve flow sitometri sonuçlarının bilgisayar ortamındaki görüntüsü.....	47
Şekil 4.5. Kontrol (a), % 0.2 (b), % 0.4 (c), % 0.8 (d) kolhisin konsantrasyonlarının bitki büyüme ucuna uygulamalarından alınan bitki örneklerinin flow sitometri sonuçlarının bilgisayar ortamındaki görüntüsü.....	49

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa No
Çizelge 4.1. Farklı kolhisin konsantrasyonları ve uygulama sürelerinin kotiledon yaprak alanına etkileri (mm ²).....	39
Çizelge 4.2. Değişik kolhisin konsantrasyonları ve uygulama sürelerinin bitki boyuna etkileri (cm).....	40
Çizelge 4.3. Değişik kolhisin doz uygulamaları ve sürelerinin gövde çapı üzerine etkileri (mm)..	40
Çizelge 4.4. Meyve çapı üzerine, kolhisin konsantrasyonları ve sürelerinin etkileri (mm).....	41
Çizelge 4.5. Meyve boyu üzerine, uygulanan kolhisin konsantrasyonları ve sürelerinin etkileri (mm)	42
Çizelge 4.6. Uygulanan farklı kolhisin doz ve sürelerinin meyve ağırlığına etkileri (g).....	43
Çizelge 4.7. Değişik kolhisin konsantrasyonu ve süre uygulamalarının altın çilek meyveleri SÇKM'sine etkileri (brix)	43
Çizelge 4.8. Bitki boyu (cm), gövde çapı (mm), meyve çapı (mm), meyve boyu (mm), meyve ağırlıkları (g) ve SÇKM (brix) ortalamaları.....	48

SİMGELER DİZİNİ

m	Metre
cm	Santimetre
$^{\circ}\text{C}$	Santigrad derece
g	Gram
%	Yüzde
mm	Milimetre
mg	Miligram
DNA	Deoksiribonükleik asit
nM	Nanomolar
ppm	Part per million
mM	Milimolar
μM	Mikromolar
dk	Dakika
n	Kromozom set sayısı
ml	Mililitre
μl	Mikrolitre
mm^2	Milimetrekaire
MgSO_4	Magnezyum sülfat
MS	Murashige ve Skoog
pg	Pikogram

1. GİRİŞ

Altın çilek, latince adıyla *Physalis peruviana*, *Solanaceae* familyasından *Physalis* cinsine ait, Güney Amerika (Amazon ve And dağları) orjinli egzotik meyveli bir türdür. Bununla birlikte bazı varyeteleri Asya, Amerika ve Avrupa'da bulunmaktadır. Altın sarı renkli meyvelere sahip olan *P. peruviana*, Ekvator, Güney Amerika, Kenya, Zimbabve, Avustralya, Yeni Zelanda, Havai, Hindistan, Malezya, Kolombiya ve Çin'de ticari olarak üretilmektedir. Besin değeri ve tıbbi önemi nedeniyle, Avrupada önemli pazarlarda ilgi çekici olmaktadır (Rodrigues ve ark., 2009).

Physalis ismi, taç yapraklar düşene kadar büyüyen ve meyveye yakın genişlikte 5 parçalı olan kaliksten dolayı yunanca *phusa* (kese)'dan gelmektedir (Azemi ve ark., 2006). *P. peruviana* Kolombiya'da uchuva, Ekvator'da uvilla, Peru'da aguaymanto, Venezuela'da topotopo ve dünyada İngilizce konuşan ülkelerde goldenberry olarak bilinmektedir (Puente ve ark., 2011; Çelik, 2011). Bitkinin bazı türleri ülkemizde de birçok bölgede doğal olarak yetişmektedir. Bu tür, ülkemizde "Pelerinli Bektaşi Üzümü", "Kaz Üzümü", "Güvey Feneri", "İnka Eriği", "Yer Kirazı" ve popüler olarak "Altın Çilek" olarak bilinen değerli bir sebzedir (Çelik, 2011).

Physalis cinsinde, morfolojik olarak türlerin benzerlik göstermesi nedeniyle tahmini tür sayısı 75'den 120'ye kadar ulaşmaktadır. Cins, içerisinde gelişen meyveyi saklayan kaliksleriyle kolayca fark edilmektedir (Martinez, 1998). *Physalis* cinsinin ticari olarak en fazla kabul gören ve taze olarak meyveleri tüketilebilen türü; *P. peruviana*'dır. *P. heterophylla* (ıslak yerkirazı), *P. ixocarpa* (tomatillo), *P. philadelphica* (mor yerkirazı), *P. pruinosa* (çilek domatesi), *P. pubescens* (kılıflı domates), *P. viscosa* (yapışkan yer kirazı) yetiştiriciliği yapılan diğer türlerdir (Salazar ve ark., 2008). *Physalis* cinsi kendine özgü poliploid sitotiplere (diploid, tetraploid ve oktaploid gibi) sahip olan türler içermesi ile birlikte *P. peruviana* türü diploid (2n=48) kromozoma sahip bir türdür (Wu ve ark., 2006; Menzel, 1951).

Altın çilek, G. Amerika And bölgesinde yetişen doğal bir bitkidir. Bu bitki el sürülmeden ve tohum yapısında değişimler yapılmadan korunmuştur. *P. peruviana* türleri İspanyollar tarafından G. Afrika' ya tanıtılmış ve buradan farklı tropik ve

subtropik ortamlara yayılmıştır. *P. peruviana* deniz seviyesinden 3300 m olan yükseltilerde yabani olarak büyüebilmektedir. Üretimi yüksek oranda aile yetiştiriciliğinde küçük parsellerde yapılmaktadır (Puente ve ark., 2011).

P. peruviana otsu, yarı çalı, boyuna büyüyen, subtropik bölgelerde çok yıllık olan, 60-90 cm, bazen de 180 cm uzunluğa erişebilen bir bitkidir. Morumsu yayılcı dalları tüylerle kaplıdır.

Kalp şekilli, neredeyse karşılıklı yaprakları, 5-15 cm'e kadar uzayabilmektedir. Çan şeklinde boğumlu çiçekleri yaprak koltuklarında oluşmaktadır. Çiçekler boğazdan itibaren koyu mor-kahverengi noktalı sarı renklidir ve morumsu-yeşil tüylü kaliks ile kaplıdır. Çiçekleri böcek ve rüzgar tarafından veya kendine tozlanma ile kolaylıkla tozlanmaktadır. Meyve tomurcukları, 12-13 tane gövde boğumunun oluşumundan sonra meydana gelmektedir. Meyve oval şekilli, sulu etli, zarsız, kabuksudur ve 1.25-2.50 cm arası boyutlarda, 4-10 g ağırlığında, içerisinde 100-200 tane tohum içermektedir. Meyve yüzeyi meyvenin %95'ini kapsamaktadır. Bu yüzey temelde reçine bileşimi olan mumsu bir filmidir. Meyve büyümesi ve olgunlaşması boyunca kendisini tamamen saran kaliks ile korunmaktadır. Çiçek dökümünden sonra kaliks gelişir ve saman renginde, meyveden biraz büyük bir tür kılıf oluşturur (Şekil 1.1). Bu kılıfın olgunlaşması, uygun koşullarda, 70-80 günü bulmaktadır (Martinez, 1998; Puente ve ark., 2011). Kaliks, meyveyi böcek, kuş, hastalık ve olumsuz iklim durumlarından korumaktadır. Aynı zamanda bu yapı büyüme ve gelişmenin ilk 20 gününde önemli bir karbondioksit kaynağı olmaktadır (Puente ve ark., 2011).

Lezzetli meyveleri çok iyi depolanabilmekte ve çekici şekli ile perspektif bir ürün olmaktadır. Yetiştiriciliğinde temel faktör çevresel koşullardır. Bu ürünün yetiştiriciliğini sınırlandıran çevresel koşullardan en önemlisi ise sıcaklıktır. Yaprak ve kök kuru madde üretimi için en uygun sıcaklığın gündüz 22 °C; gece 14 °C olduğu tespit edilmiştir. Optimum meyve verimi ve meyve taze ağırlığı 29°C'de olmaktadır (Popoya ve ark., 2010).

P. peruviana düşük sıcaklıklara dayanabilmekte, fakat 0 °C'nin aşağısında onarılamaz zarar görmektedir. Kışın don olan yörelerde tek yıllık olarak yetiştirilmektedir. Bitki dona karşı hassastır ve -1 °C'ye varan sıcaklıklar bitkiyi öldürmektedir. Eğer sıcaklık 10 °C'nin altında olursa büyüme etkilenmektedir. Çok

yüksek sıcaklıklarda çiçeklenme ve meyve oluşumunu etkileyebilmektedir. *P. peruviana* yüksek ışığa ihtiyaç duyar ve aşırı rüzgardan korunmalıdır. Büyüme başlangıcında yeterli sulama yapılmalı, olgunlaşma sırasında ise kesilmelidir. Fakir topraklarda büyüebildiği için yüksek potansiyele sahip bir bitkidir, fakat iyi bir drenaja ve az gübrelemeye ihtiyaç duymaktadır. Bitki 5.5-7.3 pH değerlerine sahip olan, organik madde içeren, 1000-2000 mm yağış alan topraklara dayanabilmesine rağmen, en çok az asitli olan topraklarda çok iyi yetişebilmektedir. Killi topraklarda yetiştirilmeye toleranslı değildir, çünkü yüzey köklere sahiptir (Puente ve ark., 2011).

İyi yetiştiricilik yapıldığında tek bir bitki 300 meyve verebilmekte ve dekar başına 2-3 ton ürün alınabilmektedir (Ramadan ve Moersel, 2003; Sharoba ve Ramadan, 2009).

Çabuk çimlenip büyüyen ve meyve veren bir bitki olduğundan, ilkbahar başı çimlendirilen tohumlarından aynı yılın yaz mevsiminde meyve vermeye başlamaktadır. Don oluncaya kadar meyve vermeye devam eder (Martinez, 1998). Çimlenmeye başlama ile son ürün arasında yaklaşık olarak 9 ay geçmektedir. Elverişli üretimde en ideal üretim süresi son hasada kadar 9-11 ay olmalıdır, çünkü hem üretimi hem de meyve kalitesi, yetiştirme süresi uzaması durumunda azalmaktadır. Kaliksli meyvesinin raf ömrü 1 ayken, kaliksiz 4 veya 5 gündür (Puente ve ark., 2011).

Altın çilek meyveleri genellikle taze olarak tüketilmektedir. Meyve ve sebze salatalarında asit-tatlı dengesi sağlamaktadır. Aynı zamanda, meyve şurup içinde kullanılabilir ve kuru üzüm gibi kurutulabilmektedir. Kurutulmuş altın çilek, yüksek oranda lif ihtiva etmektedir. Meyve et ve deniz ürünlerinde sos olarak da kullanılmaktadır. Reçel ve jellerde de kullanılabilir. Meyvesi kaplama, çikolata kaplı şekerleme gibi farklı şekillerde işlenmektedir. Aynı zamanda meyve suyu ve şekeri ile diğer ürünleri tatlandırma da kullanılmaktadır. Avrupa pazarında yemekleri süslemede, salatalarda, tatlılarda ve keklerde kullanılmaktadır (Puente ve ark., 2011).

Valdenegro ve ark. (2012) altın çileğin vitamin C, karotenoidler ve fenolik bileşiklerce çok zengin bir meyve olduğunu bildirmiştir. Fitokimyasal araştırmalarda,

ekstraktlarında temel bileşikler olan; flavonoidler, saponinler ve fenollerin de bulunduğu tespit edilmiştir (Arun ve Asha, 2006).

Meyve içeriğindeki mineral maddeleri; potasyum (565 mg), sodyum (2. 8 mg), çinko (8. 2 mg) ve magnezyum (2.8 mg) oluşturmaktadır. Özellikle potasyum içeriği bakımından zengin meyvelerden biri olup, sıralamada enginar (860 mg), maydanoz (727 mg) gibi sebzelerden sonra gelmektedir. Ayrıca, önemli derecede vitamin A (karoten) ve C, B1, B2, B3 gibi vitaminler açısından zengin bir meyvedir (Fischer, 1995). Meyve yoğun bir şekilde zengin olan provitamin A, mineral ve bazı B kompleks vitamin kaynağı olarak da kullanılmaktadır. Meyve yaklaşık %15 çözünür kuru madde (temelde şeker) içermektedir ve bu yüksek fruktoz değeri diyabet hastaları için değerli niteliktedir. Zengin lif içeriği ile de meyve pektini sindirimi düzenleyici ve yaşlanmayı geciktirici etki yaparak önem kazanmaktadır. Anti ülser özelliğine ve kolesterol seviyesini azaltan özelliğe de sahiptir (Sharoba ve Ramadan, 2009).

Dünya’da, halk arasında tıbbi bitki olarak yoğun bir şekilde kullanılmaktadır. Alternatif tıpta; kanser, lösemi, deri, şeker, kalp, verem, sıtma, astım, hepatit ve idrar yolu hastalıklarının tedavisinde uzun yıllar kullanılan bir bitkidir. Tıbbi birçok alanda kullanımı giderek yaygınlaşmaktadır (Ramadan ve Moersel, 2004). Diabete karşı günde 5 adet altın çilek meyvesi tüketilmesi gerektiği rapor edilmiştir (Rodriguez ve Rodriguez, 2007).

Altın çilek, 2 önemli biyoaktif bileşiğe (physalin ve glikozit) sahiptir. Bu bileşiklerin antikanser aktiviteleri vardır. Ham meyvelerde ishale neden olan, solanin alkaloidini de içermektedir (Wu ve ark., 2006).

P. peruviana ekstraktlarının, yüksek oranda anti-oksidad ve anti-iltihap etkileri göstermiş oldukları görülmüştür. Toprak üstü kısımlarından; 7 yeni withanolid (phyperunolid A, phyperunolid B, phyperunolid C, phyperunolid D, phyperunolid E, phyperunolid F ve peruvianoksid) izole edilirken, önceki çalışmalarda 4 β -hiroksiwithanolid E, withanolid E, withanolid S, withanolid C, withaperuvin, physalolakton, withaphysanolid, physalakton, withaperuvin D ve loliolidin de izole edildiği kaydedilmiştir. Bu bileşiklerden; phyperunolid A, 4 β -hiroksiwithanolid E, withanolid E, withanolid C’nin meme, akciğer kanseri ve hepatit hücre hatlarına karşı sitotoksite göstermiştir (Lan ve ark., 2009).

Önemli çeşitleri;

- ✓ **Giant:** İri, altın portakal renkli meyveleri, çok lezzetli olmasıyla beraber yaklaşık 2.5 cm'dir. Kuvvetli yayılan bitki, 3-5 m uzunluğuna kadar büyümektedir. Uzun büyüme sezonuna ihtiyaç duymaktadır.
- ✓ **Giant Poha Berry:** Meyve yaklaşık 2.5 cm'dir. Yaprakları karışık, yeşil-gri ve diğer *Physalis* türlerinden farklıdır. Bitki 1-2.5 m uzunluğuna kadar büyümektedir.
- ✓ **Golden Berry:** Meyve yaklaşık 2.5 cm'dir, bazen 5 cm'e kadar büyür. Meyve eti çok tatlı ve lezzetlidir. Meyvenin suyu, renkte ve tat yoğunluğunda portakal suyuna benzer. Kurutulmuş meyveler kek yapımında kullanılmaktadır.
- ✓ **Long Aston:** Goldenberry seleksiyonudur. Altına benzeyen meyvenin diğer tiplere göre olağanüstü özelliklere sahip olduğu söylenmektedir.

Bitkilerin tohumlarını veya *in situ* bitki organlarını bazı kimyasal maddelerle uygulamaya tabi tutularak, yeni genotiplerin oluşmasını sağlanması amacıyla geleneksel yöntemler kullanılmaktadır (Şehirli ve Yazgan, 1986). Günümüzde bitki ıslahçıları tarafından kullanılan kimyasal maddeler; kolhisin, orizalin ve triflurolin gibi mitotik inhibitörlerdir.

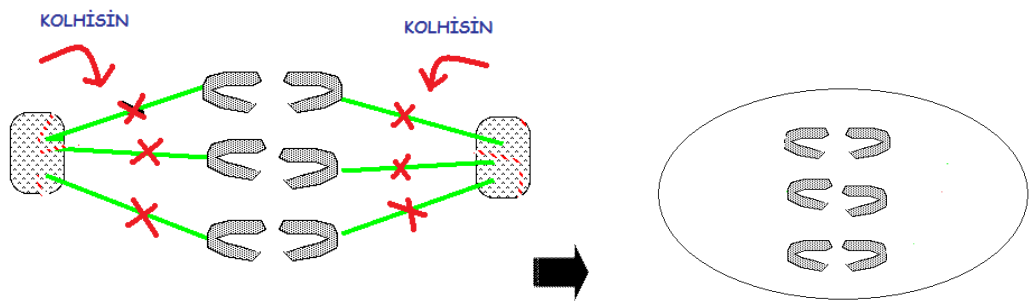
Kolhisin *Colchicum autumnale* (güz çiğdemi) tohum ve yumrularından elde edilen ve aynı zamanda *Merendera*, *Androcymbium*, *Gloriosa* ve *Littonia* cinslerinde de bulunan bir alkaloiddir (Bhattacharyya ve ark., 2008; Ghosh ve Jha, 2008; Lehrer ve ark., 2008). Alkaloidler bazik, azot atomları içeren ve doğal olarak oluşan fizyolojik olarak aktif olan kimyasal bileşiklerdir. Apocynaceae, Rubiaceae, Solanaceae, Papaveraceae familyalarında bol miktarda bulunmaktadır. Elde edildiği bitkinin kendisine veya cinsine özgü, içeriğinde kullanılacak kimyasalın yaygın ismine göre, fizyolojik etkilerine veya keşfeden araştırmacıya göre isimlendirilmektedir. Alkaloidler, acı ve zehirli olmaları sebebiyle böcek ve otçullara karşı koruyucu özelliktedir. Bazı durumlarda detoksifikasyon (arındırma) reaksiyonlarında atık ürün olmaktadır. Azotun az olması halinde iyi bir azot kaynağı, karbondioksit asimilasyonunun az olduğu durumlarda ise enerji kaynağı olarak

kullanılabilmektedir. Temel metabolik sistemlerde büyümeyi düzenleyici olarak da görev almaktadır. Suda çözünenler ve organik çözücüde çözünenler olmak üzere gruplandırılabilir. Nötr bir alkaloid olan kolhisinde suda kolaylıkla çözünebilmektedir. Soluk sarı renktedir ve ışığa duyarlı olup maruz kalması durumunda renginde koyulaşma meydana gelmektedir (www.faculty.ksu.edu.sa/.../Alkaloids/Alkaloids-Introduction-1; www.faculty.ksu.edu.sa/172454/322PHG/lectures 322.pdf).

Değişik bitki türlerinde *in vivo* ve *in vitro* koşullarında kolhisini uygulamada değişik yöntemler;

- a) *In vitro* kültüründe büyüme ortamına ekleme,
- b) Haploid bitkilerin aksiller tomurcuklarına damlatıcı ile uygulama,
- c) *In vitro* bitkicikler veya bunların çelikleri belli bir süre kolhisin çözeltisi içinde bekletme,
- d) *In vivo* koşullarda bitkilerin tepe tomurcukları kolhisin çözeltisi içerisinde tutma kullanılabilmektedir.

Kolhisin bitkilerde hücre bölünmesinin metafaz evresindeki kromozomları ayrıştırmada etkili olması nedeniyle en fazla kullanılan mitotik inhibitördür (Bhattacharyya ve ark., 2008). Kromozomların bütün setlerini azaltmak veya arttırmak, ıslah ve genetik çalışmalarda yeni genetik varyasyon yaratmak ve değişmiş genotipler üretmek için güçlü bir mekanizmadır (Pegtel, 1999).



Şekil 1. 1. Kolhisinin hücre bölünmesine etkisi

Poliploidi, bir hücrenin veya bir canlının, her bir kromozomunun (n) ikiden fazla kopyasına sahip olması durumudur. Organizmalar çoğunlukla diploid olmakla birlikte, hücre bölünmesinin normal olarak gerektiği gibi olmamasının sonucunda, poliploid hücreler ortaya çıkabilmektedir. Poliploidler, kromozom takımı sayısının

katlar şeklinde artması şeklinde oluşmaktadır; diploid (2n), triploid (3n), tetraploid (4n), pentaploid (5n), heksaploid (6n)... şeklinde devam etmektedir.

Bitki ıslahçıları, verimi artırmak, meyve büyüklüğü veya gücü gibi niteliklerinin iyileştirilmesi ve bitkilerin özellikle yetiştirme koşullarına adaptasyonunun arttırılması sebebiyle poliploidiyi teşvik için çalışmaktadırlar. Çekirdeksiz karpuz ve daha büyük çekirdeksiz üzüm bunlara örnektir. Bazı durumlarda oluşan poliploidi çiçek, tohum veya meyve iriliğini fotosentez veya solunum oranını ve ekstrem sıcaklıklara, kuraklık ve su taşkınlarına dayanımı arttırmıştır (Hunter ve Hunter, 2004). Poliploid bitkiler daha büyük hücelere ve daha fazla klorofil miktarına sahip olduklarından, koyu yeşil renkleriyle dikkati çekmektedir (Molin ve ark., 1982; İlarıslan, 1990; Kehr 1996; Rubuluza ve ark., 2007). Kromozom sayısındaki artış, bazen temel ikincil metabolitlerini ve koruyucu madde konsantrasyonlarını arttırabilmektedir (Dhawan ve Lavania, 1996). Bununla birlikte bu teknik miksoploid hücreleri yani; diploid ve tetraploid hücre veya dokuları içeren kimera bitkileri de oluşturmaktadır.

Kolhisin bitkilerde poliploidinin teşviki için geniş kapsamlı olarak kullanılmaktadır. Ancak en yoğun çalışmalarının yapıldığı genom katlamasının yanında kolhisin, bitki dokuları veya hücrelerinin büyüme gelişme aşamalarını da etkileyebilen bir bileşiktir. Aynı zamanda bu bileşik bir mutajen olarak kullanılmakta, bu konuda çok az çalışma yapılmış olsa da araştırmalarda kromozom sayılarında herhangi bir artışla ilişkilendirilmeyen genetik değişikliklerin olduğu bildirilmektedir. Bu durumda bitkilerin agronomik özelliklerini arttırmada önemli bir araç durumuna gelmiştir. Farklı bitkilerin arzulanan özellikleri için genetik değişkenliği arttırması ile mutasyon ıslahındaki rolü birçok araştırmacı tarafından kanıtlanmıştır. Kolhisin uygulaması sonucu tolere edilemeyen ölümlere rağmen, bu tip genetik manipölasyonlarla ticari bitki ıslahında büyüklük, hızlı büyüme ve diploidlerde daha fazla olması arzulanan özellikler kazandırması nedeniyle kullanılmaktadır (Andrea ve ark., 2006; Roychowdhury ve Tah, 2011).

Antimitotik ajanların başarılı kullanımı, yüksek meristematik aktivitedeki kısımlarında poliploid hücrelerin oluşumuna sebep olabilmektedir. Bu maddelerin uygulanması özel alet-ekipman gerektirmemekte ve göreceli olarak da güvenli olmaktadır (Lehrer ve ark., 2008).

Antimitotik ajanlardaki farklılıklar yanında kromozom katlama protokolleri, eksplant tipi, mitotik ajanın uygulama süresi, konsantrasyonu ve uygulama yöntemi ile değişmektedir. Farklı bitki türleri veya çalışılacak türün farklı eksplant tipleri; küçük bitkicikler, sürgünler tomurcuk veya sürgün uçları, kallus, somatik veya zigotik embriyolar tohum, fide, boğum ve yumru parçaları başarıyla kullanılmıştır. Kolhisin uygulamalarıyla poliploid bitki elde etme frekansı düşüktür, yüksek oranda kimeralar görülür ve zayıf tohum tutumuyla sonuçlanmaktadır. Bu nedenle optimum kolhisin konsantrasyonu ve uygulama süresini deneysel olarak belirlemek gerekmektedir. Çünkü kolhisin duyarlılığı türe özeldir. Diğer bir ifadeyle poliploidi uyarımı için kolhisin konsantrasyonu bitki türüne göre değişmektedir (Omidbaigi ve ark., 2010). Uygun eksplant tipinin bulunabilmesi için her bitki türünde birçok eksplant tipi test edilmelidir. Çünkü kolhisinin etkinliği eksplant dokunun geçirgenliği ve antimitotik ajanın meristeme taşınma yeteneğine ve ayrıca eksplantın tepkisi genotipe bağlı olarak da değişmektedir. Antimitotik ajanın konsantrasyon ve uygulama süresi önemli parametreler olup, aralarında belirgin bir etkileşim mevcuttur. Düşük dozlar başarısız olurken aşırı yüksek dozlarda öldürücü olmaktadır. Kimyasalın çözündürüldüğü çözücü de önemlidir. Mitotik inhibitörün uygulama yöntemlerinden birisi de apikal meristeme damlatılmasıdır. Alternatif olarak tohumlar antimitotik solüsyonlara daldırılabilir. Bu iki yöntem *in vitro* uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. İnhibitör doku kültürlerinde besin ortamına eklendiğinde poliploidizasyon prosedürünün kültüre başlama ve klonal çoğaltma aşamalarını da içeren *in vitro* protokolle birleştirilmesi gerekir (Dhooghe ve ark., 2010).

Daha önceki çalışmalarda çalışılan her bitki için uygun kolhisin konsantrasyonu ve uygulama süresi birbirinden çok farklı bulunduğundan her bitki için optimum doz ve sürenin belirlenmesi önem arz etmektedir. Bitki türlerinin kolhisine olan duyarlılıkları farklı olduğundan optimum konsantrasyon ve uygulama süresi her tür için deneysel olarak tespit edilmelidir.

Ülkemizde son yıllarda sıkça gündeme gelen altın çilek konusunda bilimsel araştırmalar açısından eksiklik olduğu, özellikle verimliliğin artırılması, meyve iriliğinin, ikincil metabolitlerin ve biyokimyasal profillerin miktarının daha da artırılması konularında çalışmaların önemli olduğu düşünülmektedir.

Bu çalışmada, altın çilek bitkilerinde *in vivo* koşullarda farklı yöntemlerle, farklı konsantrasyon ve uygulama sürelerinde uygulanan kolhisinin, özellikle poliploidi oluşumuna ve bazı bitki morfolojik özelliklerine etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Kolhisin poliploid bitki üretiminde uzun zamandan beri kullanılmaktadır. Aynı zamanda mutajenik etmen olarak kullanıldığı, bitki morfolojisi, klorofil içeriği, sterilite ve verim üzerinde mutajenik etkileri birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir.

Tarımda ilk mitotik poliplodizasyon uygulaması 1930 yılında bildirilmiştir. Kolhisinin bitkilerde poliploidiyi teşvik ettiğinin belirlenmesinden sonra (Blakeslee ve Avery, 1937) kolhisinle uygulamalar bitkilerde genetik manipülasyon için önemli bir yöntem olmuştur. Bu ilk poliplodizasyon çalışması toprağa dikili bitkilerde yapılmıştır. Daha sonra kolhisinin en yaygın kullanılan iş ipliği inhibitörlerinden biri olduğu ve birçok bitkide poliploidiyi teşvik amacıyla başarıyla kullanıldığını bildirmişlerdir. Kolhisin bitkilerde genom katlamasında geniş kapsamlı olarak kullanılmasıyla birlikte, bir mutajen olarak ta kullanılmış fakat bu konuda çok az çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalarda kromozom sayılarında herhangi bir artışla ilişkilendirilmeyen genetik değişikliklerin olduğu tespit edilmiştir.

Pandey (1968), tütün (*Nicotiana*) tohumlarına kolhisin uygulamasından sonra elde edilen bitkilerin kendine uyumsuzluk özelliklerinde, genetik ve genetik olmayan değişiklikler meydana geldiğini bildirmiştir. Kolhisinin %0.25 konsantrasyon uygulamasında poliploid bitki oluştuğu, % 0.1 gibi düşük konsantrasyonunda ise poliploidi oluşmadığını, ancak uygulama yapılan diploid bitkilerin kendine uyşur özellik kazandığını belirlemiştir.

Farklı konsantrasyonlarda (100, 150, 200 mg l⁻¹) kolhisin içeren besi ortamlarında farklı sürelerde (4-16 gün) kültüre alınan Afrika menekşesi (*Saintpaulia ionantha*) eksplantlarına kolhisin uygulamaları ile 3 farklı ploidi seviyelerinde sürgünler elde edildiği bildirilmiştir. Tüm uygulamalardan farklı oranlarda poliploidi elde edilirken en yüksek poliploid oranı (% 46) 150 mg l⁻¹ konsantrasyonunda 4 gün tutulan eksplantlardan elde edilmiştir. Tüm uygulamalarda elde edilen bitkilerde % 9 kimera olduğu ve bitkilerin % 31.7'nin kolhisinden etkilendiği belirlenmiştir (Espino ve Vazquez, 1981).

Morfolojik olarak farklı iki *Citrus sinensis* (L.) Osbeck (tatlı portakal) embryogenic kültürleri % 0.01 veya % 0.1 kolhisin içeren Murashige ve Tucker (MT) besin ortamında 4 veya 12 hafta boyunca yetiştirilmiştir. Uygulama sonrası ölüm oranı yüksek olmuştur. Kolhisin uygulamaları, poliploid sıklığı ve poliploidi

düzenini arttırmıştır. Bir hat kısmen diploid hale geri dönmüş, ancak diğer hat sitogenetik olarak kararsız (stabil olmayan, dengesiz) kalmıştır. Kolhisinle indüklenen sitogenetik değişimin, rejenerasyon süreci boyunca azaltılmış olduğu belirlenmiştir. Uygulama yapılan kültürlerde 2n, 3n, 4n, 6n ve 8n hücreler ve somatik embriyo elde edilmesine karşın, yalnızca diploid ve tetraploid bitkiler rejenere olmuştur. Uygulama yapılmayan kültürler sadece diploid sürgünler oluşturmuştur (Frederick ve ark., 1991).

Cohen ve Yao (1996) *Zantedeschia* cinsi kültürlerinin *in vitro* gelişen sürgünlerini % 0.05 kolhisin içeren ortamda 1, 2 ve 4 gün süreyle kültüre almışlardır. Uygulamadan sonra sürgünlerin büyük kısmının öldüğünü, geri kalan sürgünlerin alt kültüre alınarak çoğaltıldığı bildirilmiştir. Kök ucu kromozom sayılarına göre 44 bitkinin 38'inin tetraploid, 2'sinin kimera ve 4 bitkinin diploid olduğu da belirlenmiştir.

Salvia miltiorrhiza (kırmızı adaçayı) kökü, özellikle kardiyovasküler hastalıkların tedavisi için geleneksel ilaç olarak kullanılan önemli bir şifalı bitkidir. *In vitro* ortamda geliştirilen bitkilerden elde edilen çelikler 5, 10, 50 ve 100 ppm kolhisin içeren ortamlarda 30 gün süreyle kültüre alınmıştır. Bitkilerde ploidi seviyeleri tespiti kök ucu kromozom sayımı yöntemiyle belirlenmiştir. Sonuçlar, 10 ppm kolhisinin bitkilerin % 30'nun ölümüne ve % 12 oranında tetraploid bitki üretimine neden olduğunu göstermiştir. Kolhisin dozunun 50 ppm olması durumunda bitkilerin ölüm oranının % 60'a yükseldiği ve poliploid bitki oranının % 6'ya düştüğü belirlenmiştir. Meydana gelen tetraploid bitkilerde agronomik özelliklerinin değişiminin belirlenmesi konusunda yapılan çalışmada iki tetraploid bitkide önemli kimyasal bileşik olan *tanshinones* içeriğinin kontrol bitkilerinden daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca tetraploid bitkilerin birim alan için daha çok kök (*tanshinones* üretiminde önemli organ olan) oluşturduğu da tespit edilmiştir (Gao ve ark., 1996).

Allium fistulosum L. (soğan) X *A. cepa* L. (gal soğanı) arasındaki türler arası melezler *A. cepa* içine *A. fistulosum*'dan gelen istenilen özelliklerin aktarılmasına imkan sağlamaktadır. *A. fistulosum*'da bulunan ve *A. cepa* da istenilen özellikler; yaprak çürüklüğü (*Botrytis squamosa*), boyun çürüklüğü (*Botrytis allii*), pembe kök (*Pyrenochaeta terrestris*), soğan sineği (*Delia antiqua*) ve thrips (*Thrips tabaci*),

yanı sıra, yüksek çözünebilir kuru madde içermekte ve soğuklara daha yüksek toleransları içermektedir. Ancak, türler arası melezler iki tür arasında kromozom farklılığı nedeniyle steril veya düşük fertiliteye sahiptir. Bu durum soğan ıslahında genetik kaynak olarak kullanımlarını kısıtlamaktadır. Türler arası melezlerde fertilité büyük oranda kromozomların katlanmasıyla düzeltilebilmektedir. Bu amaçla *A. fistulosum* X *A. cepa* diploid melezinde *in vitro*'da elde edilen kalluslara, kromozom katlaması için kolhisin uygulanmıştır. Kalluslar % 0.05, 0.1 ve 0.2 konsantrasyonlarında 36, 48 ve 72 saat tutulmuştur. Uygulama sonrası hayatta kalan kallus sayısı artan kolhisin konsantrasyonu ile azalmıştır. Kalluslarda yaşama oranı % 0.05, 0.1 ve 0.2 kolhisin konsantrasyonları için sırasıyla % 87, 84 ve 76 olmuştur. Her bir konsantrasyon için hayatta kalan kallus sayısı uygulama süresi arttıkça azalmıştır. Sürgün oluşumu üzerine kolhisinin etkisi kallusta gözlenen sonuçlara benzer bulunmuştur. Canlı kalan kalluslardan rejenere olan sürgünlerin sayısı artan kolhisin konsantrasyonu ile azalmıştır. Kontrol, % 0.05, 0.1 ve 0.2 kolhisin konsantrasyonlarında, rejenere olan kallus sayıları sırasıyla % 72, 31, 28 ve 22 olarak belirlenmiştir. Uygulama süresinin 36 saatten 72 saate çıkarılması sürgün üretim frekansının % 36'dan % 17'ye azalmasıyla sonuçlanmıştır. En yüksek tetraploid bitki sayısı % 0.1 veya 0.2 kolhisin ile 48 veya 72 saat uygulanan kalluslardan elde edilmiştir (Song ve ark., 1997).

In vitro koşullarda dut (*Morus alba* L.) apikal tomurcuklarına kolhisin uygulamalarında (% 0.05, 0.1 ve 0.2 - 24 saat); %0.1 kolhisin kullanılması % 39.4, % 0.2 kolhisin %16.7 oranında tetraploidi ile sonuçlanmıştır. Tetraploid bitkilerin stoma sayıları, diploidlere göre daha fazla sayıda belirlenmiştir (Chakraborti ve ark., 1998).

Vainola (1999) *in vitro*'da yetiştirilen 3 farklı ormangülü (*Rhododendron*) çeşidinde, kolhisin ve orizalin uygulamalarının etkileri araştırmıştır. Kimyasallar 24 ve 48 saat uygulanmıştır. Bitkiler, kolhisine karşı, orizaline göre daha iyi tepkiler vermiştir. İki konsantrasyonun yüksek uygulamaları da bitkileri öldürmüştür. Denemede orizalin uygulanan bitkilerde yaşama oranının sıfır olduğu, kolhisinin de 48 saatlik uygulamasının yıkıcı etkisi gözlenmiştir. Ploidi seviyeleri flow sitometride ölçülmüştür. Orizalin uygulamaları ploidi seviyesini kolhisine göre daha fazla etkilemiştir, ancak genel olarak deneme süreleri boyunca konsantrasyonların dikkate

değer bir etkisi olmamıştır. Yaşayan % 18.2'lik bitki içerisinde, 24 saat % 0.005 orizalin uygulamasından büyük oranda tetraploid elde edilmiştir.

Mitotik inhibitörlerin uygulanması ile katlamanın gerçekleşip gerçekleşmediğinin tespiti için ploidi seviyesinin belirlenmesinde hızlı ve kolay olması bakımından flow sitometri avantajlı bir yöntem sunmaktadır. Ploidi belirlenmesi için klasik kromozom sayımları iyi bir laboratuvar altyapısı ve deneyimli elemana ihtiyaç göstermekte; bu koşullar sağlansa bile bazı bitki türlerinde kromozom sayımlarının çok güç olması nedeniyle bazen olanaksız olabilmektedir. Diğer yöntemlerin de etkili olarak çalışmadığı durumlarda flow sitometri, güvenilir ve geçerli sonuçlar sunmaktadır. Flow sitometri, hücrelerin tek tek floresan dedektörden geçerken emdiklerin ışının analizine dayanan bir yöntemdir. Her bitki türü için yöntemin optimize edilme gereksinimi, bu yöntemin dezavantajlarından biri olsa da; miksploid hücrelerin varlığının ortaya çıkartılması, bir kişinin günde 100'den fazla bitkide analiz yapabilme olanağını sunması gibi avantajları, flow sitometrinin günümüzde kromozom sayımlarının yapılması için en fazla tercih edilen yöntem haline gelmesine neden olmuştur (Ellialtıoğlu ve ark., 2000).

Adaniya ve Shirai (2001) *Zingiber officinale* Roscoe (zencefil) sürgün uçları % 0.2 kolhisin içeren agar ortamında 4, 8, 12 ve 14 gün kültüre almışlardır. Aynı yaprak primordiumlarında veya bitkide diploid ve tetraploid hücreler (kimeralar) belirlenmiştir. En yüksek tetraploid oranının (% 36.5) % 0.2 kolhisin solusyonunda 8 gün kültüre alınan eksplantlardan elde edildiğini ve tetraploid bitkilerin diploidlerine göre daha büyük bitkiler ve rizomlar oluşturduğu aynı zamanda daha yüksek polen fertilititesi ve çimlenme oranına sahip olduğunu bildirmişlerdir. İleriki çalışmalarda elde edilen tetraploid bitkilerin ikincil metabolitlerinin verimliliği dikkate alınarak üretimde doğrudan kullanılabilir olup olmadığının, ayrıca tohum bağlama ve polen fertilititesiyle ilgili sitolojik mekanizmasının araştırması gerekli olduğu bildirilmiştir.

Mutasyon ıslahı bitkilerde meyve olgunlaşması, meyve rengi, kendine verimlilik, kendi kendine meyve seyreltme, patojenlere direnç, çiçek ve bitki boyutunu etkileyen birçok yararlı özelliklerin geliştirilmesi için kullanılmıştır. Bu özelliklerin çoğu birçok meyve türünde değerli olmaya devam etmektedir. Mutasyonla geliştirilen çeşitlerin sayısı sürekli artmaktadır ve 1995 yılına kadar mutasyonla 150'den fazla bitki türünde yaklaşık 1700 mutasyonla geliştirilen çeşit

bildirilmiştir. Bu sayı 1999 yılı sonuna kadar ise 20'den fazla farklı türe ait meyvelerin yaklaşık 50 çeşidi de dahil olmak üzere, yaklaşık 2000'e çıkmıştır. Mutasyonla geliştirilen özelliklere verilecek bazı örnekler; elmada meyve iriliği, rengi, erkencilik ve bodurluk, bademde geççilik, kayısıda erkencilik, üzümde erkencilik, altıtopta meyve rengi ve çekirdeksizlik, japon armutlarında hastalıklara dayanıklılık, yenidoğnyada meyve iriliği, portakal ve mandarinlerde çekirdeksizlik, meyve kalitesi ve tutumu, şeftalide verim ve meyve iriliği, erikte erkencilik, vişnede bodurluk, meyve tutumu, kirazda kompakt büyüme ve meyve iriliğidir (Predieri, 2001).

Kadota ve Niimi (2002), *in vitro* gelişen japon armudu (*Pyrus pyrifolia* N.) sürgünleri 5 mm uzunluğunda kesilerek 1, 2, 4 ve 8 gün süreyle % 0.01 (0.25 mM) ve % 0.1 (2.5 mM) kolhisin içeren ortamda kültüre alınmıştır. Kolhisin sürgünlerin yaşama oranını önemli şekilde etkilemiştir. Kolhisinin % 0.01 konsantrasyonunda 8 gün süreyle uygulandığı sürgünlerin tamamı ölmüştür. Aynı konsantrasyonda 1 ve 4 gün tutulan sürgünlerin yaklaşık % 50'sinin öldüğü belirlenmiştir. Gelişmeye devam eden sürgünler içinde % 0.01 kolhisinin 1 ve 4 gün uygulamasından birer ve 2 gün uygulamasından 2 miksploid (2n ve 4n hücre içeren) sürgün belirlenmiştir.

Nanede (*Mentha longifolia*) *in vitro* sürgünlerden tek boğum eksplantları ve sürgün uçları 100 ve 150 mg/l kolhisin içeren besin ortamlarında 5, 7 ve 10 gün süreyle yetiştirilmiş, bu uygulamanın ardından kolhisin içermeyen taze besin ortamlarına aktarılmıştır. Kolhisin uygulamalarında hem sürgün ucu, hem de tek boğum eksplantının kullanılabilceği, eksplantların 5 gün 100 mg/l kolhisin uygulamasının ardından kolhisin içermeyen ortamlara aktarılması halinde % 25-27 oranında poliploid bitkiler elde edilebileceği bildirilmiştir. Kolhisin uygulamaları sonucunda değişik ploidi düzeyleri ve bazı bitkilerin ise miksploid yapıda oldukları belirlenmiştir. Uygulama süresinin 10 güne çıkarılması hem gelişme oranını, hem de dikilen eksplant başına elde edilen poliploid bitki oranını düşürmüştür. Ayrıca yaprak morfolojileri de incelenerek stoma sayısı ile kromozom sayısı arasında bir ilişki kurulabileceği saptanmıştır (Tepe ve ark., 2002).

Seneviratne ve ark. (2002) kolhisinin, aktif olarak büyümekte ve bölünmekte olan hücrelere uygulandığında kimyasal mutajen olarak etkilediğini ve hücrenin kromozom sayısını katladığını belirtmişlerdir. Afrika menekşesinde (*Saintpaulia*

ionantha) farklı çiçeklere sahip bitkiler elde edilmek amacıyla % 0.025, 0.04, 0.05, 0.06, 0.1 konsantrasyon ve 18, 23.5, 27, 43, 47 ve 117 saat süreyle yaprak dipleri (sap kısmı) kolhisin solusyonuna batırılmıştır. Elde edilen yeni bitkilerde morfolojik bakımından farklı doz ve sürelerde farklı bitki büyüklüğü, yaprak şekli ve iriliği, çiçek rengi, şekli ve iriliği bakımından poliploidiye bağlanan mutasyonlar bildirilmiştir.

Yetiştir ve Sarı (2003) haploid kavunlarda (*Cucumis melo*) *in vivo* ve *in vitro* kolhisin uygulamaları denemiştir. *In vitro* gelişen haploid bitki çelikleri % 0,5 kolhisin solüsyonuna 2 saat daldırılmıştır. *In vivo* koşullarda serada yetişen haploid bitkilerin gövdesi yaklaşık 50 cm'e ulaştığında lateral tomurcuklar ve 5-10 cm boyunda sürgün ucu aynı konsantrasyonda kolhisin solüsyonunda 2 saat bekletilmiştir. Bitkilerin sürgün uçlarının kolhisine daldırılmasıyla en yüksek kromozom katlanma oranı sağlanmıştır. Bu yöntemle % 89 oranda dihaploid bitki elde edilmiştir. Normal büyüklükte çiçek ve yapraklar oluşmuştur. Kolhisinin *in vitro* uygulaması ile sadece % 21.7 bitki dihaploid olmuştur. Lateral tomurcuklara damlatıcı ile kolhisin uygulaması dihaploidizasyonda etkili olmamıştır.

Süs bitkisi olarak kullanılan narda (*Punica granatum*) 10 mg l⁻¹ kolhisin içeren ortamda 30 gün kültüre alınan sürgün uçları % 20 oranında tetraploid sürgün oluşturmuştur. Sürgünlerin 5000 mg l⁻¹ kolhisin konsantrasyonunda 114 gün kültüre alınmasıyla tetraploid sürgün elde edilmemiş ancak bu konsantrasyonda 96 saat uygulaması kimeralara neden olmuştur (Shao ve ark., 2003).

Kermani ve ark. (2003) kolhisinin bitkilerde özellikle, kromozomları katlama amacıyla uzun zamandır kullanılmakta olduğunu, ancak kromozom kayıpları, yeniden düzenleme ve gen mutasyonları gibi yan etkilere neden olduğunu bildirmektedir. Diploid gül (*Rosa L.*) sürgün uçları *in vitro*'da 5 ve 15 mM konsantrasyonunda orizalin ile 24 saat ve 14, 21 ve 28 gün kültüre alınmıştır. En yüksek oranda (% 40) tetraploid sürgün 14 gün süresince 5 mM orizalin uygulanan sürgün uçlarından elde edilmiştir. Yaklaşık 1 mm büyüklüğündeki nodal eksplantlar ise 24 saat 5 mM orizaline maruz kaldıktan sonra en yüksek % 66 oranında tetraploid sürgünler elde edilebilmiştir. Kromozom katlama yaprakların kalınlığının artışı ve koyu yeşil renklenme ile sonuçlanmıştır.

Kolhisin uygulamaları sonucu elde edilecek poliploidler, genetik ürünleri iki katına çıkıldığından ıslah çalışmaları için daha geniş bir gen tabanı sağlanmaktadır. *Alocasia* (fil kulağı) *in vitro* sürgün uçları % 0.01, 0.05 ve 0.1 kolhisin ve % 0.005, 0.01 ve 0.05 orizalin solüsyonunda 24, 48 ve 72 saat tutulduktan sonra *in vitro* kültüre alınmıştır. Kolhisin veya orizalin uygulamalarından sonra eksplant canlılığı konsantrasyona ve uygulama süresine bağlı olarak değişmiş ve yüksek konsantrasyonun uzun sürede bekletilen sürgün uçlarının yaşamasını azaltmıştır. Özellikle % 0.1 kolhisin çok yüksek oranda toksik olmuş ve eksplantların tamamı ölmüştür. Orizalin uygulamalarında en iyi sonuç 24 saat % 0.01 uygulamasında % 15,4 tetraploid olarak belirlenmiştir. Kolhisin için 24 saat süreyle düşük konsantrasyon (% 0.01) % 10.5 tetraploid ile sonuçlanmıştır. Kolhisinin % 0.05 veya daha yüksek dozları çoğunlukla kimeralarla sonuçlanmıştır (Thao ve ark., 2003).

Stanys ve ark., (2003) japon ayvasında (*Chaenomeles japonica*) yapraksız iki nod içeren 3-5 cm uzunluğundaki sürgünler farklı konsantrasyonlarda kolhisin ve orizalin içeren sıvı ortamda 1-2 gün süreyle tutulmuştur. Tohumlardan izole edilen kotiledonlar ise 4, 6, 8 ve 10 gün süreyle muamele edilmiştir. Kolhisin ve orizalini uygulama süresine göre konsantrasyonunun daha etkili olduğu ve genotip farklılıkların önemli olduğu gözlenmiştir. Düşük orizalin konsantrasyonları morfonogenez üzerinde hiçbir etkisi olmamıştır. Bitkilerde değişen kromozom sayıları, 25-38 mM kolhisin ve 10-50 μ M orizalin konsantrasyonlarından elde edilmiştir. Stoma uzunluğunun Japon ayvasında tetraploid belirlenmesi için uygun bir parametre olduğu saptanmıştır. Aynı klonunun tetraploid sürgünlerinin stomaları diploidlere kıyasla yaklaşık 1/3 daha uzun olmuştur. Bu poliploidizasyon yoluyla meyve büyüklüğünde önemli bir artış elde edilememiş, fakat tetraploidlerde tohum miktarının azaldığı ve meyve eti oranında bir artış olduğu belirlenmiştir.

Joshi ve Verma (2004), 8 saat % 0.005 kolhisin ile muamele edilen 30 bakla (*Vicia faba*) tohumundan elde edilen 15 bitkide kromozom katlaması tespit etmiştir. Bu yöntem ile poliploidi induksiyonu başarı oranı bu tür içinde şimdiye kadar kullanılan herhangi bir yöntemle karşılaştırıldığında çok yüksek (% 50) olduğu belirlenmiştir. Tohumların kolhisin uygulama öncesinde 20 saat süreyle damıtılmış suda bekletilmeleri poliploidi uyarmada daha etkili olmuştur. İndüklenen tetraploid bitkilerde diploidlere kıyasla büyük bitki, büyük yaprak, çiçek ve bakla vb gibi tipik

poliploid karakterleri gözlenmiştir, ancak tohum/bakla ve bitki polen verimliliği ve sayısı azalmıştır.

Bitkilerde kromozom katlaması yaygın olarak kolhisin kullanımı ile sağlanmıştır. Ancak bu alkaloid sadece bölünen hücreler üzerine etkili çalışmaktadır. Bu nedenle meydana gelebilecek poliplodizasyon, eksplantın bütün hücrelerinde eşit şekilde oluşmaz ve miksploidi, kimera oluşumuna neden olur. Bunun bir sonucu olarak, kalan diploid hücreler tetraploidlere göre daha yüksek oranlarda bölünmekte, poliploid durumun stabilitesi bozulmaktadır. Çünkü poliploidi genellikle, art arda gelen hücre bölünmeleri döngüsünden sonra diploid durumuna kısmen ya da tamamen döner. Bunun yanında kolhisin sterilite ve anormal bitki gelişimine neden olur. Bu nedenle son zamanlarda poliplodizasyon potansiyeli olan ve kolhisinden daha etkili olan orizalin kullanımı giderek yaygınlaşmıştır. Kolhisin ve orizalin ile poliplodilerin indüksiyonu çeşitli bitki türlerinin farklı doku ve organlarında kullanılmakta olduğu bildirilmiştir. *Bixa orellana* (annatto) bitkilerinde poliplodizasyon sağlamak amacıyla kültür ortamına kolhisin (0, 25, 250 ve 1250 μM) ve orizalin (0, 5 ve 30 μM) ilave edilmiş ve optimum uygulama süresini belirlemek için, eksplantlar 15 ve 30 gün süreyle bu ortamlarda geliştirilmiştir. Kolhisinin 250 ve 1250 μM konsantrasyonları eksplantların ölümüne neden olmuştur. Gelişen 108 sürgünden biri kolhisin (25 μM , 15 gün) uygulamasından olmak üzere yalnız 7 tanesinin poliploid olduğu belirlenmiştir (Carvalho ve ark., 2005).

Bazı zambak (*Liliaceae*) çeşitlerinin diploid genç çiçek tomurcuklarına, diploid yumurta (dişi gamet) elde etmek için % 0.02, 0.05, 0.1 ve 0.2 oranlarında kolhisin uygulanmıştır. Poliploid bitkiler, stoma büyüklüğü ve kromozom sayısı ölçülerek belirlenmiştir. Çalışma sonucunda; 2n yumurta hücrelerinin oluşumu sağlanmış ve uygulama yapılan genç çiçek tomurcukları başarılı bir şekilde dişi ebeveyn olarak kullanılmış ve bu yolla triploid döller elde edilebilmiştir (Wu ve ark., 2006).

Afrika'nın subtropik bölgelerinde ekolojik ve ekonomik öneme sahip olan mopane ağacı (*Colophospermum mopane*) tohumlarında, *in vitro* koşullarda kolhisin uygulamasının etkileri incelenmiştir. Tohumlar, MS ortamına alınmadan önce 24, 48 ve 96 saat süre ile % 0.05, 0.1 ve 1.0 kolhisin konsantrasyonlarına batırılmıştır. *In*

vitro 'da gelişen tohumların ploidi seviyelerine flow sitometride bakılmıştır. 48 saat bekletilmiş % 0.05 ve % 0.1 oranlarında kolhisin içeren konsantrasyonlarda sırasıyla % 86 ve % 100 tetraploid oluşmuştur. 48 ve 96 saat % 1.0 kolhisin uygulanmış fidelerde ise negatif etki görülmüştür. Kontrol bitkilerine kıyasla tetraploid bitkilerde, tohumlarda fazla sürgün oluşumu ya da fidelerde yoğun lateral sürgün oluşumu gibi morfolojik farklılıklar gözlenmiştir. Yüksek dozda ve uzun süre uygulanan kolhisin, fide büyümesini ve tetraploid üretimini engellemiş, ayrıca bodurluk gibi istenmeyen özellikler meydana getirmiştir (Rubuluza ve ark., 2007).

Lavanta (*Lavandula* L.) tohumları petri kaplarında, 0.5 mg ml^{-1} gibberellik asitle ıslatılmış ve farklı konsantrasyonlarda kolhisin solüsyonu ilave edilmiş filtre kağıtları üzerinde 7 gün süreyle çimlendirmeye bırakılmıştır. Her uygulama için 200 tohum içeren 3 petri kullanılmış ve deneme 2 kez tekrarlanmıştır. Tohumların çimlenmesi üzerinde kolhisinin çok az etkisi olduğu belirlenmesine karşılık fidelerin canlılık oranına bütün konsantrasyonların etkisi önemli olmuştur. Uygulamadan 55 gün sonra 1 g l^{-1} kolhisin uygulamasından hiçbir fide canlılığını sürdürememiş ve 3.6 mg l^{-1} uygulamasında yaşama oranı yaklaşık % 50 olmuştur. Kolhisinin 125 ve $15,6 \text{ mg l}^{-1}$ uygulamalarından hayatta kalan 2 bitkide daha iri çiçekler gözlenmiştir (Urwin ve ark., 2007).

Çınar (*Platanus acerifolia*) peyzajda kullanılan önemli bir ağaçtır. Süsleme niteliklerini geliştirmek için kolhisin uygulamaları ile tetraploidlerinin üretimi hedeflenmiştir. Kromozom katlamaları, önceden ıslatılmış tohumlara ve genç fidelerin apikal meristemlerine kolhisin uygulanması ile elde edilmiştir. Kolhisin % 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 ve 0.5 dozunda uygulanmıştır. Çimlenmemiş tohumlara uygulama tetraploid fide sayısı açısından daha etkili yöntem olmuştur. En yüksek tetraploid oranı (kök ucu kromozom sayımına göre % 40) kolhisinin % 0.4 konsantrasyonunda tohumlara uygulanmasıyla elde edilmiştir. Ancak bu yöntemde kolhisinin daha sonraki kök büyümesine zararlı etkileri nedeniyle, hiçbir olgun tetraploid bitki üretilenmemiştir. Kolhisin kotiledon aşamasında fidelerin apikal uçlarına doğrudan uygulandığı zaman yaprak ve gövde büyümesini geçici olarak etkilemiş daha sonra bitkiler büyümeye devam etmiştir (Liu ve ark., 2007).

Diğer bir çalışmada üç farklı kolhisin uygulama yöntemi çalışılmıştır. Birinci yöntem *Lespedeza* (çalı yonca) tohumlarına % 0.4, 0.2, 0.1, 0.05, 0.025 ve 0.01

kolhisin konsantrasyonları; 24, 36 ve 48 saat süreyle uygulanmıştır. İkinci yöntem de *in vitro*'da çimlendirilmiş fidelerin hipokotilleri kesilerek aynı konsantrasyonda kolhisin içeren besi ortamlarında 2, 4, 6, 8 ve 10 gün kültüre alınmıştır. Üçüncü yöntem ise yeni çimlendirilmiş fideler, aynı dozda kolhisin emdirilmiş tamponlara 24 ve 36 saat sarılarak bekletilmiştir. Sonuçlar en iyi yöntemim yeni çimlenmiş tohumlardan elde edilen sürgün uçlarına % 0.1 kolhisinin 36 saat uygulanması olduğunu göstermiştir. Tetraploid bitkilerin kısa boylu, kalın ve geniş yapraklı olduğu belirlenmiştir (Wei ve ark., 2007).

İnan (2007), çekirdeksiz karpuz (*Citrullus lanatus*) üretimi için ebeveyn olarak kullanılan tetraploid karpuz bitkisi elde edilmesine yönelik olarak yaptığı çalışmada, Crimson Sweet karpuz çeşidinde iki *in vivo* ile iki *in vitro* yöntemin tetraploid bitki elde edilmesine etkilerini araştırmıştır. *In vivo* yöntemlerin birincisinde 7 farklı dozda (% 0.0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 ve 0.6) hazırlanan kolhisin çözeltisi, ilk gerçek yaprak oluşumu aşamasında bitkinin büyüme ucuna damlatılmış; diğer yöntemde ise % 0.0, % 0.5 ve % 1.0 dozlarında hazırlanan kolhisin çözeltisine serada büyütülen diploid karpuz bitkilerinin büyüme ucu daldırılmıştır. *In vitro*'da yapılan denemelerde MS kültür ortamlarında kotiledon yapraklarından rejenerasyon sağlanmış, diğer yöntemde ise *in vitro* diploid mikro çeliklere kolhisinin 3 dozu (% 0.0, 0.5 ve 1.0) uygulanmıştır. Araştırma bulgularına göre Crimson Sweet karpuz çeşidinde tetraploid bitki elde edilmesine yönelik en başarılı uygulamanın *in vitro*'da 4 mg/l BA içeren MS ortamından elde edilen rejenerasyon ile gerçekleştiği ve bu uygulamada katlama oranının % 60.4 olduğu tespit edilmiştir. İkinci başarılı metot olarak *in vitro* kolhisin uygulamasında (% 0.5 dozu) % 36.4 oranında tetraploid bitki elde edilmiştir. Denemede yer alan *in vivo* yöntemlerin kromozom katlama başarısı % 5 oranında kalmış ve yeterli bulunmamıştır. *In vivo* ve *in vitro* yöntemler sonucu elde edilen bitkilerin ploidi seviyeleri flow sitometri analiz yöntemi ile belirlenmiştir. Tetraploid bitki teşhisinde morfolojik ve sitolojik gözlemlerden de yararlanılmıştır.

Çeşitli konsantrasyonlarda (%0.0- 0.250 arasında) kolhisinle muamele edilen susam tohumlarında konsantrasyonun artışı ile mutasyonun ve zararlanmanın arttığı tespit edilmiştir. Çimlenme ve yaşama oranı bitki boyu, bitki başına meyve sayısı gibi özelliklerde doza bağlı olarak azalma meydana gelirken, yaprak alanı, olgunlaşma zamanı ve meyve iriliğinde artış olduğu belirlenmiştir. Kolhisin

uygulamaları kısa boğum araları, yaprak şeklinde deformasyon ve klorofil mutasyonları oluşturmuştur. Düşük dozdaki mutajenle susamda erkenci ve yüksek verimli mutantlar geliştirilmiştir (Mensah ve ark., 2007).

Watsonia lepida N.E. Brown (bir glayöl türü)'a kolhisin ve orizalin uygulamaları yapılmıştır. *In vitro* çimlendirilen bitkiler yaklaşık 4 cm uzunluğuna gelince hipokotil ve 1 yaprak içeren yaklaşık 1 cm boyunda kesilerek hazırlanan eksplantlar 25, 50, 125 ve 250 μ M kolhisin ve 30, 60, 90 ve 120 μ M orizalin içeren ortamda 24, 48 ve 72 saat kültüre alınmıştır. Uygulama dozu ve süresi arttıkça eksplantların yaşama oranı azalmıştır. Eksplantların yaşama oranı, orizalin uygulanmış olanlarda kolhisin uygulananlara göre daha yüksek bulunmuştur. Her ikisinde de, tetraploitten daha çok miksploid bitki elde edilmiştir. Tetraploid için optimum uygulama 24 saat süre ile 120 μ M orizalin olarak belirlenmiştir. Bu uygulamada orizalin uygulanan 20 eksplantın 6'sı yaşamaya devam etmiş ve 2'sinin tetraploid olduğu tespit edilmiştir (Ascough ve ark., 2008).

Lehrer ve ark. (2008), mitoz inhibitörlerinden kolhisin ve orizalinin steril ıslah hatlarının elde edilmesi için tetraploid bitkilerin üretiminde geleneksel bir yöntem olduğunu belirtmektedir. Kadın tuzluğu (*Berberis thunbergii* var. *atropurpurea*) süs bitkisinde yaptıkları bir çalışmada, uygulama protokollerinde; 2 mitotik inhibitör (orizalin ve kolhisin), 5 konsantrasyon ve 3 farklı uygulama süresi denenmiştir. Kolhisin dozları % 0.02; 0.05; 0.1; 0.2 ve orizalin dozları % 0.002; 0.005; 0.01; 0.02 olarak hazırlanmıştır. Tohumlar 6, 12, 24 saat bekletildikten sonra, plastik saksılara ekilmiştir. Uygulamadan 6 hafta sonra bitkilerin flow sitometride analizleri yapılmıştır. Orizalinin, kolhisine göre daha fazla toksik olduğu ve orizalin uygulamalarında bitkilerin % 30'unun, kolhisin uygulamalarından ise % 58'inin canlı kalabildiği belirlenmiştir. Bitkilerin ploidi değişimleri için, kolhisine göre daha düşük konsantrasyonlarda orizalin kullanılması gerektiği önerilmiştir. Her iki inhibitörün konsantrasyon artışı ile bitkiler strese girmiştir. Her ikisinde de, 24 saatlik uygulamalarda, 6 saatliğe göre daha öldürücü etki gerçekleşmiştir. Bu sonuçlar, anti-mitotik kimyasalların öldürücü etkisinin, konsantrasyon ve maruz kalma sürelerine bağlı olduğunu göstermiştir. Tüm doz ve süreler içinde; kolhisin uygulanan tohumların canlı olanlarında, % 38 tetraploid; orizalin uygulananların canlı kalanları içinden de, % 61'i tetraploid olarak belirlenmiştir. Her iki inhibitörden

toplamda % 7-8 miksploid bitki elde edilmiştir. Kolhisin ve orizalin uygulamalarında benzer miktarda tetraploid üretimi görülmüştür (yaklaşık % 20). En iyi kolhisin etkisi; % 0.05 ve % 0.2 dozlarında (sırasıyla % 20 ve % 27) tespit edilmiştir. Orizalinin en büyük etkisi ise; % 0.002 ve % 0.005 dozlarında (sırasıyla % 28 ve % 22) görülmüştür.

Ntuli ve Zobolo (2008) *Coccinia palmata* (kızıl kabak) ve *Lagenaria sphaerica* (yabani kavun) tohumlarını 1, 3 ve 6 gün petride çimlendirilmeye alındıktan sonra 0.001, 0.01 ve 0.1 g/l (sırasıyla 1, 10 ve 100 ppm) kolhisinle 24 saat bekletmişlerdir. Kolhisin konsantrasyonu arttıkça fidelerin yaşama oranı azalmıştır. Kolhisin konsantrasyonunun yükselmesiyle poliploidi oranı artmıştır. Kolhisin uygulamasından önce çimlendirme süresinin uzaması ile (3 ve 6 gün) kısa süre çimlendirme uygulamasına (1 gün) göre daha yüksek poliploid bitki elde edilmiştir. Poliploidler daha yüksek klorofil içeriğine ve kuraklık stresi toleransına sahip olmuştur.

Echinacea purpura L. (ekinezya); frengi, septik yaralar, kan zehirlenmesi, soğuk algınlığı, grip ve diğer üst solunum yolu enfeksiyonları gibi çok çeşitli hastalıklarda tıbbi kullanımının uzun bir geçmişi olan popüler bitkilerden biridir. Günümüzde, *Echinacea* türlerinin kimyasal yapısı belirlenmiş ve alkamidler, kaffeik asit türevleri, polisakaritler de olmak üzere çeşitli bileşenler için önemli kabul edilmiştir. Tıbbi bitkiler için, etkili bileşiklerin içeriğinin artışı görülebilir, bu nedenle poliploidi bu bitkilerde daha değerli olabilir. Poliploidi ürün iyileştirme stratejilerinden biridir. Birçok uygulanabilir yöntemler yanında kolhisin uygulayarak kromozom sayısının iki katına çıkarılması birçok bitki türünde başarıyla sonuçlanmıştır. *Echinacea* yaprak sapı eksplantları farklı konsantrasyonlarda (30, 60, 120, 240 mg l⁻¹) kolhisin içeren ortamda 30 gün boyunca ya da 120 mg l⁻¹ kolhisin içeren ortamda farklı sürelerde (7, 14, 21, 28 gün) kültüre alınmıştır. Kolhisin eklenen ortamlarda sürgün rejenerasyonu önemli ölçüde engellemiştir ve yüksek kolhisin konsantrasyonu düşük rejenerasyon oranıyla sonuçlanmıştır. Kolhisin aynı zamanda rejenerasyonu geciktirmiş ve eksplantların kesim yüzeylerinde kallus oluşumunu uyarmıştır. Sonuçlar tetraploid sürgünlerin indüksiyonu için 7 günden uzun bir uygulama süresi gerektiğini göstermiştir. En yüksek tetraploid sürgün % 23.5 ile 28 gün boyunca 120 mg l⁻¹ kolhisin uygulanan ortamda tespit edilmiştir.

Kimeralar tüm uygulamalarda gözlenmiştir. Kısa süreli yüksek kolhisin konsantrasyonu uygulamalarıyla karşılaştırıldığında, uzun süreli uygulamalar çok daha az çalışılmıştır. Araştırmacıların, Chakraborty ve ark. (1998)'dan bildirdiğine göre dutta, 1000 mg^l⁻¹ konsantrasyonunda 1 ve 28 gün süreyle kolhisin uygulamalarından aynı derecede iyi sonuçlar elde etmişlerdir. Buna karşılık, Carvalho ve ark. (2005)'ten bildirdiğine göre 15 ve 30 gün boyunca 10, 100 ve 500 mg^l⁻¹ kolhisin ile muamele ettikleri annatto (*Bixa orellana*) bitkilerinden yalnızca 15 gün için 100 mg^l⁻¹ uygulamasından tek bir tetraploid sürgün elde edilmiştir (Nilanthi ve ark., 2009).

Hypericum cinsi (sarı kantaron), iyi farmasötik kaliteleriyle dünya çapında bilinen 370 türü içermektedir. Ayrıca birçok türü süs bitkisi ve çevre koşullarına dayanıklılıkları nedeniyle ıslahta gen kaynağı olarak önemlidir. Bazı bitkilerde poliploidi daha büyük, daha uzun ömürlü çiçekler, kalın taç yaprakları ve daha büyük, kalın yaprakları gibi arzu edilen dekoratif özelliklere neden olabilmektedir. Buna ek olarak, poliploid bitkiler, özellikle allopoliploidler, daha kuvvetli büyüme, hastalık ve zararlılara daha yüksek direnç, stres toleransı gibi avantajlı özelliklere sahip olabilir ve genlerin yedeklenmesine dayalı olarak zararlı mutasyonlardan korunabilir. *In vitro*'da poliploid bitki üretimi için kolhisin ve orizalin gibi çeşitli mitotik inhibitörler kullanılmıştır. Orizalin düşük dozlarda etkili ve daha az toksik olduğu, deforme olmadan normal gelişen bitkiler sağladığı için daha çok tercih edilmiştir. *In vitro*'da kantaron yaprak eksplantlarından geliştirilen kalluslar 7.5, 15, 30, 60 ve 90 mM orizalin 3, 6 ve 9 gün sıvı kültürde tutulmuştur. Orizalin konsantrasyonu ploidi seviyesini ve sürgün yaşama oranını etkilemiş ve uygulama süresinin önemli etkisi olduğu belirlenmemiştir. Kalluslardan 60- 90 mM orizalin uygulananların tümü ölmüştür. Artan orizalin konsantrasyonuyla tetraploid oran doğrusal pozitif bir ilişki göstermiştir. En yüksek tetraploid oranı %35 ile 3gün 30 mM orizalin uygulamasından elde edilmiştir (Meyer ve ark., 2009).

Sun ve ark. (2009) armutta (*Pyrus comminis* L.) *in vitro* gelişen bitki yaprak eksplantlarına kolhisin uygulayarak triploid, tetraploid ve miksoyploid bitkileri içeren poliploid bitkiler elde edilebileceğini bildirmiştir. Yaprak eksplantlarına % 0.4 kolhisin 24, 48 ve 72 saat süreyle uygulanmıştır. Uygulamadan sonra eksplantların yaşama ve sürgün geliştirme oranı uygulama süresinin artışıyla azalmıştır. En yüksek oranda poliploid bitki 48 saat uygulamasından elde edilirken sürgün oluşum oranı %

83 oranında azalmıştır. Uygulamanın 48 saatten uzun olması durumunda poliploidi oranı azalmıştır. Poliploid bitkilerin daha büyük yaprak ve stomalara sahip olduğu belirlenmiştir. Głowacka ve ark. (2010), ploidi seviyesinin artışının bitki fenotipik özellikleri üzerindeki etkisini önceden tahmin etmenin güç olduğunu, bununla birlikte birçok bitkide poliplodizasyonun bitki özelliklerinin iyileştirilmesinde başarılı bir araç haline geldiğini bildirmiştir. Birçok bitki türünde poliplodizasyonu indüklemenin en hızlı ve ucuz yönteminin; *in vivo* koşullarda kolhisin uygulamaları olduğu belirlenmiştir. *In vitro* kültürden gelen *Miscanthus X giganteus* (fil çimi) fideleri sera koşullarında 4 hafta gelişmeye bırakılmıştır. Kolhisin uygulamasından bir gün önce topraktan sökülen bitkiler su ile yıkanmış ve bir gün süreyle suda bekletilmiştir. Sudan çıkarılan bitkiler 6, 18 ve 24 saat süreyle 626 ve 1252 µM kolhisin solüsyonuna daldırılmıştır. Kolhisin uygulanan 3240 bitkinin 1441'i (% 44.5) yaşamaya devam etmiş, diğerleri ise ölmüştür. Bitkilere kolhisin uygulanması yöntemiyle poliploidi teşvikinde genotipin çok önemli olduğu belirlenmiştir. Bazı genotiplerden hiç ploiploid bitki elde edilemezken bazı genotiplerde bu oran % 3.8 olmuştur.

Zhang ve ark. (2010) yumrulu otsu çok yıllık bir bitki olan *Dioscorea* (yam) sürgün uçlarına (3- 5 mm) % 0.1, 0.2 ve 0.3 kolhisin 24, 36, ve 48 saat sürelerde uygulandıktan sonra sürgün uçları kültüre alınmıştır. İki haftalık inkübasyon sonunda bitkilerde flow sitometri ve kök ucu kromozom sayımlarıyla ploidi seviyeleri belirlenmiştir. Tetraploid bitki elde etme oranı kolhisin uygulama dozu ve süresinin artışına bağlı olarak artmıştır. Ancak en yüksek oran 24 saat süresince % 0.15 konsantrasyonu ile elde edilmiştir. Daha yüksek dozlar bitki ölümlerinin artışına neden olmuştur. En yüksek tetraploidi % 26.4 oranında olmuş ve % 0.2 kolhisin dozu 48 saat uygulandığında eksplantların ölüm oranı % 70'e yükselmiştir. Tetraploid bitkilerin diploidlerine göre yüksek sıcaklık stresine daha yüksek tolerans gösterdikleri belirlenmiştir. Araştırmacılar poliploidinin sekonder metabolitlerin birikimini arttırma ve birçok abiyotik strese karşı toleransı arttırma potansiyeline sahip olduğunu belirtmiştir. Örneğin, bir tetraploid *Datura innoxia* ve *D. stramonium* tohumu kendi diploidlerine göre iki kat daha yüksek alkaloid içeriğine sahipken, tetraploid *Artemisia annua* (pelin otu) diploid bitkilerden altı kat daha fazla *artemisin*

üretilebileceğini, bu nedenle tıbbi bitkilerde yeni çeşitlerin elde edilmesinde poliploidi yararlı bir araç olabileceğini bildirmişlerdir.

Fesleğen (*Ocimum basilicum*) önemli tıbbi bitki türlerinden biridir. Kolhisin uygulamalarıyla en uygun uygulama yöntem ve dozunu belirlemek için, farklı konsantrasyonlarda (% 0.05, 0.10, 0.20, 0.50 ve 0.75) ve dört uygulama yöntemi (tohuma, kotiledon gelişim aşamasındaki ve iki gerçek yaprak gelişim aşamasındaki fidelerin apikal büyüme noktalarına ve köklere uygulama) denenmiştir. Autotetraploid bitkiler sadece, kotiledon gelişim aşamasındaki fidelerin büyüme ucuna % 0.5 kolhisin uygulamalarından elde edilebilmiştir. Tetraploid bitkilerde diploidlere göre daha büyük stoma, polen, bekçi hücrelerinde daha artan kloroplast sayısı, stoma yoğunluğunda azalma belirlenmiştir. İslah programlarında geliştirilen bitkilerin ploidi seviyesini, bitkinin çeşitli gelişim aşamalarında hızlı ve basit bir yöntemle belirlemek önemlidir. Ploidi seviyesini belirlemek için uzun zamandan beri bilinen ve kullanılan bitki kök uçlarında mitotik hücrelerde kromozom sayımı, klasik ve doğru bir yöntemdir. Ancak bu yöntem uzun zaman alır ve çok deneyim gerektirir. Bu nedenle, ploidi belirlenmesi için yaklaşımların başarıyla uygulanabilir ve güvenli dolaylı yöntemleri bulmak için çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Birçok bitki türünde, ploidi düzeyi ile kloroplast bekçi hücreleri sayısı, stoma hücrelerinin büyüklüğü, stoma yoğunluğu ve polen çapı gibi özellikleri arasında korelasyon olduğu belirlenmiştir (Omidbaigi ve ark., 2010).

Yen ve ark. (2010) üç çeşit oya çiçeğine (*Lagerstroemia indica*) kotiledon aşamasında büyüme ucuna farklı doz ve sürelerde kolhisin uygulamıştır. Kolhisin % 0.2, 0.5, 0.8 dozları, 48, 72, 96 saat süreyle uygulanmıştır. Kolhisin solüsyonu ile doymuş pamuk tamponları fidelerin apikal uçlarına sarılmış ve uygulama günde iki kez tekrarlanmıştır. Tespit edilen mutasyon çeşitleri arasında önemli farklılıklar görülmüştür. En yüksek morfolojik varyasyon oranı (% 54) 17 ile 72 saat için % 0.5 kolhisin ile muamele edildiğinde sağlanmıştır. Flow sitometri ölçümlerine göre tetraploid olduğu belirlenen bitkilerde iri, kalın ve koyu yeşil rengi yapraklar, büyük stomalar, yaprağın alt epidermisinde stoma yoğunluğu azalması ve stoma bekçi hücre başına kloroplast sayısının artması gibi morfolojik ve sitolojik değişimlerle belirlendiğini bildirilmiştir.

Diploid bir bitki olan, gövde ve yapraklarından yararlanılan hasırotunda (*Jungus effusus*) tetraploid bitkilerin daha iri vejetatif aksamından daha çok yarar sağlanması amacıyla tetraploidi için kolhisin kullanılmıştır. *In vitro*'da çoğaltılmış bitkilerin basal culm (sap-gövde ucu) kısımlarına 0, 50, 100, 500 mg/dm³ kolhisin dozları 6, 12 ve 24 saat uygulanmıştır. Ploidi seviyesi flow sitometri ile ölçülmüştür. Kolhisinin 50 mg/dm³ konsantrasyon ve 6 saat süreyle uygulamasında tetraploid bitki elde edilememiştir. Aynı konsantrasyon 12 ve 24 saat uygulandığında tetraploid bitki sayısı artmıştır. En yüksek oranda tetraploid bitki sayısı % 16 oranında 500 mg/dm³ dozu, 12 ve 24 saat uygulamalarında elde edilmiştir. Kolhisin uygulamasından sonra oluşan tetraploid bitkilerin başlangıçtaki büyümeleri, diploid bitkilerle karşılaştırıldığında daha yavaş olmuştur. Bunlarla birlikte, bu tetraploid bitkilerin, topraklı ortama taşınmasından sonraki gözlemlerinde kontrol bitkilerinden daha kalın, güçlü ve uzun oldukları görülmüştür. Stoma en-boyları ise, diploidlere (31.7 µm) göre tetraploid (41.5 µm) bitkilerde önemli düzeyde yüksek çıkarken stoma yoğunluğu tetraploid bitkilerde daha düşük çıkmıştır. Klorofil içeriği tetraploidlerde, önemli düzeyde artmıştır (Xu ve ark., 2010).

Nura ve ark. (2011), jüt (*Corchorus olitorias*) tohumlarını farklı konsantrasyonlarda (0.1, 0.5, 1.0, 2.0 mM) kolhisin çözeltisine daldırmışlardır. Çalışma sonunda, M1 generasyonunda incelenen karakterlerde önemli artışlar belirlenmiş, M2 generasyonunda ise bazı karakterlerde önemli artışlar rapor edilmiştir. Kolhisin uygulaması ile oluşturulan kimyasal mutajenezmin, jüt bitkisinde bazı verim ve büyüme özelliklerinin iyileştirilmesini sağlamıştır. İlk çiçeklenmenin erken oluşması (erkencilik), bitki boyu, yaprak sayısı/bitki, yaprak alanında düşük konsantrasyonda uygulanan kolhisinin daha yararlı mutasyonlar oluşturduğunu bildirmiştir.

Haploid 'Kırkağaç' ve 'Yuva Hasanbey' kavunlarında (*Cucumis melo*) *in vivo* ve *in vitro* kolhisin uygulamaları karşılaştırılmıştır. *In vitro*'da haploid bitki çelikleri % 0.5 kolhisin solüsyonunda 2 saat bekletilmiştir. *In vivo* koşullarda serada yetişen haploid bitkilerin gövdesi 30- 40 cm'e ulaştığında 5-10 cm boyunda sürgün ucu aynı dozda kolhisin solüsyonunda 2 saat bekletilmiştir. *In vitro* uygulamadan sonra çeşitler arasında önemli farklılıklar belirlenmiş ve ortalama yaşama oranı % 38.47 olmuştur. Kromozom katlama oranı ortalama % 10 olarak gerçekleşmiştir. *In vivo*

kolhisin uygulamasındaki bitkilerin ortalama % 25'i büyümeye devam edebilmiştir. *In vivo*'da ki katlama oranı, *in vitro*'da ki ile benzer şekilde ortalama % 40 olarak belirlenmiştir. Katlanmış bitkilerin yapısı ve büyümeleri normal kontroller gibi olmamıştır. Bu bitkilerin yaprak ve çiçek görünüşleri düzensiz olmuştur. Verimli polen üretimi olmasına rağmen, etkileri normal kontroller gibi olmamıştır. Bu çalışma *in vivo* kolhisin uygulamasında kromozom katlamanın, *in vitro* kolhisin uygulamasından daha başarılı olduğunu göstermiştir (Solmaz ve ark., 2011).

Catharanthus roseus (Cezayir menekşesi, pervane çiçeği) tohumlarına farklı sürelerde ve konsantrasyonlarda kolhisin uygulanmıştır. Çimlenen fideler 2 ay serada yetiştirildikten sonra flow sitometri ile ploidi sevipleri belirlenmiştir. Farklı konsantrasyonların tetraploid bitki üretimi üzerinde önemli etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Tohumlara % 0.4 kolhisin uygulanması durumunda tohumların çimlenmesi düşük, fideleri anormal görünümlü olmuş ve hızla ölmüş, % 0.4 kolhisin uygulama sonrası hiçbir fide yaşamamıştır. Aynı durum 48 saatten fazla % 0.3 kolhisin uygulamalarında da belirlenmiştir. Kolhisinin yüksek konsantrasyonlarının tohumlar için zararlı olabileceği ve fideleri öldürebileceği sonucuna varılmıştır. Sonuçlar, uzun sürelerde ve düşük konsantrasyondaki uygulamaların daha fazla sayıda tetraploid bitki üretilebileceğini göstermiştir. En yüksek tetraploidi % 30 oranla, 24 saat süresince % 0.2 ile % 0.3 kolhisin uygulamalarından elde edilmiştir (Xing ve ark., 2011).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Çalışma 2011 ve 2012 yıllarında Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü laboratuvarı ve serasında yürütülmüştür. Çalışmada *in vivo*'da 2 yöntemle kolhisin uygulaması yapılmıştır. Bunlar;

- Tohumlara kolhisin uygulaması,
 - Fidelerin bitki büyüme ucuna kolhisin uygulaması,
- yöntemlerinden oluşmaktadır.

Her 2 uygulamanın morfolojik incelemeleri HR.Ü. Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü'nde, flow sitometri yöntemi ile ploidi seviyesini belirleme çalışmaları Ç.Ü. Biyoteknoloji Merkezine ait laboratuvarında yürütülmüştür.

3. 1. Bitkisel Materyal

Araştırmada bitkisel materyal olarak 'Goldenberry' altın çilek çeşidi kullanılmıştır (Şekil 3.1). Altın çilek tohumları Mersin Gıda Tarım ve Hayvancılık İl Tarım Müdürlüğünden temin edilmiştir.

'Goldenberry' çeşidinin meyve çapı yaklaşık 2.5 cm'dir, bazen 5 cm'e kadar da büyümektedir. Meyve eti çok fazla tatlı ve lezzetlidir. Meyvenin suyu, renkte ve tat yoğunluğunda portakal suyuna benzemektedir.



Şekil 3.1. Altın çilek bitkisi ve meyveleri

3. 2. Yöntem

3. 2. 1. Kolhisin Stok Çözeltilerinin Hazırlanması

Çalışmalarda % 95'lik toz halde kolhisin ($C_{22}H_{25}O_6$) (Sigma) kullanılmıştır. Kolhisin stok çözeltileri 20 Haziran 2011 tarihinde 3 farklı doz (% 0.2- 0,4- 0,8) olmak üzere hazırlanmıştır (Şekil 3.2).

Başlangıçta % 0.8 stok çözeltisini hazırlamak için, % 95'lik kolhisinden 0.84 gr hassas terazide tartılmıştır. Bir miktar saf suda çözüldürüldükten sonra, saf su eklenerek 100 ml'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan % 0.8 stok çözeltisinden 3.75 ml alınmış ve üzerine 11.25 ml saf su ilave edilmiş ve 15 ml % 0.2'lik kolhisin çözeltisi hazırlanmıştır. Aynı şekilde, % 0.8 stok çözeltisinden 7.5 ml alınmış ve üzerine 7.5 ml saf su eklenerek 15 ml % 0.4'lük çözelti hazırlanmıştır.



Şekil 3.2. Hazırlanmış olan kolhisin stok çözeltileri

3. 2. 2. Tohumların Yüze Dezenfeksiyonu

Denemede her iki kolhisin uygulama yönteminde kullanılan bütün tohumlar % 10'luk kalsiyum hipokloritte 10 dk bekletilmiş daha sonra 2 defa steril su ile çalkalanarak dezenfekte edilmiştir.

3. 2. 3. Tohumlara Kolhisin Uygulaması

Tohumlara kolhisin uygulama işlemi 20 Haziran 2011 tarihinde yapılmıştır. Tohumlar, 3 farklı doz ve 3 farklı süre olmak üzere kolhisine maruz bırakılmıştır. Uygulama her doz için 3 tekrarlama ve her tekrarlama 20 tohum olacak şekilde yapılmıştır.

Kolhisin % 0.0 (kontrol), 0.2, 0.4, 0.8 konsantrasyonlarında tohumların üstünü örtecek biçimde her tüpe 5 ml eklenmiştir. Her bir doz için 8-16-24 saat sürelerinde uygulama yapılmıştır.

Bekleme süresi tamamlanan tohumlar 3 defa steril su ile çalkalanmış ve pens yardımıyla cam petri içerisinde bulunan filtre kağıtları üzerine yerleştirilmiştir (pens, filtre kağıtları ve petrilerin otoklavda sterilizasyonu yapılmıştır). Çimlenme için filtre kağıtları steril su ile hafifçe nemlendirilmiştir. Kontrol gruplarına herhangi bir kolhisin uygulaması yapılmamıştır.

Petri kabına yerleştirilen tüm tohumlar, iklim odasında 23 °C’de çimlenmeye bırakılmıştır. Her gün düzenli olarak sabah ve öğleden sonra ki saatlerde petrilerdeki su miktarına bakılmış ve piset ile sulama yapılmıştır.

Çimlenmesi tamamlanan tohumlar çimlenme oranları belirlendikten sonra 28 Haziran 2011 de cam serada bulunan içerisinde torf bulunan 70’lik viyollere ekilmiştir.

Viyollerden alınan fideler 04 Ağustos 2011 tarihinde 2:2:1; torf:perlit:toprak harç karışımı içeren 10 litrelik saksılara (540 saksı) şaşırtılmıştır (Şekil 3.3).



Şekil 3. 3. Saksılara dikimleri yapılmış altın çilek bitkileri

3. 2. 4. Fide Döneminde Bitki Büyüme Ucuna Kolhisin Uygulaması

Bitki büyüme ucuna kolhisin uygulaması için dezenfeksiyonu tamamlanan tohumlar, her hangi bir kolhisin uygulamasına maruz kalmadan, 20 Haziran 2012 tarihinde çimlenmek üzere steril petrielerde steril su ile nemlendirilmiş kaba filtre kağıtları üzerine konulmuştur.

Petri kabına yerleştirilen tüm tohumlar, iklim odasında 23 °C’de çimlenmeye bırakılmıştır. Her gün düzenli olarak sabah ve öğleden sonra ki saatlerde petrilerdeki su miktarına bakılmış ve piset ile sulama yapılmıştır.

Çimlenmesi tamamlanan tohumlar çimlenme oranları belirlendikten sonra 28 Haziran 2011’de cam serada bulunan içerisinde torf bulunan 70’lik viyollere ekilmiştir.

Fidelerin 2:2:1; torf:perlit:toprak harç karışımı içeren 10 litrelik saksılara (120 saksı) taşınması 12 Eylül 2011 tarihinde yapılmıştır.

Büyüme ucuna (meristem bölgesine) kolhisin uygulamaları 6 haftalık fidelere yapılmıştır. Her bitkinin büyüme ucuna 2 defa olmak üzere 2 saat arayla % 0.0, 0.2, 0.4 ve 0.8 konsantrasyonlarında kolhisin uygulanmıştır. Kolhisin her bitkinin apikal meristem bölgesine mikropipetle 20 µl olacak şekilde damlatılmıştır (Şekil 3.4).

Kontrol grubu bitkilerine aynı şekilde su damlatılmıştır. Uygulama her doz için 3 tekrarlama ve her tekrarlama da 10 bitki olacak şekilde yapılmıştır (Şekil 3.5).



Şekil 3. 4. Büyüme ucuna kolhisin uygulaması



Şekil 3. 5. Büyüme ucuna kolhisin uygulanan bitkiler

3. 2. 5. Denemelerde Yapılan Ölçümler

Yürütülen çalışmada, uygulamalardan sonra tohumların çimlenme oranları, bitkilerin saksılara dikiminden sonra bitkilerde bazı morfolojik ölçümler ve flow sitometri yöntemiyle bitkilerin ploidi düzeyleri belirlenmiştir.

3. 2. 5. 1. Morfolojik Ölçümler

Kolhisin uygulamaları sonrasında gelişen bitkilerde aşağıdaki morfolojik gözlemler yapılmıştır. Uygulama yapılan bitkilerin her dozunda 3 tekerrürlü olmak üzere; tohum uygulamalarında 20, büyüme ucu uygulamalarında 10 bitkide ölçümler yapılmış ve sonuçların ortalamaları alınmıştır.

3. 2. 5. 1. (1) Kotiledon Yaprak Alanı

Tohumlara kolhisin uygulaması sonrasında, dikimden 6 hafta sonra ve bitkiler 3-4 yapraklı iken, bitkilerden her iki kotiledon yaprak alınmış ve dijital alan ölçer (Şekil 3.6) ile ‘mm²’ olarak ölçülmüştür.



Şekil 3. 6. Yaprak alan ölçer ile kotiledon yaprak alan ölçümü

3. 2. 5. 1. (2) Bitki Boyu

Tohumlara ve fidelerin büyüme ucuna kolhisin uygulamalarından sonra yetiştirilen tüm bitkilerin toprak üzerinden bitkinin en uzun sürgün ucuna kadar bitki boyları, dikimden 18 hafta sonra, metre yardımıyla ‘cm’ olarak belirlenmiştir (Şekil 3.7).



Şekil 3. 7. Serada yetişen altın çilek bitkileri

3. 2. 5. 1. (3) Bitki Gövde Çapı

Tohumlara ve fidelerin büyüme ucuna kolhisin uygulamalarından sonra yetişen tüm bitkilerin kök boğazının 5-6 cm yukarisından gövde çapları, ekimden 18 hafta sonra, dijital kumpas yardımıyla ‘mm’ olarak belirlenmiştir.

4.2. 5. 1. (4) Meyve Boyutları

Yetiştirilen her bitkiden 10 meyve olmak üzere örneklenen meyvelerde (Şekil 3.8) çap ve boyları dijital kumpas ile ‘mm’ olarak ölçülmüştür.



Şekil 3. 8. Altın çilek kaliksli ve kaliksiz meyveleri

3. 2. 5. 1. (5) Meyve Ağırlığı

Çalışılan tüm bitkilerin (Şekil 3.10) hasat edilen meyvelerinden örnekler alınmıştır. Her bitkiden alınan 10 meyvenin tek tek meyve ağırlıkları hassas terazi (Şekil 3.9) ile 'g' olarak ölçülmüştür.



Şekil 3. 9. Meyve ağırlığı ölçümü



Şekil 3. 10 Altın çilek bitkisi ve olgunlaşmayı bekleyen meyveleri

3. 2. 5. 2. Suda Çözünür Kuru Madde (SÇKM) Miktarı

Çalışmada tüm bitkilerin hasat edilen meyvelerinden seçilen 10 meyve örneğinin suda çözünebilir kuru madde miktarı refraktometre (Şekil 3.11) ile ‘brix’ olarak ölçülmüştür.



Şekil 3. 11. Refraktometre ile SÇKM ölçümü

3. 2. 5. 3. Flow Sitometri Analizi

Kolhisin uygulamalarından sonra yetiştirilen bitkilerde ploidi düzeylerinin belirlenmesi için flow sitometri analizleri yapılmıştır. Bitki yaprak örnekleri büyüme ucundan itibaren 3.- 4. genç yapraklardan alınarak ıslak havlu peçetelere sarılmıştır. Bitki örnekleri ayrı ayrı plastik poşetlere yetiştirilmiş ve etiketlenmiştir. İçerisinde kuru buz bulunan buz kabına yerleştirilmiş, bu şekilde Çukurova Üniversitesi Biyoteknoloji Merkezi'ne götürülmüş ve BD FACS Calibur marka flow sitometri cihazında analizleri yapılmıştır.



Şekil 3. 12. Flow sitometri cihazı

Flow sitometri cihazında kullanılmak üzere 192 ml $MgSO_4$, 200 mg dithiothreitol, 1000 μ l PI (propidium iyodid) ve 5000 μ l triton X-100 stok çözeltileri içeren 200 ml A solüsyonu hazırlanmıştır. Buz içerisinde yapılan çalışmada alınan yaprak örneklerinden yaklaşık 1 cm^2 büyüklüğünde parçalar kullanılmıştır. Örnekler petri içerisine saf su ile hafifçe yıkanmasının ardından üzerine 1000 μ l A solüsyonu eklenerek bistüri yardımıyla ezmeden parçalama işlemi yapılmıştır. Çalışma buz üzerinde yapılmış ve A solüsyonu buz içerisinde bekletilmiştir. Parçalama işleminin ardından örnek süzgeçten geçirilip etiketlenmiş tüp içerisine konulmuştur. Örnek içeren tüp 14000 devirde 1 dakika santrifüjde döndürülmüştür. Tüpün dibinde perlet kalacak şekilde sıvı (supernatant) dökülüp üzerine 500 μ l A solüsyonu eklenmiştir.

Solüsyonun ışıktan etkilenmemesi için aliminyum folyo ile sarılıp perlet karışana kadar vortekslenmiştir. Ardından santrifüje alınmıştır. Santrifüj bitiminde tüpte perlet kalacak şekilde üstündeki sıvı dökülüp üzerine tekrar 500 µl solüsyondan eklenip iyice karıştığundan emin olana kadar vortekslenmiştir. Tüm çalışma boyunca örneklerin buz içerisinde hazırlanmasına ve solüsyonun ışık almamasına dikkat edilmiştir. Flow sitometri analizine hazır örnek tekrar süzgeçten geçirilerek etiketlenmiş özel cam tüpe konulup cihaza yerleştirilmiş ve okuma işlemi gerçekleştirilmiştir.

Altın çilek bitkisinin DNA içeriğini tespit etmek için DNA içeriği 0.76 pg olan *Brachypodium distachyon* (yabani buğday) standart alınmıştır.

3. 2. 5. 4. Denemede Yapılan İstatiksel Analizler

Çalışma tesadüf parselleri deneme desenine göre 3 tekerrürlü olarak yürütülmüştür. Elde edilen verilerin ortalamaları Tarist istatistiksel programı kullanılarak varyans analizine tabi tutulmuştur. Elde edilen farklılıkların önemlilik durumları LSD testi ile karşılaştırılmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. Tohumlara Kolhisin Uygulamaları

4. 1. 1. Morfolojik Analizler

4. 1. 1. 1. Kotiledon Yaprak Alanı (mm²)

Farklı kolhisin konsantrasyonları ve uygulama sürelerinin kotiledon yaprak alanına ilişkin sonuçları Çizelge 4.1’de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Farklı kolhisin konsantrasyonları ve uygulama sürelerinin kotiledon yaprak alanına etkileri (mm²)

Kolhisin Konsantrasyonu (%)	Süre (saat)			Kolhisin Konst. Ort.
	8	16	24	
Kontrol	657,30 a	632,00 b	593,70 c	627,67 b
0,2	657,80 a	729,80 ab	1003,30 ab	796,97 a
0,4	677,67 a	931,43 a	899,30 b	836,13 a
0,8	726,23 a	687,57 ab	1253,67 a	889,16 a
LSD %1	279,06			161.201 LSD %1
Uyg. Süresi Ort. (LSD %1 139.60)	679,75 b	745,20 b	937,49 a	

* Aynı sütun içerisinde, aynı harfle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.01 seviyesinde önemli değildir.

Çizelge 4.1 incelendiğinde kolhisin uygulama süresi ve konsantrasyonlarının kotiledon yaprak alanına etkisi yapılan istatistiksel analize göre önemli bulunmuştur. Uygulanan her süreye ait konsantrasyonlarda kendi içinde farklılıklar oluşmuştur. Uygulama sürelerinden 8 saatlik uygulama dışında diğer 16 ve 24 saatlik uygulama sürelerinde kontrol bitkisine kıyasla daha büyük yaprak alanı belirlenirken en dikkat çeken değer 24 saat % 0.8 konsantrasyonunda tespit edilmiştir. Bitkilerin kotiledon yaprak alanı (1253,67 mm²) kontrol bitkilerinin yaklaşık 2 kat büyüklüğünde (593.70 mm²) olmuştur.

4. 1. 1. 2. Bitki Boyu (cm)

Uygulanan tüm kolhisin konsantrasyonları ve tüm uygulama süreleri bitki boyları ortalamalarına ait sonuçları Çizelge 4.2’de görülmektedir.

Çizelge 4.2. Değişik kolhisin konsantrasyonları ve uygulama sürelerinin bitki boyuna etkileri (cm)

Kolhisin Konsantrasyonu (%)	Süre (saat)			Kolhisin Konsant. Ort.
	8	16	24	
Kontrol	30,13 c	28,00 c	34,38 b	30,84 c
0,2	72,83 b	83,67 ab	81,67 a	79,39 ab
0,4	89,00 ab	96,67 a	73,67 a	86,45 a
0,8	95,00 a	77,00 b	46,00 b	72,67 b
LSD %1	17,87			10,32 LSD %1
Uyg. Süresi Ort. (LSD %1 8,937)	71,74 a	71,34 a	58,93 b	

* Aynı sütun içerisinde, aynı harfle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.01 seviyesinde önemli değildir.

Çizelge 4.2 incelendiğinde, bitki boyu % 0.2, 0.4 ve 0.8 konsantrasyonları ve 8, 16 ve 24 saat uygulama sürelerinin tüm ortalamalarında önemli bulunmuş. Kontrolle kıyaslandığında ortalamalar yüksek çıkmıştır. Ancak 24 saatlik % 0.8 uygulamasında tüm doz ve sürelerle kıyasla bitki boyu ortlaması düşük çıkmıştır. Bitki boyu ölçümlerinde en yüksek değerler; 8 saat bekleme süresinde % 0.8, 16 saat bekleme süresinde % 0.4, 24 saat bekleme süresinde ise % 0.2 kolhisin konsantrasyonunda ölçülmüştür. Uygulama süresinde artış ile % 0.8 konsantrasyonuna ait ortalamalarında artış meydana gelmiştir.

4. 1. 1. 3. Gövde Çapı (mm)

Çizelge 4.3. Değişik kolhisin doz uygulamaları ve sürelerinin gövde çapı üzerine etkileri (mm)

Kolhisin Konsantrasyonu (%)	Süre (saat)			Kolhisin Konsant. Ort.
	8	16	24	
Kontrol	6,83	5,90	5,95	6,23 b
0,2	8,71	9,25	8,72	8,89 a
0,4	10,88	8,55	8,50	9,31 a
0,8	9,89	8,17	7,08	8,38 a
Uyg. Süresi Ort. (LSD %1 1,00)	9,08 a	7,97 b	7,56 b	1,15 LSD %1

* Aynı sütun içerisinde, aynı harfle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.01 seviyesinde önemli değildir.

Çizelge 4.3'te dikimden 11 hafta sonra 13 Eylül 2011 tarihinde yapılan gövde çapı ölçümleri ortalamaları sunulmuştur. Uygulama süreleri ve kolhisin dozlarının gövde çapına etkisi önemli bulunmuştur. Süreler içinde en yüksek ortalama 8 saat beklemede belirlenmiştir (9,08 mm). Dozlar arasında ise en yüksek değer % 0,2 ve % 0,4 kolhisin dozlarında belirlenmiştir. Bunları % 0.8 dozu takip etmiştir. En düşük gövde çapı kontrol bitkilerinden elde edilmiştir.

4. 1. 1. 4. Meyve Boyutları (mm)

Farklı kolhisin dozları ve uygulama sürelerine ait meyve çapları ortalamaları Çizelge 4.4.'te, meyve boyları ortalamaları Çizelge 4.5.'de verilmiştir.

Çizelge 4. 4. Meyve çapı üzerine, kolhisin konsantrasyonları ve sürelerinin etkileri (mm)

Kolhisin Konsantrasyonu (%)	Süre (saat)			Kolhisin Konsant. Ort.
	8	16	24	
Kontrol	17,34	17,19	16,82	17,12 b
0,2	17,94	19,43	18,62	18,66 a
0,4	18,77	19,28	19,01	19,02 a
0,8	18,78	19,39	18,75	18,98 a
Uyg. Süresi Ort. (LSD %5)	18,21 Ö.D.	18,82 Ö.D.	18,30 Ö.D.	1,31 LSD %5

* Aynı sütun içerisinde, aynı harfle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.05 seviyesinde önemli değildir.

Meyve çapı ortalamalarının verildiği Çizelge 4.4 incelendiğinde, uygulama süreleri önemsiz bulunurken, kolhisin konsantrasyonlarının etkisi önemli bulunmuştur. Kontrole kıyasla en yüksek ortalama % 0.4 konsantrasyonunda saptanırken, dozlar arasında önemli bir fark görülmemiştir.

Çizelge 4. 5. Meyve boyu üzerine, uygulanan kolhisin konsantrasyonları ve sürelerinin etkileri (mm)

Kolhisin Konsantrasyonu (%)	Süre (saat)			Kolhisin Konsant. Ort.
	8	16	24	
Kontrol	17,89	18,85	18,23	18,32 b
0,2	18,81	21,01	19,79	19,87 a
0,4	20,21	20,07	19,30	19,86 a
0,8	20,40	20,69	19,22	20,10 a
Uyg. Süresi Ort. (LSD %5)	26,83 Ö.D.	20,16 Ö.D.	19,14 Ö.D.	1,19 LSD %5

* Aynı sütun içerisinde, aynı harfle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.05 seviyesinde önemli değildir.

Çizelge 4.5. incelendiğinde, kolhisin uygulama süresine bağlı olarak meyve boyu önemsiz bulunmuştur. Bununla birlikte dozun etkisi önemli bulunmuş ve kontrolle kıyaslandığında en yüksek ortalama % 0.8 konsantrasyonunda tespit edilmiştir.

Çalışılan tüm kolhisin dozları aynı oranda meyve iriliğini arttırmıştır. Kontrol bitkilerinin meyvelerine oranla daha büyük meyveler elde edilmiştir. Kolhisin dozları arasındaki farklılıklar önemsiz ancak uygulamalar ve kontrol arasındaki farklılıklar önemli bulunmuştur.

4. 1. 1. 5. Meyve Ağırlığı (g)

Farklı zamanlarda uygulanan kolhisin konsantrasyonlarının, altın çileklerin ortalama meyve ağırlığına ait değerleri Çizelge 4.6'da verilmiştir.

Çizelge 4. 6. Uygulanan farklı kolhisin doz ve sürelerinin meyve ağırlığına etkileri (g)

Kolhisin Konsantrasyonu (%)	Süre (saat)			Kolhisin Konsant. Ort.
	8	16	24	
Kontrol	3,02	3,31	3,13	3,15 b
0,2	3,57	4,14	3,90	3,87 ab
0,4	4,44	4,39	3,89	4,24 a
0,8	3,82	3,87	3,62	3,77 ab
Uyg. Süresi Ort. (LSD %1)	3,71 Ö.D.	3,93 Ö.D.	3,64 Ö.D.	0,77 LSD %1

* Aynı sütun içerisinde, aynı harfle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.01 seviyesinde önemli değildir.

Ortalama meyve ağırlığına kolhisin uygulama dozlarının etkisi önemli bulunmuştur. Kolhisin uygulamalarında en yüksek meyve ağırlığı % 0,4 kolhisin dozunda belirlenmiş ve bunu % 0.2 ve % 0.8 uygulamaları izlemiştir. Uygulama süresinin önemli bir etkisi bulunmamıştır. Kontrol meyveleri en düşük meyve ağırlığına sahip olmuştur.

4. 1. 2. SÇKM Miktarı (brix)

Tohumlara kolhisin uygulamasının ardından gelişen altın çilek bitkilerinin olgunlaşmış meyvelerinde yapılan SÇKM ölçümlerinin ortalamaları Çizelge 4.7'de verilmiştir.

Çizelge 4.7. Değişik kolhisin konsantrasyonu ve süre uygulamalarının altın çilek meyveleri SÇKM'sine etkileri (brix)

Kolhisin Konsantrasyonu (%)	Süre (saat)			Kolhisin Konsant. Ort.
	8	16	24	
Kontrol	16,31	14,62	14,65	15,19 a
0,2	13,84	14,1	13,62	13,85 b
0,4	14,22	14,14	13,88	14,81 b
0,8	13,81	14,10	13,85	13,92 b
Uyg. Süresi Ort. (LSD %1)	14,55 Ö.D.	14,24 Ö.D.	14,00 Ö.D.	1,02 LSD %1

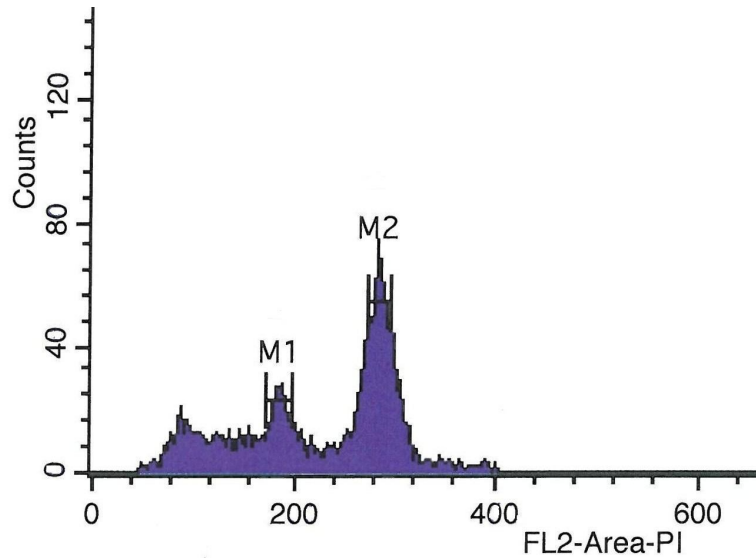
* Aynı sütun içerisinde, aynı harfle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.01 seviyesinde önemli değildir.

Çizelge 4.7’de SÇKM değerleri incelendiğinde, uygulanan kolhisin dozları arasında önemli bir fark belirlenmemiş, bununla birlikte herhangi bir uygulama yapılmayan kontrollerden alınan meyvelerin SÇKM değerleri daha yüksek bulunmuştur. Uygulama sürelerinin SÇKM’ye etkisinin önemli olmadığı saptanmıştır.

4. 1. 3. Flow Sitometri Analizleri

Kolhisin uygulamasından sonra gelişen altın çilek bitkilerinin yapraklarından alınan örneklerde kromozom sayımlarının belirlenmesi amacıyla flow sitometri analizi yapılmıştır. Standart olarak *B. distachyon* alınmıştır.

Flow sitometri analizine göre kontrol altın çilek bitkileri ve *B. distachyon*’nın bilgisayardaki görüntüleri Şekil 4.1’de verilmiştir.

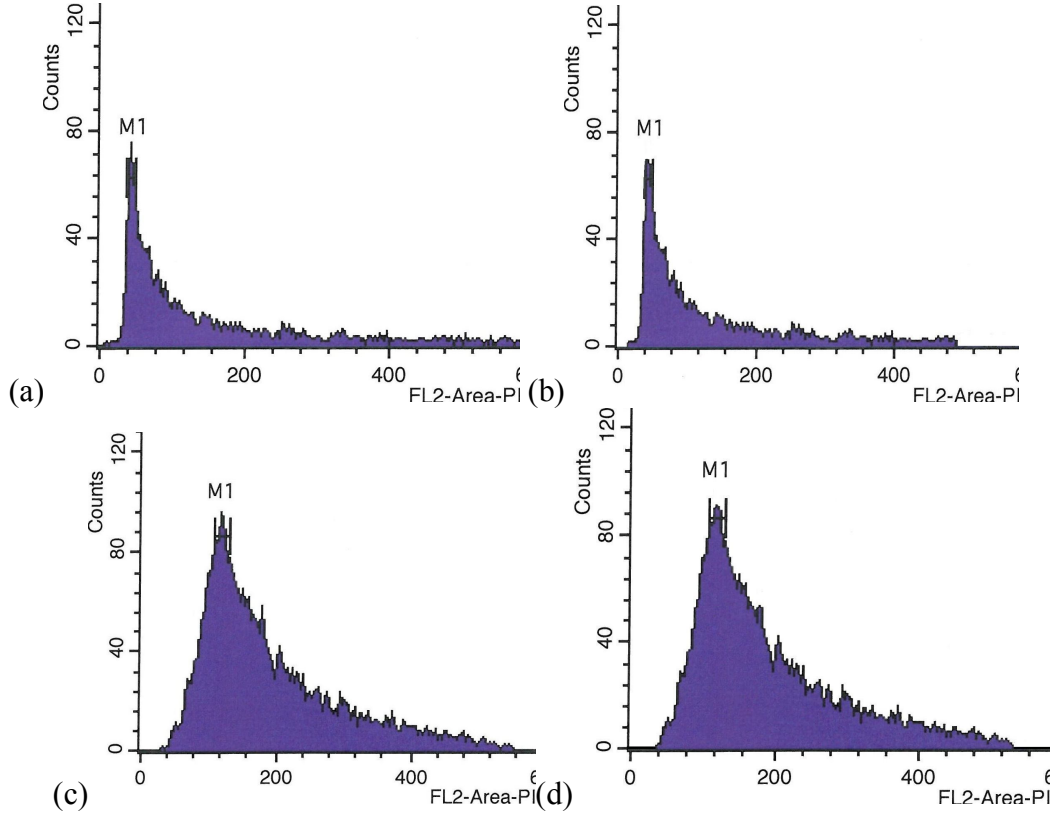


Şekil 4. 1. Kontrol altın çilek bitkisi (M1) ve *B. distachyon* (M2)’nin flow sitometri sonucunun bilgisayar ortamındaki görüntüsü

Standart alınan *B. distachyon* (0.76 pg) bitkisi ile karşılaştırılması sonucunda diploid ($2n=48$) olan kontrol altın çilek bitkilerinin bilgisayar ortamındaki oluşturduğu görüntü belirlenmiştir. Flow sitometri protokollerine göre hazırlanan örnekler aynı tüp içerisinde okutulmuştur. Şekil 4.1’de de görüldüğü üzere M2

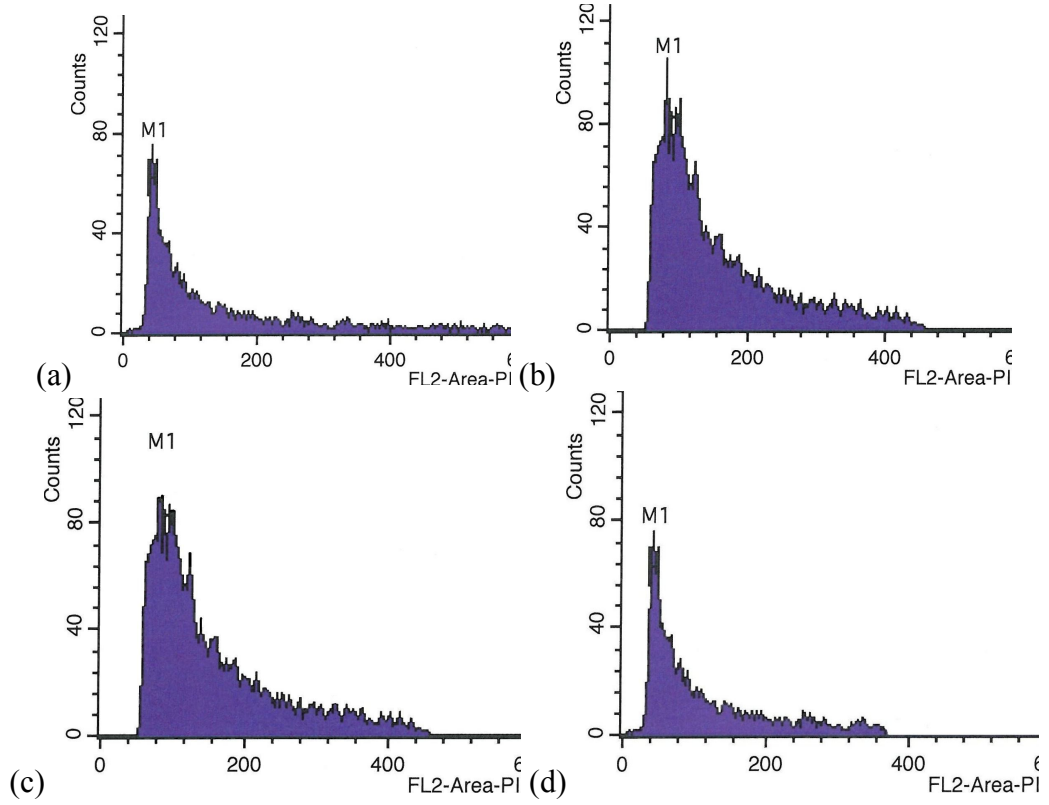
pikini standart olan *B. distachyon*' a ait hücreler, M1 pikini ise altın çileğe ait hücreler oluşturmuştur.

Kolhisinin 8 saat uygulamasına ait bilgisayar ortamındaki görüntüleri Şekil 4.2'te, 16 saat uygulamasına ait görüntüleri Şekil 4.3'te ve 24 saat uygulamasına ait görüntüler ise Şekil 4.4' de sunulmuştur.



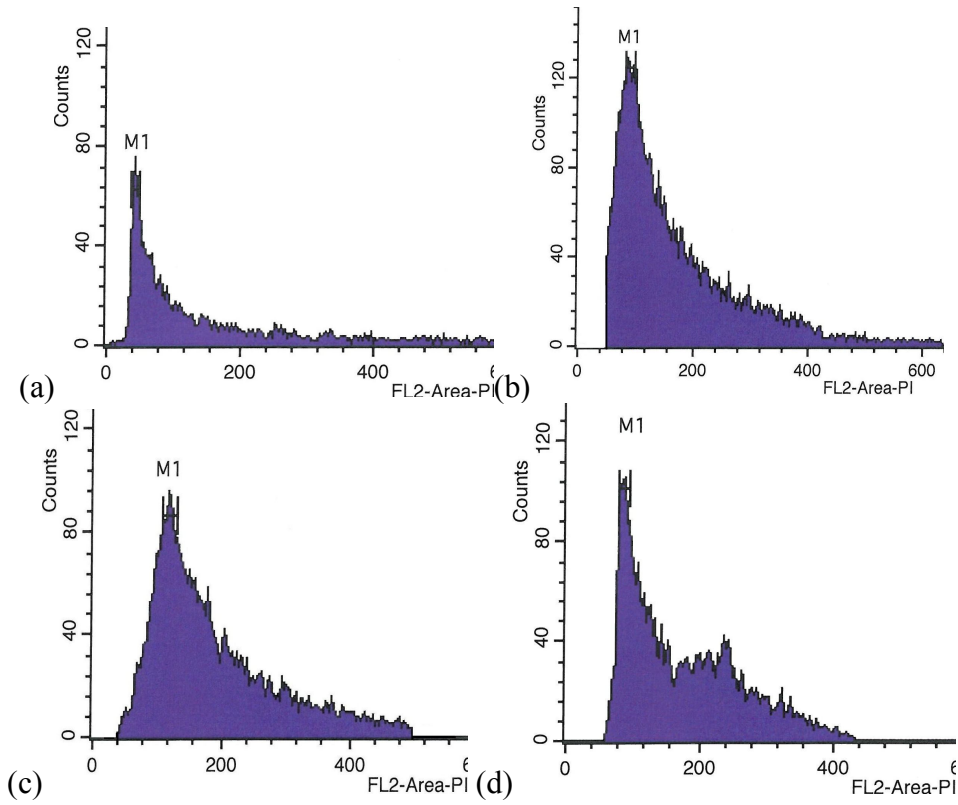
Şekil 4. 2. Tohumlara 8 saat kontrol (a), % 0.2 (b), % 0.4 (c), % 0.8 (d) kolhisin uygulamasından sonra elde edilen bitkilerin flow sitometri sonuçlarının bilgisayar ortamındaki görüntüsü

Diploid görüntüye sahip olan kontrol bitkisi histogramı (a) ile kıyaslandığında; 8 saatlik % 0.2 (b), % 0.4 (c) ve % 0.8 (d) konsantrasyonlarından elde edilen bitki örneklerinin histogramları benzer çıkmıştır. Uygulamalara maruz kalan bitkilere ait görüntülerde hücrelerin oluşturdukları pik, kontrolleriyle aynı görüntüyü vermiştir.



Şekil 4. 3. Tohumlara 16 saat kontrol (a), % 0.2 (b), % 0.4 (c), % 0.8 (d) kolhisin uygulamasından sonra elde edilen bitkilerin flow sitometri sonuçlarının bilgisayar ortamındaki görüntüsü

Histogramlardan 16 saat uygulama süresine ait % 0.2 (b), % 0.4 (c) ve % 0.8 (d) konsantrasyonları, kontrole ait histogram görüntüsü (a) ile karşılaştırıldığında benzer pikler elde edilmiştir. Uygulamalara maruz kalan bitkilere ait görüntülerde hücrelerin oluşturdukları diploid pik, kontrolleriyle aynı görüntüyü vermiştir.



Şekil 4. 4. Tohumlara 24 saat kontrol (a), % 0.2 (b), % 0.4 (c), % 0.8 (d) kolhisin uygulamasından sonra elde edilen bitkilerin flow sitometri sonuçlarının bilgisayar ortamındaki görüntüsü

Uygulama süresi 24 saat olan % 0.2 (b), % 0.4 (c) ve % 0.8 (d) konsantrasyonlarında elde edilen bitki örneklerinin histogramları, kontrole (a) ait histogram görüntüsü ile benzer çıkmıştır. Uygulamalara maruz kalan bitkilere ait görüntülerde hücrelerin oluşturdukları pik, kontrolleriyle (diploid) aynı görüntüyü vermiştir.

4. 2. Fide Döneminde Bitki Büyüme Ucuna Kolhisin Uygulaması

4. 2. 1. Morfolojik Analizler ve SÇKM

In vivo koşullarda bitki büyüme ucuna kolhisin uygulamasından sonra gelişen bitkilerin; bitki boyu, gövde çapı, meyve çapı ve boyu, meyve ağırlıkları ve SÇKM ölçümleri ortalamaları Çizelge 4.8’de verilmiştir

Çizelge 4.8. Bitki boyu (cm), gövde çapı (mm), meyve çapı (mm), meyve boyu (mm), meyve ağırlıkları (g) ve SÇKM (brix) ortalamaları

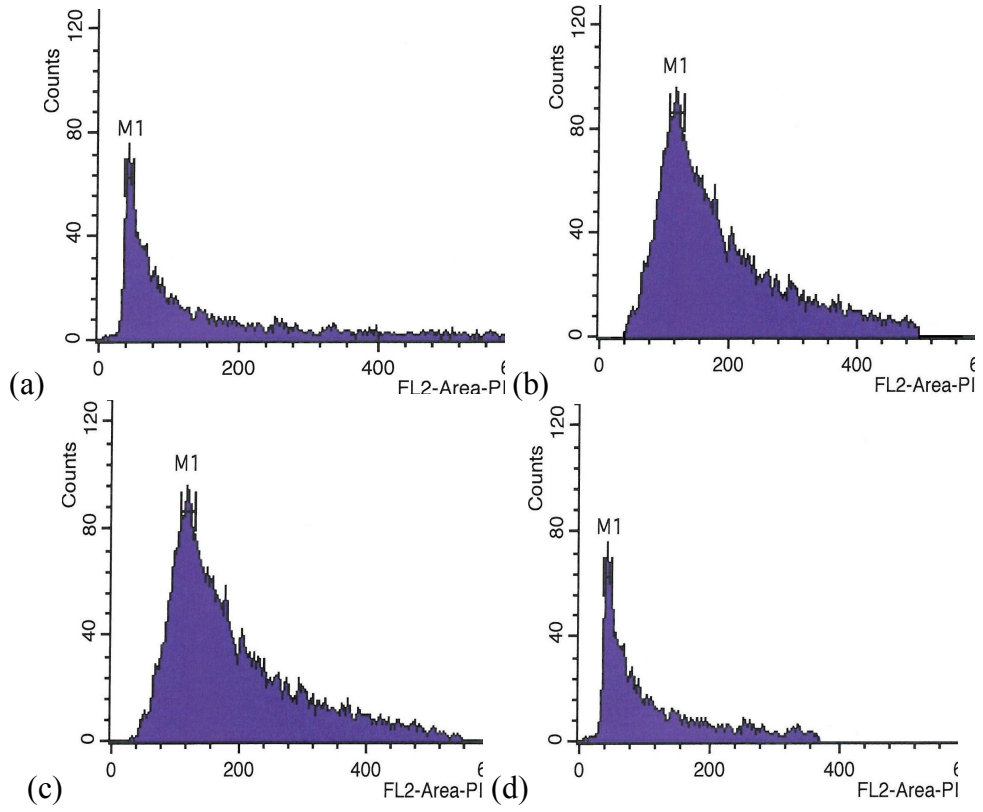
Kolhisin Konsantrasyonu (%)	Meyve Çapı (mm)	Meyve Boyu (mm)	Meyve Ağırlığı (g)	SÇKM (brix)	Bitki Boyu (cm)*	Gövde Çapı (mm)
Kontrol	17,00	18,33	3,00	15,33	30,83 b	6,23
0,2	18,67	19,67	3,00	16,00	38,63 a	6,53
0,4	17,33	18,33	3,00	16,00	36,38 ab	6,38
0,8	17,33	19,00	3,67	15,33	31,88 b	6,14
LSD % 1	Ö. D.	Ö. D.	Ö. D.	Ö. D.	5,65	Ö. D.

* Aynı sütun içerisinde, aynı harfle gösterilen ortalamalar arasındaki fark 0.01 seviyesinde önemli değildir.

Yapılan istatistiksel analizlere göre meyve çapı ve boyu, meyve ağırlığı, SÇKM ve gövde çapı ortalama değerleri arasında fark önemsiz bulunmuştur. Uygulanan konsantrasyonların, kontrolle kıyaslandığında etkili olmadığı tespit edilmiştir. Bununla birlikte, kolhisinin konsantrasyonlarının yalnız bitki boyuna etkisi önemli bulunmuştur. En yüksek değer % 0.2 kolhisin dozunda belirlenmiş ve % 0.4 kolhisin uygulaması bunu takip etmiştir.

4. 2. 2. Flow Sitometri Analizleri

In vivo koşullarda bitki büyüme ucuna kolhisin uygulamasından sonra gelişen altın çilek bitkilerinin yapraklarından alınan örneklerden flow sitometri görüntüleri alınmıştır. Şekil 4.5’da kontrol bitkisinin flow sitometri görüntüsü ile kolhisin uygulamasından sonra elde edilen bitki örneklerinin flow sitometri sonucuna göre bilgisayar ortamındaki görüntüsü sunulmuştur.



Şekil 4. 5. Kontrol (a), % 0.2 (b), % 0.4 (c), % 0.8 (d) kolhisin konsantrasyonlarının bitki büyüme ucuna uygulamalarından alınan bitki örneklerinin flow sitometride bilgisayar ortamındaki görüntüsü

Kontrol bitkisi histogramı (a) diploid görüntüyü vermektedir. Bu görüntü ile kıyaslandığında % 0.2 (b) kolhisin uygulamasından alınan örneğin histogram görüntüsünü incelediğimizde diploid hücrelerin oluşturduğu pik görülmektedir. Buda hücrelerin katlanmadığını göstermektedir. Diğer dozlar olan % 0.4 (c) ve % 0.8 (d) örneklerinin histogramlarında da benzer görüntü elde edilmiştir. Uygulamalara maruz kalan bitkilere ait görüntülerde hücrelerin oluşturdukları pik, kontrolleriyle aynı görüntüyü vermiştir.

Blakeslee ve Avery'nin 1937'de kolhisini kullandıkları çalışmalarından günümüze kadar yapılmış olan birçok çalışmada, kolhisinin birçok bitkide poliploidiyi teşvik etmede başarıyla kullanıldığını bildirilmiştir. Kolhisinin; kullanılan konsantrasyona, uygulama süresine, uygulandığı eksplanta ve bitki tür ve çeşitlerine bağlı olarak birçok çalışmada kromozom katlanmasının sağlanabildiği ve sağlanamadığı çalışmalar mevcuttur. Bununla birlikte, kolhisin etkisiyle poliploidinin teşvik edildiği başarılı çalışmalarda poliploidi elde etme frekansı düşük de olmaktadır (Omidbaigi ve ark., 2010). Yapılan uygulamalardan elde edilen bitkilerde flow sitometri analizleri sonucunda poliploidiye rastlanmamıştır. Kolhisinin aktif olarak büyümekte ve bölünmekte olan hücrelere uygulandığında, kimyasal bir mutajen olarak iş gördüğü ve bitkilerde morfolojik olarak farklı doz ve sürelerde farklı bitki büyüklüğü, yaprak şekli ve iriliği bakımından mutasyonlar meydana getirdiği bildirilmiştir (Seneviratne ve ark., 2002; Joshi ve Verma 2004; Sun ve ark., 2009). Buna bağlı olarak tohumlara ve büyüme ucuna uygulanan kolhisin dozları ve bekleme süreleri kromozom katlamada yeterli olmamıştır. Uygulama yapılan bitki örnekleri ile diploid kontrol bitkilerinin flow sitometri sonuçlarında aynı histogramlar elde edilmiştir.

Kromozom katlamının başarılı olduğu çalışmalarda ise poliploidi oranı ortalama %24'ü geçmemiştir (Espino ve Vazquez, 1981; Gao ve ark., 1996; Chakraborti ve ark., 1998; Adaniya ve Shirai, 2001; Tepe ve ark., 2002; Yetişir ve Sarı, 2003; Shao ve ark. 2003; Thao ve ark., 2003; Liu ve ark., 2007; Lehrer ve ark., 2008; Nilanthi ve ark., 2009; Zhang ve ark., 2010; Solmaz ve Sarı, 2011; İnan, 2007; Xu ve ark. , 2010).

Kolhisin etkileri içerisinde kromozom katlama, yaygın olarak meydana gelse de, yapılmış olan bazı çalışmalarda kromozom sayılarında herhangi bir artışla ilişkilendirilmeyen değişikliklerin olduğu da tespit edilmiştir. Uygulama yapılan bitkilerde incelenen bazı karakterlerdeki (kotiledon yaprak alanı, bitki boyu, gövde çapı, meyve boyutları, meyve ağırlığı SÇKM miktarı) değişiklikleri, kolhisinin bu farklı etkilerine bağlamaktayız. Tohum uygulamamızda saptanan kotiledon yaprak alanındaki % 0.8 dozu 24 saatlik uygulamasında büyük artış, bitki boyundaki % 0.8 dozunda 24 saatlik uygulamada büyük azalış özellikle dikkat çekerken, gövde çapı, meyve boyutları, meyve ağırlığı, SÇKM miktarında ve fide ucu uygulamalarında ise

bitki boyunda meydana gelen belirgin değişimlerde görüldüğü gibi kolhisinin, kullanılan doz ve sürelerde bitkileri etkilediği tespit edilmiştir.

Birçok çalışmada kolhisinin bir kimyasal mutajen olarak etkileri bildirilmiştir (Rauf, 2006; Mensah ve ark., 2007). Siddgi ve Morwat (1983), buğdayda yaptıkları çalışmada kolhisinin bitkide, morfolojik ve sitolojik varyasyonlar oluşturduğunu tespit etmiş ve belirli metabolik işlemleri etkilediğini ve enzimatik reaksiyonları arttırdığını da (Eighthi ve Dustin, 1957) bildirmişlerdir.

Bu çalışmada kolhisinin, tohumlara veya bitki büyüme ucuna uygulanması arasında da farklı sonuçlar elde edilmiştir. Kolhisinin tohuma uygulanması bitkide daha etkili olmuş ve diğer uygulamaya göre birçok karakterde daha fazla varyasyon yaratmıştır. Rauf (2006), kolhisin uygulamaları sonucunda pamukta (*Gossypium arboreum*) kromozom sayılarının katlanmadığını ancak yaprak alanı, çiçeklenme ve çiçek sayısı gibi özelliklerinde değişimler belirlendiğini, bitki boyu ve çimlenme oranlarının kontrollere göre düşük bulunduğunu bildirmiştir. Kendine uyuşmazlık özelliği nedeniyle kolhisin uygulanan tütün (*Nicotiana*) tohumlarında yaptıkları çalışmada Pandey (1968), genetik ve genetik olmayan değişiklikler elde etmiştir. Ayrıca % 0.25 konsantrasyonunda uygulanmasıyla poliploid bitki elde edildiğini, buna karşılık %0.1 gibi düşük konsantrasyon uygulamasından poliploidinin sağlanamadığı, uygulama yapılan ve diploid kalan bitkilerin kendine uyuşur özellik kazandığını belirlemiştir. Mensah ve ark. (2007)'nin yapmış oldukları çalışma ile farklı kolhisin konsantrasyonları (% 0.0-% 0.25 arasında) ile muamele edilen susam tohumlarında doza bağlı olarak bitki boyu, bitki başına meyve sayısı gibi bazı kantitatif özelliklerde azalma meydana gelirken, yaprak alanı, meyve iriliğinde artış olduğunu belirlemiştir. Nickell (1950)'in bildirdiğine göre; Platon ve Nebel, (1940) 40 ppm kolhisin konsantrasyonunun mısır köklerinde solunum oranını azalttığını ve dipeptidaz aktivitesini kestiği belirlenmiştir. Loo ve Tang (1945)'in kolhisinin bitki büyümesine etkileriyle ilgili olarak buğdayda, kolhisin çözeltisine batırılmış tohumlarının çimlenme oranını az olsa da etkilediğini, fakat buğday fidelerinin erken büyümesinde etkisi olmadığını, yüksek konsantrasyonların büyüme engelleyebileceği tespit ettiğini, Newcomer (1945) apikal meristemlerine spreyle kolhisin uygulanmış bazı bitki fidanlarının büyüme oranını uyarttığını, Ghosh (1948)'un kolhisinin düşük konsantrasyonlarında pirinç bitkisinde uyarıcı bir

madde olarak rol aldığını, daha fazla başak üretildiğini ve başaklanmayı indükleyip tane verimini arttırdığını, Eigsti ve Dustin (1957)'nin de kolhisinin temel metabolik yapıları etkileme kapasitesine sahip olduğunu ve konsantrasyon miktarına göre enzimatik reaksiyonların oranında artışı tespit ettiğini bildirmiştir.

Uygulama yapılan generasyon ile bir sonraki generasyonda kolhisinin mutajenik etkileri olduğu belirlenmiştir (Mensah, 2007). Nura ve ark., (2011) jüt (*Corchorus olitorius*) bitkisine ait tohumları, farklı konsantrasyonlardaki kolhisin çözeltilisine daldırmaları sonucu elde ettikleri ilk generasyonda incelenen karakterlerde bir artış sağladığını, bir sonraki meydana gelen generasyonda ise bu karakterlerde önemli bir artış olmadığını rapor etmiştir.

Bu çalışmada flow sitometri ile yaptığımız kromozom sayımlarında, kromozomlarda katlamanın gerçekleşmemiş olmamasına rağmen, meydana gelen ve kromozom sayılarında herhangi bir farklılık olmadan elde edilen morfolojik varyantlar, kolhisinin alkaloid yapısından kaynaklanmaktadır.

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Yapılan bu çalışmada, farklı kolhisin dozları ve bekleme sürelerinin *P. peruviana* bitkisindeki etkilerinin tespit edilmesi amaçlanmıştır. Altın çilekte kolhisin uygulamalarının etkileri ilk defa bu çalışmada araştırılmıştır. Materyal olarak 'Goldenberry' altın çilek çeşidi kullanılmış ve *in vivo*'da kolhisin uygulamaları tohumlara ve fide dönemindeki bitkilerin büyüme ucuna yapılmıştır.

Bu araştırmada öncelikle, altın çileğin kolhisinin etkisini belirlemede morfolojik ölçümlere dayalı ayırım kriterleri kullanılmış, kromozom katlamasına etkisinin tespiti için de ploidi seviyesini belirlemede bitkilerden alınan örnekler flow sitometride analiz edilmiştir.

Çalışma sonunda bitkilerin morfolojik gözlem ve ölçümlerinde görülen belirgin varyasyonlar meydana gelmiş ve katlamanın da gerçekleşmiş olduğu düşünülmüştür. Ancak bitkilerin kromozom sayımlarında katlamanın gerçekleşmediği tespit edilmiştir. Elde edilen bu sonuçlar; kolhisinin çalışılan konsantrasyon ve sürelerin altın çilekte kromozom sayılarının katlamasında yeterli olmadığını, ancak bitkide morfolojik varyasyonlara neden olması sebebiyle morfolojisini etkilediği tespit edilmiştir.

Denemede kolhisinin tohum uygulamalarında en uzun süre 24 saat olarak çalışılmıştır. Bu sürenin, tohumun çimlenmeye başlaması ve hücrelerin aktif olarak bölünmeye başlaması için yeterli olmadığı daha sonraki çalışmalarda uygulama süresinin çimlenmenin tamamlanmasına kadar uzatılmasının veya çimlenmenin tamamlanmasından sonra kolhisin uygulamalarının yapılmasının yararlı olacağı sonucuna da varılmıştır.

Bundan sonra yapılacak çalışmalarda, *in vivo* koşullarda kullanmış olduğumuz 2 yöntemin, kolhisinin ayrıca poliploidi oluşumunu sağlayamaması nedeniyle, *in vivo* veya *in vitro* koşullarda, farklı eksplantlarla veya bitkinin farklı gelişim dönemlerinde, farklı doz ve uygulama sürelerinde çalışılması ile altın çilek bitkisinde poliploidi seviyesini arttırmaya yönelik çalışmaların yapılması gerekmektedir. Uygulama yapılan ve morfolojik varyasyon gösteren bitkilerden elde edilen tohumların yetiştirilerek belirlenen varyasyonların bir sonraki nesilde incelenmesi ve çalışmaların geliştirilmesi öncelikli çalışmalar olmalıdır.

KAYNAKLAR

- ADANIYA S., SHIRAI D., 2001. In vitro induction of tetraploid ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) and its pollen fertility and germinability. *Scientia Horticulturae* 88: 277-287.
- ANDREA B., SCHIFF S., MORI B., 2006. Morphogenic effect of colchicine in *Cichorium intybus* L. root explants cultured in vitro. *Caryologia* Vol. 59, no. 3: 284-290.
- ARUN M., ASHA V.V., 2006. Preliminary studies on antihepatotoxic effect of *Physalis peruviana* Linn. (Solanaceae) against carbon tetrachloride induced acute liver injury in rats/ *Journal of Ethnopharmacology* 111: 110-114.
- ASCOUGH G.D., STANDEN J.V., ERWIN J.E., 2008. Effectiveness of colchicine and oryzalin at inducing polyploidy in *Watsonia lepida* N.E. Brown. *HortScience*. 43(7):2248-2251.
- AZEMI M.E., MOSADDEGH M., CHERAGHALI A.M., NAMJOOYAN F., DRAGER B., 2006. Isolation and Identification of Calystegines in Root Cultures of four *Physalis* Species. *IJPR*, 1: 69-72.
- BHATTACHARYYA B., PANDA D., GUPTA S., BANERJEE M., 2008. Anti-Mitotic Activity of Colchicine and the Structural Basis for Its Interaction with Tubulin. *Medicinal Research Reviews*, Vol. 28, No. 1, 155-183.
- BLAKESLEE A., AVERY A., 1937. Methods of inducing doubling of chromosomes in plants by treatment with colchicine. *J Hered* 28:393-411.
- CARVALHO J.F.R.P., CARVALHO C.R., OTONI W.C., 2005. In Vitro Induction of Polyploidy in Annatto (*Bixa orellana*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 80: 69-75.
- CHAKRABORTI S.P., VIJAYAN K., ROY B. N., QADRI S. M. H., 1998. In vitro induction of tetraploidy in mulberry (*morus alba* l.). *Plant Cell Reports* 17: 799-803.
- COHEN, D., YAO, J.L., 1996. In vitro chromosome doubling of nine *Zantedeschia* cultivars. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 47: 43-49.
- ÇELİK H., 2011. Altın Çilek, Yeni Alternatif Meyve -Prof. Dr. Hüseyin Çelik-OMÜ Ziraat Fakültesi- SAMSUN.
- DHAWAN O.E, LAVANIA U.C., 1996. Enhancing the productivity of secondary metabolites via induced polyploidy: a review *Euphytica* 87: 81-89.
- DHOOGHE E., VAN LAERE K., EECKHAUT T., LEUS L., VAN HUYLENBROECK J., 2010. Mitotic chromosome doubling of plant tissues in vitro. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* DOI 10.1007/s11240-010-9786-5.
- EIGSTI O.J., DUSTIN P., 1957. Colchicine in Agriculture, Medicine, Biology and Chemistry. 1st Edn. The London State College Press, p. 102-118, 125-132 and 262-371.
- ELLİALTIOĞLU Ş., SARI N., ABAK K., 2000. Haploid Bitki Üretimi. *Bitki Biyoteknolojisi-I*. (Ed: Babaoğlu, M., Gürel, E., Özcan, S.) 41 s. (Baskıda).
- ESPINO F.J., VAZQUEZ A.M., 1981. Chromosome numbers of *Saintpaulia ionantha* plantlets regenerated from leaves cultured in vitro with caffeine and colchicine. *Euphytica* 30: 847-853.

- FREDERICK G.G.JR., LING X., CAI C., GROSSER J.W., 1991. Colchicine-Induced polyploidy in *Citrus* embryogenic cultures, somatic embryos and regenerated plantlets. *Plant Science* Volume 74, Issue 1, Pages 135–141.
- GAO S.L., ZHU D.N., CAIZ H., XU D.R., 1996. Autotetraploid plants from colchicine-treated bud culture of *Salvia miltiorrhiza* Bge. *Plant Cell, Issue and Organ Culture*. 47: 73-77.
- GHOSH S., JHA S., 2008. Colchicine – an Overview for Plant Biotechnologists. *Bioactive Molecules and Medicinal Plants*, pp 215-232.
- GLOWACKA K., JEZOWSKI S., KACZMAREK Z., 2010. In vitro induction of polyploidy by colchicine treatment of shoots and preliminary characterisation of induced polyploids in two *Miscanthus* species. *Industrial Crops and Products* 32: 88–96. <http://www.ejbiotechnology.info/content/vol8/issue2/full/2/>
- HUNTER K.L., HUNTER R.B., 2004. Marigold cell size and polyploidy. Pages 125-133, in *Tested studies for laboratory teaching*, Volume 25 (M. A. O'Donnell, Editor). <http://www.zoo.utoronto.ca/able/volumes/copyright.htm>
- İLARSLAN İ.H., 1990. Diploid ve Tetraploid Çavdar (*Secale cereale* L.) Bitkisinin Morfolojik, Sitolojik ve Palinolojik Yapılarının Karşılaştırılması. A.Ü. Fen Bilimleri Enst., Doktora Tezi, Ankara, 92s.
- İNAN S., SARI N., 2007. Karpuz (*citrullus lanatus* (thunb.) matsum ve nakai)'da *in vivo* ve *in vitro* yöntemlerle tetraploid bitki elde edilmesi.
- JOSHI P., VERMA R.C., 2004. High Frequency Production of Colchicine Induced Autotetraploids in Faba Bean (*Vicia faba* L.) *Cytologia*. Vol. 69;(2); p.141-147.
- KADOTA M., NIIMI Y., 2002. In vitro induction of tetraploid plants from a diploid Japanese pear cultivar (*Pyrus pyrifolia* N. cv. Hosui) *Plant Cell Rep*. 21:282–286.
- KEHR A.E., 1996. Polyploids in rhododendron breeding. *J. Am. Rhod. Soc.* 50:215-217.
- KERMANI M.J., SARASAN V., ROBERTS A.V., YOKOYA K., WENTWORTH J., SIEBER V.K., 2003. Oryzalin-induced chromosome doubling in *Rosa* and its effects on plant morphology and pollen viability. *Theory of Applied Genetics*. 107:1195–1200.
- LAN YU-HSUAN, CHANG FANG-RONG, PAN MEI-JUNG, WU CHIN-CHUNG, WU SHU-JING, CHEN SU-LI, WANG SHYH-SHYAN, WU MING-JUNG, WU YANG-CHANG, 2009. New Cytotoxic Withanolides from *Physalis peruviana*. *Food Chemistry* 116: 462–469.
- LEHRER J.M., BRAND M.H., LUBELL J.D., 2008. Induction of tetraploidy in meristematically active seeds of Japanese barberry (*Berberis thunbergii* var. *atropurpurea*) through exposure to colchicine and oryzalin. *Scientia Horticulturae* 119: 67–71.
- LIU G., LI Z., BAO M., 2007. Colchicine-induced chromosome doubling in *Platanus acerifolia* and its effect on plant morphology. *Euphytica* 157:145–154.
- MARTINEZ M., 1998. Revision of *Physalis* Section *Epeteiorrhiza* (*Solanaceae*). *Anales del Instituto de Biologia Universidad Nacional Autonoma de Mexico, Serie Botanica* 69(2): 71-117.

- MENSAH J.K., OBADONI B.O., AKOMEAH P.A., IKHAJIAGBE B., AJIBOLU J., 2007. The effects of sodium azide and colchicine treatments on morphological and yield traits of sesame seed (*Sesame indicum* L.).
- MENZEL M.Y., 1951. The cytotaxonomy and genetics of *Physalis*. Proceedings of the American Philosophical Society 95: 132–183.
- MEYER E.M., TOUCHELL D.H., RANNEY T.G., 2009. In Vitro Shoot Regeneration and Polyploid Induction from Leaves of *Hypericum* Species Hortscience 44(7):1957–1961.
- MOLIN W.T., MAYERS S.P., BAER G.R., SCHRADER L.E., 1982. Ploidy effects in isogenic populations of alfalfa. II. Photosynthesis chloroplast number, ribulose-1,5-biphosphate carboxylase, chlorophyll, and DNA in protoplasts. Plant Physiol. 70: 1710-1714.
- NICKELL LOUIS G., 1950. Effects of Certain Plant Hormones and Colchicine on the Growth and Respiration of Virus Tumor Tissue from *Rumex Acetosa*. American Journal of Botany Vol. 37, No:10, pp. 829-835.
- NILANTHI D., CHEN X.L., ZHAO F.C., YANG Y.S., WU H., 2009. Induction of Tetraploids from Petiole Explants through Colchicine Treatments in *Echinacea purpurea* L. Journal of Biomedicine and Biotechnology Volume 2009, Article ID 343485, 7 p.
- NTULI N.R., ZOBOLO A.M., 2008. Effect of water stress on growth of colchicine induced polyploid *Coccinia palmata* and *Lagenaria sphaerica* plants. African Journal of Biotechnology Vol. 7 (20), pp. 3548-3652.
- NURA S., ADAMU A.K., MU'AZU S., DANGORA D.B., 2011. Chemical Mutagenesis For Improved Quality Traits In Jute (*Corchorus Olitorious* L.). Continental J. Biological Sciences 4 (2): 22 - 27.
- OMIDBAIGI R., MIRZAEI M., HASSANI M.E., MOGHADAM MS., 2010. Induction and identification of polyploidy in basil (*Ocimum basilicum* L.) medicinal plant by colchicine treatment. International Journal of Plant Production 4 (2), 1735-8043.
- PANDEY K.K., 1968. Colchicine-Induced Changes in the Self-Incompatibility Behaviour of *Nicotiana*. Genetica 39: 257-271.
- PEGTEL D.M., 1999. Effect of ploidy level on fruit morphology, seed germination and juvenile growth in scurvy grass (*Cochlearia officinalis* L. s.l., Brassicaceae). Plant Species Biology 14, 201–215.
- POPOYA A., PANAJOTOV N., IVANOVA I., 2010. Express Method for Determination of Leaf Area of Cape Gooseberry *Physalis peruviana* L.. Agricultural Academy, Sofia Date of publication.
- PREDIERI S., 2001. Mutation induction and tissue culture in improving fruits Plant Cell, Tissue and Organ Culture 64: 185–210.
- PUENTE LUIS A., PINTO-MUNOZ CLAUDIA A., CASTRO EDUARDO S., CORTES MISAEL, 2011. *Physalis peruviana* Linnaeus, the multiple properties of a highly functional fruit: A review. Food Research International 44 1733–1740.
- RAMADAN & MOERSEL, 2003. Analysis of glycolipids from black cumin (*Nigella sativa* L.), coriander (*Coriandrum sativum* L.) and niger (*Guizotia abyssinica* cass.) oilseeds. Food Chem., 80: 197-204.
- RAMADAN & MOERSEL, 2004. Goldenberry: a novel fruit source of fat soluble bioactives. Information, 15: 130-131.

- RAUF S., KHAN I.A., KHAN F.A., 2006. Colchicine-Induced Tetraploidy and Changes in Allele Frequencies in Colchicine-Treated Populations of Diploids Assessed with RAPD Markers in *Gossypium arboreum* L.
- RODRIGUES E., ROCKENBACH I.I., CATANEO C., GONZAGA L.V., CHAVES E. S., FETT R., 2009. Minerals and essential fatty acids of the exotic fruit *Physalis peruviana* L.. Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, 29(3): 642-645, jul.-set.
- RODRIGUEZ S. & RODRIGUEZ E., 2007. Efecto de la ingesta de *Physalis peruviana* (aguaymanto) sobre la glicemia postprandial en adultos jóvenes. Revista Médica Vallejiana, 4(1), 43–52.
- ROYCHOWDHURY R., TAH J., 2011. Chemical mutagenic action on seed germination and related agro-metrical traits in M1 *Dianthus* generation. Current Botany, 2(8): 19-23 ISSN: 2220-4822.
- RUBULUZA T., NIKOLOVA R.V., SMITH M.T, HANNWEG K., 2007. In vitro induction of tetraploids in *Colophospermum mopane* by colchicine. South African Journal of Botany 73: 259–261.
- SALAZAR M., JONES J., CHAVES B., COOMAN A., 2008. A model for the potential production and dry matter distribution of Cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.). Scientia Horticulturae, 115(2), 142–148.
- SENEVIRATNE K.A.C.N., KRISHINARAJAH S.A., WIJESUNDARA D.S.A., PALIPANE P.W.U.B., 2002. Colchicine induced floral variations in African violets (*Saintpaulia ionantha* H. Wendl.). Annals of the Sri Lanka Department of Agriculture. 4: 227-232.
- SHAO J., CHEN C., DENG X., 2003. In vitro induction of tetraploid in pomegranate (*Punica granatum*) Plant Cell, Tissue and Organ Culture 75: 241–246.
- SHAROBA A.M., RAMADAN M.F., 2009. Rheological Behavior and Physicochemical Characteristics of Goldenberry (*Physalis peruviana*) Juice as Affected by Enzymatic Treatment. Journal of Food Processing and Preservation 35 (2011) 201–219. Doi: 10.1111/j.1745-4549.00471.
- SIDDIGI S. H., MORWAT K. B., 1983. Cytomorphological Effects of Colchicine on Wheat (*Triticum aestivum*). Pakistan J. Agric. Res., Vol. 4, No.2.
- SOLMAZ I., SARI N., GÜRSOY I., KASAPOĞLU S., 2011. Comparison of *in vivo* and *in vitro* Colchicine Application for Production of Dihaploid ‘Kirkagac’ and ‘Yuva Hasanbey’ Melons. African Journal of Biotechnology Vol. 10(70), pp. 15717-15724.
- SONG P., KANG W., PEFFLEY E.B., 1997. Chromosome doubling of *Allium fistulosum* X *A. cepa* interspecific F1 hybrids through colchicine treatment of regenerating callus. Euphytica 93: 257–262. 257.
- STANYS V., WECKMAN A., STANIENE G., 2003. Polyploidization of Japanese Quince (*Chaenomeles japonica*) Plants. Rumpunen (Ed.) Japanese Quince – Potential Fruit Crop for Northern Europe.
- SUN Q., SUN H., LI L., BELL R.L., 2009. In vitro colchicine-induced polyploid plantlet production and regeneration from leaf explants of the diploid pear (*Pyrus communis* L.) cultivar, ‘Fertility’. Journal of Horticultural Science & Biotechnology 84 (5) 548–552.
- ŞEHİRALİ S., YAZGAN M., 1986. Bitki Islahı. Ankara Üniv. Ziraat Fak. Yayınları: 971, Ofset Basım Ders Notu: 20, s:176-186.

- TEPE Ş., ELLİALTIOĞLU Ş., YENİCE N., TIPIRDAMAZ R., 2002. In Vitro Kolhisin Uygulaması İle Poliploid Nane (*Mentha Longifolia* L.) Bitkilerinin Elde Edilmesi. Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 15(2),63-69.
- THAO N.T.P., URESHINO K., MIYAJIMA I., OZAKI Y., OKUBO H., 2003. Induction of Tetraploids in Ornamental *Alocasia* Through Colchicine and Oryzalin Treatments. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 72: 19–25.
- URWIN N.A.R., HORSNELL J., MOON T., 2007. Generation and characterisation of colchicine-induced autotetraploid *Lavandula angustifolia*. *Euphytica* 156:257–266.
- WEI L., DONG-NAN H., HUI L., XIAO-YANG C., 2007. Polyploid induction of *Lespedeza formosa* by colchicine treatment. *Forestry Studies in China*, Vol.9, No.4. p. 283–286.
- WU S.J., TSAI J.Y., CHANG S.P., LIN D.L., WANG S.S., HUANG S.N., 2006. Supercritical carbon dioxide extract exhibits enhanced antioxidant and antiinflammatory activities of *Physalis peruviana*. *Journal of Ethnopharmacology*, 108, 407–413.
- VAINOLA 1999. Polyploidization and early screening of *Rhododendron* hybrids, *Euphytica* 112: 239–244.
- VALDENEGRO M., FUENTES L., HERRERA R., M. A. MOYA-LEON, 2012. Changes in Antioxidant Capacity During Development and Ripening of Goldenberry (*Physalis peruviana* L.) Fruit and in Response to 1-methylcyclopropene Treatment. *Postharvest Biology and Technology* 67: 110–117.
- XING S.H., GUO X.B, WANG Q., PAN Q.F., TIAN Y.S., LIU P., ZHAO J.Y., WANG G.F., SUN X.F., TANG K.X., 2011. Induction and Flow Cytometry Identification of Tetraploids from Seed-Derived Explants through Colchicine Treatments in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. Hindawi Publishing Corporation *Journal of Biomedicine and Biotechnology* Volume 2011, Article ID 793198, 10 pages.
- XU L., NAJEEB U., NAEEM M.S., DAUD M.K., CAO J.S., GONG H.J., SHEN W.Q., ZHOU W.J., 2010. Induction of tetraploidy in *Juncus effusus* by colchicine *Biologia Plantarum* 54 (4): 659-663.
- YEN C.Y., CHIU C. C., CHANG F. R., CHEN J.Y.F., HWANG C.C., HSEU Y.C., YANG H.L., LEE A.Y.L., TSAI M.T., GOU Z.L., CHENG Y.S., LIU Y.C., KO Y.C., CHENG H.W., 2010. 4b-Hydroxywithanolide E from *Physalis peruviana* (golden berry) inhibits growth of human lung cancer cells through DNA damage, apoptosis and G2/M arrest. *BMC Cancer*, 10:46.
- YETİŞİR H., SARI N., 2003. A New Method for Haploid Muskmelon (*Cucumis melo* L.) Dihaploidization. *Scientia Horticulturae*, 98: 277-283.
- ZHANG X.Y., HU C.G., YAO J.L., 2010. Tetraploidization of Diploid *Dioscorea* Results in Activation of the Antioxidant Defense System and Increased Heat Tolerance. *Journal of Plant Physiology* Volume 167, Issue 2, Pages 88–94.

ÖZGEÇMİŞ

Çiğdem CEREN, 1986 yılında Mersin’de doğdu. İlk, orta ve liseyi Mersin’de tamamladı. 2009 yılında Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümünden mezun oldu. 2012 yılında Harran Üniversitesi Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitimini tamamladı.

ÖZET

Kolhisinin etkisi; uygulama koşullarına ve yöntemlerine, bitki tür ve çeşidine, bitki eksplantına, bitkinin gelişim dönemine, uygulama doz ve süresine bağlı olarak değişmektedir. Kolhisin, antimitotik etkisinin yanında bitkinin fizyolojisini, metabolizmasını ve enzimatik reaksiyonlarını etkilemekte ve ayrıca mutajen olarak da görev almaktadır.

P. peruviana konusunda bilimsel araştırmalar açısından eksiklik olduğu, özellikle verimliliğin artırılması, meyve iriliğinin, ikincil metabolitlerin ve meyvenin kimyasal profillerinin miktarının daha da artırılması konularında çalışmaların önemli olduğu düşünülmektedir.

İlk defa bu çalışmada, farklı kolhisin dozları (% 0.0, 0.2, 0.4, 0.8) ve uygulama süreleri (8, 16, 24 saat), fidelerin büyüme ucuna ve tohumlara uygulamak üzere, iki yöntem kullanılmıştır. Meydana gelen değişimlerin tespiti için bitkilerin kotiledon yaprak alanı, bitki boyu, gövde çapı, meyve boyutları, meyve ağırlığı, SÇKM miktarı ölçülmüş ve flow sitometri analizleri yapılmıştır.

Bu denemenin sonucunda, tohum uygulamalarının morfolojik analizlerinde; kotiledon yaprak alanı uygulama süresi ve konsantrasyonu arttıkça farklılıklar göstermiştir. En yüksek değer 24 saat uygulamasının %0.8 uygulamasında tespit edilmiştir. Uygulama süresi ve konsantrasyona bağlı olarak bitki boyunda değişimler meydana gelmiş, yüksek doz ve sürenin bitki boyuna olumsuz etkileri belirlenmiştir. Uygulanan kolhisin dozu arttıkça gövde çapı, meyve boyutları ve meyve ağırlığında artış, SÇKM miktarında ise azalma meydana gelmiştir. Büyüme ucuna yapılan uygulamalarda ise sadece bitki boyunda önemli farklılıklar meydana gelmiştir. Her iki uygulama yönteminin flow sitometri sonuçları incelendiğinde kromozom katlamasına rastlanmamıştır.

Bu sonuçlara göre kolhisin, uyguladığımız doz ve sürelerde, kromozom katlaması meydana gelmemiş, bitkilerde sadece morfolojik varyasyonların oluşmasına neden olmuştur.

Araştırmada elde edilen sonuçlara dayanılarak, kolhisinin etkisini arttırmak için altın çilekte; farklı eksplant çeşitleri, bitki gelişim dönemleri, uygulama konsantrasyonları ve zamanları kullanılarak yeni kolhisin uygulama stratejileri geliştirilmelidir. Buna ek olarak, araştırmada belirlenen varyasyonları yeni

generasyonda değerlendirmek için, denemede bitkilerden elde edilen tohumlar ile araştırmanın devam edilmesi düşünölmektedir.

SUMMARY

Effects of colchicine vary depending on application methods, plant species and varieties, explants, plant growth stages, concentration and treatment time. In addition to its antimitotic effect, colchicine affects plant physiology, metabolism and enzymatic reactions and also have a role as a mutagen.

Due to the limited scientific research on *P. peruviana*, it is thought to be important study to increase particularly yield, fruit size and the chemical profiles of secondary metabolites.

In this study, different colchicine concentrations (0.0, 0.2, 0.4, 0.8%) were applied to shoot tips of seedlings and seeds in different treatment times (8, 16, 24 hours). Cotyledon leaf area, plant height, stem diameter, fruit size, fruit weight, soluble solid content of fruits (SS) were measured and also flow cytometry analysis was carried out.

The results of seed treatments showed that the plant characteristics measured were changed by colchicine doses and times. The largest cotyledon leaf area was determined in treatment 0.8% colchicine during 24 hours. Plant height was affected by colchicine concentration and treatment time. Stem diameter, fruit size and fruit weight increased and SS decreased with increasing concentrations. Application of colchicine to shoot tips was effective on plant height and it was measured shorter in higher doses. According to the results of flow cytometry analysis, it was found that colchicine applications were not caused any changes in number of chromosomes of the plants in both methods.

Based on the results obtained from our study, it was driven a conclusion that new colchicine application strategies should be advanced by using different explant types, plant growth stages, concentrations and application times. Moreover, investigations using the seeds of plants obtained from this study could provide a better understanding on the variations observed in subsequent generations.