

Bazı turunçgil genotiplerinden tetraploid bitki elde edilmesi*

Berken ÇİMEN^{1**} Turgut YEŞİLOĞLU¹ Meral İNCESU¹
Bilge YILMAZ¹ Yıldız AKA KAÇAR¹

¹ Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü, Adana

Alınış Tarihi: 21 Haziran 2016 Kabul Tarihi: 02 Ağustos 2016

Öz

Dünyada ve ülkemizde turunçgil çeşit geliştirme programlarının en güncel hedefi çekirdeksiz yeni çeşitlerin geliştirilmesidir. Turunçgillerde çekirdeksizlik doğal ve yapay mutasyonlarla sağlandığı gibi, diploid ebeveyn bitkiler veya diploid ve tetraploid ebeveyn bitkiler arasında gerçekleşen melezlemeler yoluyla da sağlanmaktadır. Bu nedenle çekirdeksizlik ıslahı çalışmaları açısından, turunçgil gen kaynaklarında doğal olarak bulunmayan tetraploid bireylerin üretilmesi büyük önem taşımaktadır. Bu çalışma, ploidi ıslahı yoluyla çekirdeksiz yeni turunçgil çeşitlerini geliştirmek amacıyla tetraploid bitki elde edilmesine yönelik olarak planlanmıştır. Çalışmada, Klemantin 22D mandarini, W. Murcott mandarini ve Moro kan portakalı genotipleri kullanılmış ve bu genotiplerin aşı kalemlerine kolhisin uygulamasının tetraploid bitki elde edilmesine etkileri araştırılmıştır. Aşı kalemlerine %0.0, %0.2, %0.4, %0.6 ve %0.8 dozlarında 4, 6 ve 8 saat süreyle kolhisin uygulaması gerçekleştirilmiştir. Kolhisin uygulamaları sonucu elde edilen bitkilerde canlılık oranı (%) belirlendikten sonra tüm bitkilerden alınan yaprak örneklerinde flow sitometri yoluyla ploidi analizi yapılmıştır. Ayrıca tetraploid bitkilerde stomal gözlemler (stoma yoğunluğu, uzunluğu, genişliği, büyüklüğü ve indeksi) yapılarak diploid bitkiler ile karşılaştırılmıştır. Çalışma sonucunda, Klemantin 22D aşı kalemine 6 saat süreyle %0.4 dozunda yapılan uygulama sonucu bir adet tetraploid (4x) bitki elde edilmiştir. Ayrıca W. Murcott mandarini ve Moro Kan portakalı çeşitlerinden mixoploid (2x+4x) bitkiler elde edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Turunçgil, Kolhisin, Flow sitometri, Stomal özellikler

Production of tetraploid plants of some citrus genotypes

Abstract

Improving new seedless citrus varieties is currently the main aspect of citrus breeding programs for both our country and the world. Triploid plants can be recovered directly from artificial and spontaneous mutations as well as crosses

* Sorumlu yazarın doktora tezinden türetilmiştir.

** Sorumlu yazar (Corresponding author): bcimen@cu.edu.tr

between two diploid genotypes resulting from the fertilization of 2n megagametophyte or by hybridization between diploid and tetraploid parents. Thus, production of tetraploid plants which are not naturally found in citrus germplasm has a great importance in terms of seedlessness breeding studies. This study covers production of tetraploid plants for parental usage in order to improve new varieties by ploidy manipulation. Buds of Clementine 22D, W. Murcott and Moro blood orange were used as plant material and effects of colchicine treatments on production of tetraploid forms of these genotypes were investigated. In this purpose, scion buds were treated with colchicine at concentration levels of 0.0%, 0.2%, 0.4%, 0.6% and 0.8% for 4, 6 and 8 hours. After treatments, survival rate (%) of plants was recorded and ploidy levels of the plants were determined by flow cytometry analysis. In addition, stomatal observations were recorded such as stomata density, length, width, size and index on the leaves of tetraploid plants in order to compare them with the observations of diploid plants. As a result of the study one tetraploid plant of Clementine 22D mandarin was recovered from the 0.4% colchicine treatment for 6 hours. Besides, mixoploid (2x+4x) forms of W. Murcott mandarin and Moro blood orange were recovered.

Keywords: Citrus, Colchicine, Flow cytometry, Stomatal characteristics

1. Giriş

Türkiye'nin de içerisinde yer aldığı Akdeniz havzasında dünya turunçgil üretiminin %22'si gerçekleştirilmektedir. Ülkemiz turunçgil üretimi 2012 yılında 3 681 158 tona ulaşmış olup, dünya toplam turunçgil meyveleri üretiminin %2.71'ini oluşturmaktadır. Turunçgil meyveleri ihracatı bakımından Dünyada ve Akdeniz ülkeleri içerisinde Türkiye 2. sırada yer almaktadır. Dünyada 2013 yılı verilerine göre 15 769 220 ton turunçgil meyvesi ihraç edilmiş ve bunun yaklaşık yarısı Avrupa'da gerçekleşmiştir (FAO, 2016). Ülkemiz turunçgil ihracatını Doğu Avrupa pazarlarına (özellikle Rusya, Ukrayna, Romanya, Polonya, Bulgaristan vd.) ve bazı Ortadoğu (Irak, Suudi Arabistan, İran, vd.) ülkelerine yapmaktadır. Bu pazarların büyük bir kısmı tüketici reflexleri henüz gelişmekte olan ülkeler olması sebebiyle son yıllarda ülkemizin pazar kayıpları yaşama riski giderek artmaktadır. Bu riskli pazarlarda tutunabilmek; daha istikrarlı ve iyi bir ithalatçı olan Batı Avrupa pazarlarına yeniden girmek ve yeni pazarlar bulabilmek için turunçgil sektörünü güçlendirmek gerekmektedir. Bunu başarmak için öncelikle yeni çeşitlerin geliştirilerek Türkiye turunçgil endüstrisinin rekabet gücünün artırılması gereklidir (Yeşiloğlu vd., 2013).

Çekirdeksizlik başta mandarinlerde olmak üzere özellikle turunçgil ihracatında oldukça önemlidir. Yeni çekirdeksiz çeşitlerin geliştirilmesinde triploid melez elde edilmesi önemli bir ıslah stratejisi haline gelmiştir (Ollitrault vd., 2008). Turunçgillerde triploid bitkiler iki diploid ebeveynin melezlenmesiyle (Esen ve Soost, 1971; Geraci vd., 1975; Luro vd., 2004) ya da diploid ve tetraploid ebeveyn bitkilerin melezlenmesi yoluyla elde edilebilmektedir (Esen ve Soost, 1971; Esen ve Soost, 1977; Oiyama vd., 1981; Starrantino ve Recupero, 1981).

Polyploidi ıslahı birçok bitki türünün geliştirilmesinde önemli rol oynamıştır. Ekonomik açıdan önem taşımakta olan elma, muz, dut, şeker pancarı, çay ve karpuz gibi pek çok türün triploid olan kültür varyeteleri bugün ticari olarak yetiştirilmektedir. Turunçgiller ve akrabalarında az sayıda triploid ve tetraploid çeşit bulunmaktadır. *Citrus*, *Fortunella* ve *Poncirus* cinslerinin hemen hepsi 18 kromozom sayısı ile diploid yapıdadır.

Kolhisinin 1930'lu yıllarda keşfiyle beraber birçok bitki türünde elit tiplerin ve dolayısıyla genetik çeşitliliğin oluşturulmasında kullanılmaya başlanmıştır. Günümüzde kromozom katlaması için bitki ıslahçıları tarafından en yaygın kullanılan kimyasal maddelerden birisidir. Bu madde güz çiğdeminin (*Colchicum autumnale* L.) köklerinden elde edilen alkaloid yapısında kuvvetli bir zehir olup; renksiz, alkol, kloroform ve soğuk suda çözünen; sıcak suda ve eterde erimeyen bir maddedir. Kimyasal formülü $C_{22}H_{25}NO_6$ olarak gösterilir. Kolhisin, uygulandığı dokuların hücrelerinde mitoz bölünmenin metafaz safhasında iğ ipliklerinin oluşumunu engeller ve dolayısı ile replikasyona uğramış kromozomların kutuplara çekilmesini önleyerek, kromozom sayısının iki katına çıkmasını sağlar (Ellialtıoğlu vd., 2000). Kolhisin uygulamasıyla kromozom sayısı ikiye katlanan bitkiler doğrudan çeşit olarak da kullanılmasıyla beraber, özellikle çekirdeksizlik hedefli ıslah programlarında üstün ebeveyn olarak oldukça önem taşımaktadır.

Kendiliğinden gelişen doğal tetraploidizasyon turunçgil türlerinde nüseller dokusunun mutasyon sonucu katlanması yoluyla ender olarak görülmesine karşın, Türkiye turunçgil gen kaynağı bahçelerinde ticari olarak önemli veya ıslah programlarında kullanılabilir nitelikte olan genotiplerin doğal veya yapay tetraploid formları bulunmamaktadır. Turunçgillerde tetraploidi yapay yollarla sürgün uçlarına kolhisin uygulaması (Wakana vd., 2005) ve mikro aşılama yöntemleri kombinasyonuyla yada embriyogenik kallusların kolhisin içeren ortamlarda kültüre alınarak rejenerasyon yöntemleriyle elde edilebilir (Tachikawa vd., 1961; Barrett, 1974; Gmitter ve Ling, 1991; Gmitter vd., 1991; Aleza vd., 2009). ABD ve İspanya başta olmak üzere araştırmacılar kendi ıslah hedeflerine göre belirledikleri turunçgil

genotiplerinde bu yöntemleri kullanarak tetraploid bitkiler elde etmişlerdir. Aleza vd. (2009) Clemenules, Fina ve Marisol mandarinlerinin kolhisin uygulanmış sürgün uçlarını in vitro mikro aşılama yöntemiyle elde ettikleri tetraploid bitkilerde melezleme çalışmaları yaparak üç yıl içerisinde 3 250'den fazla triploid melez bitki geliştirmişlerdir.

Bu çalışmada, turunçgil melezleme ıslahı programlarında halihazırda sıklıkla kullanılan, meyve verim ve kalitesi yanında olgunlaşma dönemleri bakımından öne çıkan özelliklere sahip diploid Klemantin 22D mandarini, W. Murcott mandarini ve Moro kan portakalı genotiplerinden tetraploid bitki elde edilmesi amaçlanmıştır.

2. Materyal ve Yöntem

2.1. Materyal

Çalışmada bitkisel materyal olarak Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Turunçgil Koleksiyon Bahçelerinde bulunan Klemantin 22D mandarini, W. Murcott mandarini ve Moro kan portakalı genotipleri kullanılmıştır. Klemantin 22D mandarini, Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümünde yürütülen bir seleksiyon çalışmasında Dalaman-Muğla'dan seleksiyonla elde edilmiş verimli, kaliteli bir klemantin mandarinidir (İncesu, 2004). W. Murcott mandarini, yeni mandarin çeşitleri içerisinde olumlu özellikleriyle en çok göze çarpanıdır. Murcott ve Klemantin mandarininin hibriti olduğu sanılmaktadır. Ağaçları verimli ve erken meyveye yatmakta olup pazar değeri yüksek bir çeşittir. Moro kan portakalı ise çok verimli bir çeşit olup, kan portakalları arasında değişik ekolojik koşullara en iyi uyum gösteren çeşittir. En erkenci kan portakalıdır (Saunt, 2000).

2.2. Yöntem

Çalışma, 2014 yılı içerisinde belirtilen genotiplerin aşı kalemlerine kolhisin uygulaması şeklinde yürütülmüştür. Klemantin 22D, W. Murcott mandarini ve Moro kan portakalının bir yıllık ilkbahar sürgünlerinden en az 2-3 göz içeren 5 cm'lik aşı kalemlerine %0.0 (kontrol), %0.2, %0.4, %0.6 ve %0.8'lik kolhisin dozları 4, 6 ve 8 saat süreyle uygulanmıştır. Uygulama boyunca kolhisin çözeltisi içerisinde bulunan aşı kalemleri dakikada 60 defa olacak şekilde yatay çalkalayıcı yardımıyla çalkalanmış, sürelerin

tamamlanmasından hemen sonra aşı kalemleri iki defa saf sudan geçirilerek C-35 sitranji anacı üzerine gözler aşılanmıştır. Aşılamadan itibaren bitkiler mikroskobik gözlemler ve flow sitometri analizleri için 6 ay süreyle serada yetiştirilmiştir (Wakana vd., 2005; Yahata vd., 2005). Kolhisin uygulaması, her genotipte bütün doz ve uygulama süresi için 30 göz kullanılarak gerçekleştirilmiş ve deneme kapsamında toplamda 1 350 adet göz kullanılmıştır. Çalışma sonunda aşağıdaki formüle göre uygulama sonrası canlılık oranı (%) hesaplanmıştır.

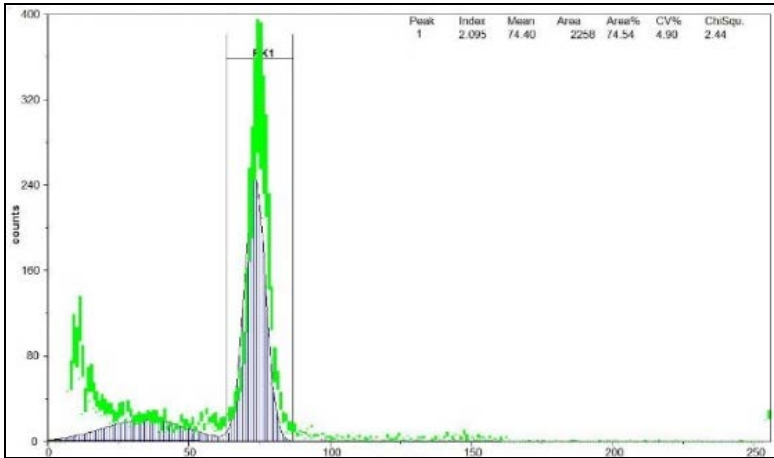
$$\text{Canlılık oranı (\%)} = \frac{\text{Gelişim gösteren göz sayısı}}{\text{Uygulama yapılan göz sayısı}} \times 100$$

Canlılık oranlarına ait % değerlerin açısız (arcsin) transformasyonu yapılarak istatistiksel analizlerde bu değerler kullanılmıştır. Elde edilen canlılık değerleri, her çeşit için kendi içerisinde uygulama ana etkilerini incelemek amacıyla SAS v9.0 programının GLM prosedürü kullanılarak tek yönlü varyans analizine tabi tutulmuştur. Uygulama süre ve dozlarına ait ortalamaların karşılaştırmaları LSD testi ile $\alpha=0.05$ güven seviyesinde değerlendirilmiştir.

Canlılık oranları hesaplandıktan sonra süren aşı gözlerinden elde edilen tüm sürgünlerin yapraklarından flow sitometri analizleri için Tuna (2014) 'nın bildirdiği şekilde örnekler alınmıştır. Alınan yaprak örneklerinde Niğde Üniversitesi, Tarım Bilimleri ve Teknolojileri Fakültesi, Tarımsal Genetik Mühendisliği Bölümü laboratuvarlarında bulunan Partec CyFlow Space (Partec GmbH, Münster, Germany) flow sitometresi ile ploidi düzeyleri incelenmiştir. Flow sitometri analizleri ilgili cihazın kit prosedürüne bağlı kalınarak gerçekleştirilmiştir. 0.5 cm²' büyüklüğünde alınan yaprak örnekleri Petri kutuları içerisine yerleştirilmiş ve üzerine 0.5 mL Partec HR-A eklendikten sonra jilet yardımıyla iyice kıyılmıştır. Kıyılmış örnekler 30 µm geçirgenliğindeki filtre yardımıyla süzülerek üzerine DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) içeren Partec HR-B solüsyonu eklenmiş ve 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda kontrol uygulamasına ait W. Murcott mandarini, Klemantin 22D mandarini ve Moro kan portakalının yapraklarının DAPI ile boyanmış çekirdeklerinin nüklear DNA içeriği Partec CyFlow Space flow sitometrisinde 365 nm dalga boyunda UV led kaynaklı çekirdek floresanından geçirilerek ölçülmüştür. Her yaprak örneği için 1000-3000 çekirdek analiz edilmiştir. Oluşan histogramlar, pik pozisyonu ve varyasyon katsayısı (CV) ilgili cihazın yazılımı (dpac v2.0) yardımıyla hesaplanmıştır (Aleza vd., 2009; Tuna, 2014). Ayrıca kontrol ve karşılaştırma

amacıyla bir adet doğal triploid (Bearss laymı, 3x) ve bir adet yapay triploid çeşide (Oroblanco, 3x) ait yaprak örneklerinden elde edilen pik noktalarına ait florasan ışık yoğunlukları da belirlenmiştir. Böylece, triploid yapıdaki Bearss laymı ve Oroblanco çeşidinin 365 nm UV Led kaynağının altında yaprak hücresi çekirdek DNA miktarlarının pik yaptığı ortalama değer standart referans olarak alınmıştır. Örneklerin ploidi seviyeleri referans çekirdek DNA miktarının verdiği ortalama ışımaya yoğunluğu değeri ile kıyaslama yapılarak belirlenmiştir. Referans bitkinin yaprak hücresi çekirdek DNA içeriği ve ışımaya yoğunluk noktası Şekil 1'de verilmiştir.

Ploidi seviyesi bakımından farklılık gösterdiği flow sitometri ile belirlenen bitkilerde bazı mikroskopik gözlemler yapılmıştır. Ayrıca, yaprak stoma yoğunluğu, stoma uzunluğu, stoma genişliği, stoma büyüklüğü ve stoma indeksi değişkenleri belirlenmiştir. Stoma yoğunluğunu belirlemek için, yaprakların alt yüzüne mono nitro selüloz maddesi sürülmüş ve kurumalarını takiben alt epidermis bu madde ile birlikte sıyrılmış, lamel üzerine yerleştirilerek 40 büyütme objektif ve 10 büyütme oküler mikrometre kullanılarak $200 \times 200 \mu\text{m}^2$ 'deki stoma sayıları kaydedilmiştir (Usman vd., 2008). Stoma yoğunluğu her bitkiye ait 2'şer yaprakta 2 okuma şeklinde sayılmıştır. Aynı preparatlarda stoma uzunluğu ve genişliği de ölçülmüş elde edilen sonuçlar Nikon NIS-Elements v4.0 yazılımıyla kaydedilmiştir. Stoma büyüklüğü (stoma uzunluğu x genişliği) ve stoma indeksi (uzunluk/genişlik) ise kaydedilen veriler kullanılarak hesaplanmıştır.



Şekil 1. Triploid (3x) standart referans olarak kullanılan Bearss laymına ait yaprak hücresi çekirdek DNA içeriği

3. Bulgular ve Tartışma

3.1. Canlılık oranı (%) ve ploidi düzeyi

Deneme sonunda yapılan varyans analizi sonuçları incelendiğinde W. Murcott mandarininin canlılık oranı üzerine kolhisin uygulama sürelerinin ($p < 0.01$) ve dozlarının ($p < 0.01$) istatistiksel olarak önemli etkisi saptanmıştır. W. Murcott mandarininin kalemlerinde canlılık oranları dozlara göre farklılık göstermiş ve en yüksek canlılık oranının %0.0 kolhisin uygulamasında (%70.83), en düşük canlılık oranı ise %0.8 uygulamasında (%1.11) olduğu belirlenmiştir. Uygulama süresi bakımından ise % canlılık oranları 4, 6 ve 8 saat sürelerinde sırasıyla %43.26, 29.67 ve 17.48 olarak bulunmuştur. Uygulama sonucunda W. Murcott mandarininde 4 ve 8 saat süreyle %0.8 kolhisin dozunda süren göz olmamış bu dozun 6 saatinde ise canlı bitki oranı %3.33 olarak belirlenmiştir (Çizelge 1). Çalışmada farklı kolhisin süre ve uygulama dozlarının Klemantin 22D mandarini canlılık oranı üzerine %99 güvenle istatistiksel olarak önemli etkileri olduğu belirlenmiştir. Klemantin 22D mandarinine ait canlılık oranı dozlar bakımından incelendiğinde ortalama canlılık, %0.0 dozunda %66.67 olurken, %0.8 dozunda hiçbir aşı gözü sürmemiş ve canlılık oranı %0.0 olarak bulunmuştur. Uygulama süresi bakımından ise ortalama % canlılık oranları 4, 6 ve 8 saat sonunda sırasıyla %31.33, 22.67 ve 16.67 olarak belirlenmiştir (Çizelge 2).

Moro kan portakalının aşı kalemlerine kolhisin uygulaması sonucunda genel olarak mandarin çeşitlerine oranla daha fazla bitki elde edilmiş ve dolayısıyla canlılık oranları hem uygulama hem süre faktörleri bakımından W. Murcott ve Klemantin 22D mandarinlerinden daha yüksek bulunmuştur (Çizelge 3).

Çizelge 1. Kolhisin uygulaması sonucu W. Murcott mandarini canlılık oranı (%)

Kolhisin dozu (%)	Süre			Ortalama **
	4 saat	6 saat	8 saat	
0.0	87.50	75.00	50.00	70.83 (58.13) a
0.2	56.67	46.67	20.00	41.11 (39.52) b
0.4	40.00	13.33	10.71	21.35 (26.60) c
0.6	32.14	10.00	6.67	16.27 (22.66) c
0.8	0.00	3.33	0.00	1.11 (3.51) d
Ortalama **	43.26 a (38.40)	29.67 ab (30.71)	17.48 b (21.14)	

**, 0.01 düzeyinde önemli. LSD_{0.05}(süre), 9.724 LSD_{0.05}(doz), 12.552 Parantez içindeki değerler açılı transformasyonu sonrası elde edilmiş değerlerdir.

Çizelge 2. Kolhisin uygulaması sonucu Klemantin 22D mandarini canlılık oranı (%)

Kolhisin dozu (%)	Süre			Ortalama**
	4 saat	6 saat	8 saat	
0.0	83.33	66.67	50.00	66.67 (55.24) a
0.2	26.67	23.33	23.33	24.44 (29.64) b
0.4	26.67	13.33	6.67	15.56 (22.50) bc
0.6	20.00	10.00	3.33	11.11 (18.52) c
0.8	0.00	0.00	0.00	0.00 (3.55) d
Ortalama**	31.33 a (30.95)	22.67 ab (24.71)	16.67 b (19.88)	

** , 0.01 düzeyinde önemli. LSD_{0.05}(süre), 6.830 LSD_{0.05}(doz), 8.818
Parantez içindeki değerler açış transformasyonu sonrası elde edilmiş değerlerdir.

Çizelge 3. Kolhisin uygulaması sonucu Moro kan portakalı canlılık oranı (%)

Kolhisin dozu (%)	Süre			Ortalama*
	4 saat	6 saat	8 saat	
0.0	75.00	100.00	50.00	75.00 (65.03) a
0.2	66.67	36.67	40.00	47.78 (43.77) ab
0.4	53.33	30.00	20.00	34.44 (35.58) b
0.6	36.67	28.57	20.00	28.41 (32.06) b
0.8	20.00	13.33	17.86	17.06 (24.34) b
Ortalama*	50.33 a (45.12)	41.71 a (42.86)	29.57 b (32.49)	

* , 0.05 düzeyinde önemli. LSD_{0.05}(süre), 9.371 LSD_{0.05}(doz), 21.748
Parantez içindeki değerler açış transformasyonu sonrası elde edilmiş değerlerdir.

Ayrıca farklı uygulama sürelerinin ($p < 0.05$) ve dozlarının ($p < 0.05$) canlılık oranı üzerine etkileri istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Kolhisin dozu bakımından % canlılık oranları incelendiğinde %0.0 dozunda ortalama %75.00 canlılık, %0.8 dozunda ise ortalama %17.06 canlılık oranı belirlenmiştir. Moro kan portakalının aşış gözü canlılık oranları uygulama süreleri arttıkça azalmış, 4, 6 ve 8 saat sonunda sırasıyla %50.33, 41.71 ve 29.57 olarak hesaplanmıştır (Çizelge 3).

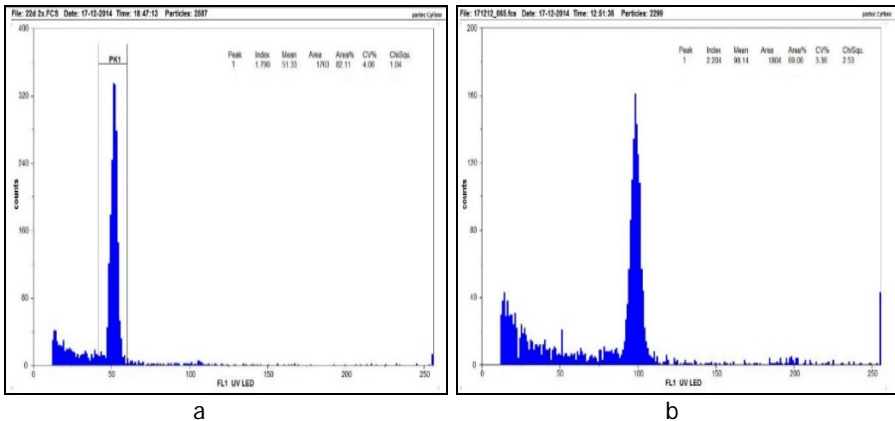
Deneme sonunda farklı süre ve dozlarda yapılan kolhisin uygulaması sonucunda W. Murcott, Klemantin 22D ve Moro çeşitlerinden toplam 1350 aşış gözünden sırasıyla 80, 58 ve 123 olmak üzere 261 adet fidan elde edilmiş ve ortalama canlılık oranı %19.33 olarak belirlenmiştir. Wakana vd. (2005) Kizu ve Hanayu çeşitlerine %0.05, %0.1, %0.2, %0.4 ve %0.8 kolhisin dozlarını 6 saat; Yuzu çeşidine %0.05, %0.1, %0.2 ve %0.4 dozlarını ise 4,

8, 12 ve 16 saat uygulayarak tetraploid çeşit elde etmeyi hedeflemişlerdir. Çalışma sonucunda uygulama yapılan toplam 240 sürgünden 83 tanesinin sürdüğü ve canlılık oranının %34.58 olduğunu bildirilmiştir. Aleza vd. (2009), sürgün ucu mikro aşılama yöntemi kullanarak kolhisin uygulamasında Clemenules mandarininde canlılık oranını %37.50 olarak saptamışlardır.

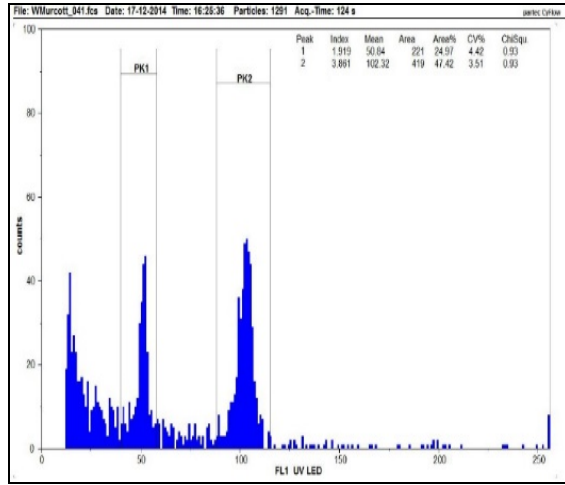
Elde edilen 261 adet bitkinin ploidi seviyesini belirlemek amacıyla flow sitometri cihazında okuma yapılmıştır. Her çeşidin kontrol uygulamasına ait diploid yaprak örnekleri ve referans bitkilerden alınan örneklerde de okumalar yapılarak 365 nm dalga boyundaki pik noktaları belirlenmiştir.

Ploidi analizi sonuçlarına göre, Klemantin 22D mandarininden bir adet tetraploid (4x) bitki elde edilmiştir. Bu örneğe ve kolhisin uygulanmamış Klemantin 22D yaprak örneğine ait flow sitometri ile belirlenen yaprak hücresi çekirdek DNA içerikleri Şekil 2'de görülmektedir. Klemantin 22D mandarinine ait tetraploid birey, çeşidin aşı kaleminin 6 saat süreyle %0.4 dozunda kolhisin uygulanması sonucunda elde edilmiştir.

Moro kan portakalı çeşidinin aşı kalemleri kolhisin uygulaması sonucunda toplam üç adet bitkide mixoploid yapıda (2x+4x) olan birey belirlenmiştir. Bu sitokimerik yapıda olan üç bitki, Moro çeşidinin aşı kalemine 6 saat süreyle %0.6, 8 saat süreyle %0.2 ve %0.8 uygulaması sonucunda elde edilmiştir. W. Murcott mandarin çeşidinde ise bir adet mixoploid yapıda olan (2x+4x) bitki 6 saat süreyle %0.4 dozunda kolhisin uygulaması sonucunda elde edilmiştir (Şekil 3).



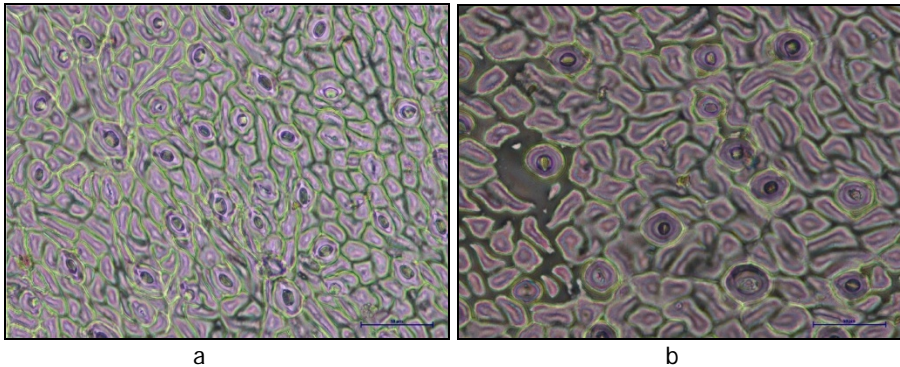
Şekil 2. Klemantin 22D mandarininin flow sitometri ile belirlenen yaprak hücresi çekirdek DNA içerikleri (a: 2x ploidi seviyesinde Klemantin 22D mandarinini, b: 4x ploidi seviyesinde Klemantin 22D mandarinine ait yaprak örnekleri)



Şekil 3. 2x+4x mixoploid W. Murcott mandarinin yaprak hücresi çekirdek DNA içeriği

3.2. Stomatal özellikler

Klemantin 22D mandarininin diploid ploidi seviyesinde ve kolhisin uygulaması yoluyla elde edilmiş tetraploid ploidi seviyesindeki bitkilerin yaprak stoma özellikleri incelendiğinde mm^2 'ye düşen stoma sayısının diploid bitkide tetraploid bitkiye oranla daha yoğun olduğu görülmektedir (Şekil 4).



Şekil 4. Klemantin 22D mandarininin 2x (a) ve 4x (b) ploidi seviyelerine sahip bitkilere ait yaprak stoma yoğunluk ve büyüklüğü

Stoma büyüklükleri karşılaştırıldığında tetraploid bitkinin yaprak stoma iriliğinin diploid bitkiye kıyasla daha büyük olduğu gözlemlenmiştir (Çizelge 4). Padoan vd. (2013), Klemantin mandarininde, triploid bitkilerin diploid bitkilere kıyasla daha uzun ve geniş stoma büyüklüğüne sahip olduğunu bildirmişlerdir. Benzer şekilde Sharif vd. (2013) bazı turunçgil anaçlarında in vitro ovül sırasında kolhisin kültürü uygulamaları yaparak elde ettikleri tetraploid bireylerin stoma büyüklüklerinin diploid olanlardan daha fazla olduğunu belirtmişlerdir. W. Murcott mandarininde kolhisin uygulaması sonucu elde edilen mixoploid bitkinin yaprak örneklerinde yapılan gözlemlerde stoma yoğunluğunun diploid örneğe kıyasla daha az olduğu belirlenmiştir. Ancak Klemantin 22D mandarininden elde edilen tetraploid bireyin stoma sayısı ile karşılaştırıldığında stoma yoğunluğunun mixoploid ($2x+4x$) W. Murcott mandarininde daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Benzer şekilde stoma büyüklüğü mixloid bitkide diploid bitkiye göre daha yüksek bulunmuştur (Çizelge 5). Moro kan portakalının aşı kalemlerine kolhisin uygulaması sonucu elde edilen üç mixoploid bitkinin stomatal özelliklerine ait değerlerin ortalamaları alınarak Çizelge 6'da sunulmuştur. 2n ploid seviyesindeki Moro kan portakalının yaprak birim alanına düşen stoma yoğunluğu ve stoma büyüklüğü, Klemantin 22D ve W. Murcott mandarin çeşitlerine benzerlik göstermiştir.

Çizelge 4. Diploid ($2x$) ve tetraploid ($4x$) kromozom sayısına sahip Klemantin 22D mandarininde yaprak stoma özellikleri

Stomal özellikler	2x	4x
Stoma yoğunluğu (adet mm^{-2})	475.00	285.00
Stoma uzunluğu (μm)	22.22	27.52
Stoma genişliği (μm)	13.07	18.50
Stoma büyüklüğü (uzunluk x genişlik, μm^2)	290.45	509.14
Stoma indeksi (uzunluk/genişlik)	1.70	1.49

2x: 6 saat süreyle %0.0 dozunda kolhisin, 4x: 6 saat süreyle %0.4 dozunda kolhisin uygulaması sonucunda elde edilmiş bitkiye ait yaprak örnekleri

Çizelge 5. Diploid ($2x$) ve mixoploid ($2x+4x$) kromozom sayısına sahip W. Murcott mandarininde yaprak stoma özellikleri

Stomal özellikler	2x	$2x+4x$
Stoma yoğunluğu (adet mm^{-2})	492.00	365.00
Stoma uzunluğu (μm)	18.73	21.12
Stoma genişliği (μm)	12.02	14.42
Stoma büyüklüğü (uzunluk x genişlik, μm^2)	225.13	304.55
Stoma indeksi (uzunluk/genişlik)	1.55	1.46

2x: 6 saat süreyle %0.0 dozunda kolhisin, $2x+4x$: 6 saat süreyle %0.4 dozunda kolhisin uygulaması sonucunda elde edilmiş bitkiye ait yaprak örnekleri

Çizelge 6. Diploid (2x) ve mixoploid (2x+4x) kromozom sayısına sahip Moro kan portakalında yaprak stoma özellikleri

Stomal özellikler	2x	2x+4x
Stoma yoğunluğu (adet mm ⁻²)	460.00	340.00
Stoma uzunluğu (µm)	19.32	21.43
Stoma genişliği (µm)	14.02	16.89
Stoma büyüklüğü (uzunluk x genişlik, µm ²)	270.87	361.95
Stoma indeksi (uzunluk/genişlik)	1.37	1.29

2x: 6 saat süreyle %0.0 dozunda kolhisin, 2x+4x: farklı süre ve dozlarda kolhisin uygulamalarından elde edilmiş üç mixoploid bitkinin yaprak örneklerine ait ortalamalar

Mixoploid bitkilerde diploid bitkilere kıyasla ortalama yaprak stoma yoğunluğunun daha düşük ve stoma büyüklüğünün daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir (Çizelge 6). Yaprak birim alanına düşen stoma yoğunluğu, stoma bekçi hücrelerinin uzunluğu ve genişliği birçok bitki türünde ploidi seviyesini tespit etmek amacıyla morfolojik marker olarak kullanılmaktadır. Genel olarak yaprak stoma bekçi hücrelerinin büyüklüğü artan ploidi seviyesi ile birlikte artarken yaprak birim alanına düşen stoma yoğunluğu azalmaktadır (Ye vd., 2010). Bu çalışmada, kolhisin uygulaması sonucunda ploidi seviyesi farklılık gösteren bitkiler diploid ploidi seviyesine sahip olan bitkilerle karşılaştırıldığında elde edilen bulgu bu duruma paralellik göstermiştir.

4. Sonuç

Turunçgil genotiplerinde farklı *in vivo* ve *in vitro* yöntemlerle tetraploid bitki elde edilmesini hedefleyen çalışmalar, son yıllarda özellikle çekirdeksiz yeni turunçgil çeşitlerinin geliştirilmesine yönelik planlanan ıslah programları açısından büyük önem taşımaktadır. Çeşitli ülkelerde çekirdeksiz çeşit ıslahı hedefli programlarda ebeveyn olarak kullanmak amacıyla farklı yöntemlerle değişik turunçgil türlerinde tetraploid bitkiler elde edilmiştir. Ülkemizde ise mevcut turunçgil gen kaynağı bahçelerinde ebeveyn olarak kullanılabilir nitelikte tetraploid bireyler bulunmamaktadır. Turunçgillerde ekonomik olarak önem taşıyan türlerde doğal olarak bulunmayan tetraploid bitkilerin yapay yöntemlerle elde edilmesi ve bu bitkilerin ebeveyn olarak kullanılması geniş ölçekli triploid hibrid popülasyonlarının elde edilmesine olanak tanımaktadır. Bu çalışmada ıslah programlarında önem taşıyan 3 ticari turunçgil genotipine ait aşı gözlerine farklı süre ve dozlarda kolhisin uygulayarak tetraploid bireyler elde edilmeye çalışılmıştır. Bu yöntemin 1 350 aşı gözüne

uygulanması sonucu 261 adet bitki elde edilmiştir. Klemantin 22D genotipinde aşı kalemine 6 saat süreyle %0.4 dozunda kolhisin uygulanmasıyla bir adet stabil tetraploid bitki elde edilirken, W. Murcott mandarini ve Moro kan portakalından toplam dört adet mixoploid bitki elde edilmiştir. İlerideki çalışmalarda sitokimerik yaprağa sahip bitkilerden, analizi yapılan yaprakları oluşturan gözler ana bitkiden alınıp tekrar C-35 sitranjı anacı üzerine aşılacak ve gelişen sürgünlerden alınan yapraklarda tekrar flow sitometri yoluyla ploidi tespiti yapılarak bu bitkilerin ploidi düzeyleri kontrol edilecektir.

Teşekkür

Bu çalışma Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi FDK-2015-3290 No'lu proje ile desteklenmiştir. Yazarlar Niğde Üniversitesi Tarım Bilimleri ve Teknolojileri Fakültesi Tarımsal Genetik Mühendisliği Bölüm Başkanlığına ve Prof. Dr. Sedat SERÇE'ye ploidi analizlerindeki desteklerinden dolayı teşekkür etmektedir.

Kaynaklar

- Aleza, P., Juárez, J., Ollitrault, P., & Navarro, L. (2009). Production of tetraploid plants of nonapomictic citrus genotypes. *Plant Cell Reports*, 28(12):1837-1846.
- Barrett, H.C. (1974). Colchicine-induced polyploidy in citrus. *Botanical Gazette*, 135(1):29-41.
- Ellialtıoğlu, Ş., Sarı, N., & Abak, K. (2000). Haploid Bitki Üretimi. In: Babaoğlu, M., Özcan, S., Gürel, E. (Eds.), Bitki Biyoteknolojisi, Cilt 1:137-189, Konya.
- Esen, A., & Soost, R.K. (1971). Unexpected triploids in Citrus; their origin, identification and possible use. *Journal of Heredity*, 62(6):329-333.
- Esen, A., & Soost, R.K. (1977). Relation of unexpected polyploids to diploid megagametophytes and embryo: endosperm ploidy ratio in Citrus. In O. Carpena (ed), Proceedings of Congresso Mundial de Citricultura. 1973, *International Society of Citriculture*, 2:53-63.
- FAO, (2016). Agricultural Statistical Database. <http://www.faostat.org>. Erişim tarihi: 19 Haziran 2016.
- Geraci, G., Esen, A., & Soost, R.K. (1975). Triploid progenies from 2x x 2x crosses of Citrus cultivars. *Journal of Heredity*, 66:177-178.
- Gmitter, Jr.F.G., & Ling, X. (1991). Embryogenesis in vitro and nonchimeric tetraploid plant recovery from undeveloped citrus ovules treated with colchicine. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 116(2):317-321.
- Gmitter, Jr.F.G., Ling, X., Cai, C., & Grosser, J.W. (1991). Colchicine-induced polyploidy in citrus embryogenic cultures, somatic embryos, and regenerated plantlets. *Plant Science*, 74(1):135-141.
- İncesu, M. (2004). Türkiye'de selekte edilen bazı satsuma ve klemantin mandarin tiplerinin verim ve meyve özelliklerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana.

- Luro, F., Maddy, F., Jacquemond, C., Froelicher, Y., Morillon, R., Rist, D., & Ollitrault, P. (2004). Identification and evaluation of diplogyny in clementine (*Citrus clementina*) for use in breeding. In *XI Eucarpia Symposium on Fruit Breeding and Genetics. Acta Horticultureae*, 663:841-847.
- Oiyama, L., Okudai, N., & Takahara, T. (1981). Ploidy levels of seedlings obtained from 2x × 4x crosses in citrus. *Proceedings International Society of Citriculture*, 1:32-34.
- Ollitrault, P., Dambier, D., Luro, F., & Froelicher, Y. (2008). Ploidy Manipulation for Breeding Seedless Triploid Citrus: In *Plant Breeding Reviews*, Volume 30 (Ed J. Janick), John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA.
- Padoan, D., Mossad, A., Chiancone, B., Germana, M.A., & Khan, P.S.V. (2013). Ploidy levels in citrus clementine affects leaf morphology, stomatal density and water content. *Theoretical and Experimental Plant Physiology*, 25(4):283-290.
- Saunt, J. (2000). *Citrus Varieties of The World*. Sinclair International Limited, 126 p., Norwich, England.
- Sharif, N., Jaskani, M.J., & Memon, N. (2013). Responses of citrus rootstock ovules to colchicine applications in vitro. *Journal of Agricultural Technology*, 9(1):201-209.
- Starrantino, A., & Recupero, G.R. (1981). Citrus hybrids obtained from 2× female × 4× males. *Proceedings International Society of Citriculture*, 1:31-32.
- Tachikawa, T., Tanaka, Y., & Hara, S. (1961). Investigations on the breeding of citrus trees. 1. Study on the breeding of triploid citrus varieties. *Bulletin of Shizuoka Prefectural Citrus Experiment Station*, 4:33-44.
- Tuna, M. (2014). 2. Flow Sitometri ve Tarımsal Araştırmalarda Kullanımı Çalıştayı. Namık Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, 16-17 Ocak 2014, Tekirdağ.
- Usman, M., Fatima, B., Gillani, K.A., Khan, M.S., & Khan, M.M. (2008). Exploitation of potential target tissues to develop polyploids in citrus. *Pakistan Journal of Botany*, 40(4):1755-1766.
- Wakana, A., Hanada, N., Park, S., Fukudome, I., & Kajiwara, K. (2005). Production of tetraploid forms of acid citrus cultivars by top grafting of shoots with sprouting axially buds treated with colchicine. *Journal of the Faculty of Agriculture, Kyushu University*, 50(1):93-102.
- Yahata, M., Kurogi, H., Kunitake, H., Nagano, K., Yabuya, T., Yamashita, K., & Komatsu, H. (2005). Evaluation of reproductive functions in a haploid pummelo by crossing with several diploid citrus cultivars. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 74(4):281-288.
- Ye, Y.M., Tong, J., Shi, X.P., Yuan, W., & Li, G.R. (2010). Morphological and cytological studies of diploid and colchicine-induced tetraploid lines of crape myrtle (*Lagerstroemia indica* L.). *Scientia Horticulturae*, 124(1):95-101.
- Yeşiloğlu, T., Çimen, B., İncesu, M., Yılmaz, B., Aka-Kaçar, Y., & Şimşek, Ö. (2013). Turunçgil sektörünün gereksinim duyduğu yeni çeşitlerin geliştirilmesi. *Tarım Bilimleri Araştırma Dergisi*, 6(2):127-132.