

Phaseolus vulgaris L.'de
OTOPOLİPLOİDİNİN UYARTILMASI

Esra EŞ

Yüksek Lisans Tezi
Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Serdar POLAT
2011

T.C.

NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

***Phaseolus vulgaris* L.'de OTOPOLİPLOİDİNİN UYARTILMASI**

Esra EŞ

BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN: Yrd. Doç. Dr. Serdar POLAT

TEKİRDAĞ-2011

Her hakkı saklıdır

Yrd. Doç. Dr. Serdar POLAT danışmanlığında, **Esra EŞ** tarafından hazırlanan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından. Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı'nda Yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Juri Başkanı : Prof. Dr. İsmet BAŞER

İmza :

Üye : Yrd. Doç. Dr. Serdar POLAT (**Danışman**)

İmza :

Üye : Yrd. Doç. Dr. Murat DEVECİ

İmza :

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu adına

Doç. Dr. Fatih KONUKCU

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Phaseolus vulgaris L'de OTOPOLİPLOİDİNİN UYARTILMASI

Esra EŞ

Namık Kemal Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Serdar POLAT

Bu çalışma, fasulye bitkisinde otopoliploidinin uyartılmasına yönelik planlanmıştır. Çalışmada yerel fasulye populasyonu kullanılmış, *In vivo* uygulamalarla poliploidi oluşumu teşvik edilmeye çalışılmıştır. Bu yöntemde iki farklı depolimerizasyon ajanı kullanılarak, başlangıçta letal dozlar araştırılmıştır. Denemeler 2010 ve 2011 yıllarında planlanmış, 2010 yılı denemesinde trifluralin için, litresinde 480 g trifluralin etken maddeli Fer-Tref 48 EC herbisistinin, 3 farklı dozu %0, %5 ve %10, kotiledon aşamasında bitkinin büyüme ucuna uygulanmış, kolhisin için 3 farklı doz %0, %0.1 ve %0.05 hazırlanmış, yine kotiledon aşamasında bitkinin büyüme ucuna uygulama yapılmıştır. 2011 yılındaki denemelerde ise, trifluralin için, litresinde 480 g trifluralin etken maddeli Fer-Tref 48 EC herbisistinin %1 ve %5 dozları, kolhisinin %0.05 ve %0.1 dozları 3 ve 6 saatlik sürelerde bitkinin apikal meristemlerine uygulanmıştır.

Araştırma sonuçlarına göre Tokat yöresine ait yerel kırkgünlük fasulye populasyonunda poliploid bitki elde edilmesine yönelik en başarılı uygulamanın, 2011 yılındaki denemede kotiledon aşamasındaki bitkilerin apikal meristemlerine uygulama yapmak üzere %0.1 kolhisin konsantrasyonu ile 3 ve 6 saatlik uygulama süresinde gerçekleştiği kaydedilmiştir. Denemelerde aksilar tomurcuklara yapılan uygulamalar sonuç vermemiştir. Trifluralin uygulamaları sonrasında elde edilen canlı bitki oranları kolhisine kıyasla daha az olmuştur. Elde edilen bitkilerin tarla koşullarına adaptasyonları zor olmuş, birçoğu bu ortamda hayatta kalmayı başaramamıştır.

Uygulama sonucu elde edilen bitkilerin ploidi durumlarını belirlemede morfolojik ve sitolojik gözlemlerden de yararlanılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Fasulye, poliploidi, kolhisin, trifluralin, morfolojik gözlemler

2011, 48 Sayfa

ABSTRACT

Mcs. Thesis

STIMULATION OF AUTOPOLYPLOID in *Phaseolus vulgaris* . L.

Esra EŞ

Namık Kemal University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Horticulture

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Serdar POLAT

This study has been planned to stimulate autopolyploid in bean plant. For this study, local bean population has been used and polyploidy formation has been triggered via *In vivo* practices. This method has been initiated by the research of lethal doses by the use of two different depolymerisation agents. Assays were planned for 2010 and 2011; in 2010-assay, for trifluralin, three doses of Fer Tref 48 EC herbisist with 480 g trifluralin active substance, as 0%, 5%and 10%were applied at the growing tip of the plant at cotyledon stage; whereas for colchicine, three different doses as 0%, 0.1%and 0.05%were applied at the growing tip of the plant at cotyledon stage. In assays of 2011, for trifluralin, 1%and 5%doses of Fer Tref 48 EC herbisist with 480 g trifluralin active substance and 0.05%and 1%doses of colchicine were applied at the apical meristem of the plant within 3 and 6-hour durations.

The results have indicated that the most successful application to obtain polyploidy plant from the population of local “kırkgünlük” bean originated from Tokat has been the assay of 2011 with the application of 0.1%colchicine concentration on the apical meristems within 3 and 6 hours at cotyledon stage. The assays have shown that applications to the axillary buds had no results. Compared to colchicine, trifluralin applications have resulted in fewer proportions of living plants. The adaptation of the obtained plants to the field environment has been difficult and many of them have been unable to survive on these conditions. In order to determine ploidy states of plants after those applications, morphological and cytological observations have also been carried out.

Keywords: Bean, polyploidy, colchicine, trifluralin, morphological observations

2011, 48 pages

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın planlanmasından, yürütülmesine kadar her aşamada yanımda olan, umudumu yitirdiğim anlarda beni cesaretlendiren, tanıdığım ender bilim insanlarından biri olarak gördüğüm sayın hocam Doç. Dr. Uğur BAL, çalışmalarım sırasında bana bilimsel disiplini ve analitik düşünmeyi kazandırmaya çalışmasının yanı sıra hayattaki tecrübelerini benimle paylaşmaktan çekinmediği için kendisine sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım. Çok değerli hocamın hayallerimi yemyeşil bir bahar dalı gibi hep canlı tutmamda büyük rolü oldu.

Tez çalışmalarım sırasında danışmanım olarak desteğini ve ilgisini benden esirgemeyen Sayın hocam, Yrd. Doç. Dr. Serdar POLAT'a,

Her zaman odasının kapısı gibi kalbinin kapılarını da biz öğrencilerine açık tutan, Bölüm Başkanımız Sayın Prof. Dr. Servet VARİŞ'a teşekkürü bir borç bilirim. Yine yüksek lisansa başlamamda desteğini benden esirgemeyen, Sayın Prof. Dr. Salih ÇELİK'e,

Öğrenimim sırasında, bilimsel eleştirileri ile çalışmamı olumlu yönde etkileyen, her zaman destekçi yaklaşımıyla beni rahatlatan Yrd. Doç. Dr. Süreyya ALTINTAŞ'a, yardımlarından dolayı Yrd. Doç. Dr. İlknur KORKUTAL'a, desteği ve güler yüzü için, Yrd. Doç. Dr. Murat DEVECİ'ye, ve Bahçe Bitkileri Bölümünün çok değerli hocalarına teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Her türlü özverisi ve güveni için Sayın hocam, Prof. Dr. Nuray ÖZER'e, Prof. Dr. İsmet BAŞER'e, Doç. Dr. Metin TUNA'ya, Araş. Gör. Tolga AYSAL'a, Bitki Koruma Bölümüne, Araş. Gör. Hüseyin SARI'ya, Araş. Gör. Eyüp Erdem TEYKİN'e,

Ayrıca idari görevimin yanında bu çalışmamı yürütmem konusunda yardımlarını esirgemeyen, Namık Kemal Üniversitesinin emektar İdari personellerine, çalışmalarımda bir olsun yanımdan ayrılmayan, neredeyse benimle birlikte yüksek lisans yapan, olumlu yaklaşımı ve sabrıyla tezimi hazırlamada yanımda olan, desteği sayfalara sığdırılamayacak kadar büyük olan Sevgili Ahmet ÇETİNER'e,

Son olarak beni bu hayata hazırlayan, seçimlerimde bana hep saygı duyan, ve ihtiyaç duyduğumda hep yanı başımda olduklarını hissettiğim Sevgili annem ve babama her türlü maddi ve manevi destekleri için çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	7
3. MATERYAL ve YÖNTEM	14
3.1. Materyal.....	14
3.2. Yöntem	15
3.2.1. Kolhisin çözeltisinde tohumların bekletilmesi	15
3.2.2. Kotiledon aşamasındaki bitkilere kolhisin uygulaması	16
3.2.3. Aksilar tomurcuklara kolhisin uygulaması.....	19
3.2.4. Kotiledon aşamasındaki bitkilere trifluralin uygulaması	19
3.2.5. Aksilar tomurcuklara trifluralin uygulaması	21
3.2.6. Seradaki bitkilerin tarlaya aktarılması.....	21
3.2.7. Morfolojik gözlemler	22
3.2.8. Stoma incelemeleri.....	23
3.2.9. Polen canlılığı (%).....	25
3.2.10. <i>In vitro</i> polen çimlenme oranı (%)	26
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	27
4.1. Kotiledon Aşamasındaki Bitkilere Kolhisin Uygulaması.....	27
4.2. Aksilar Tomurcuklara Kolhisin Uygulaması	29
4.3. Kotiledon Aşamasındaki Bitkilere Trifluralin Uygulaması	29
4.4. Aksilar Tomurcuklara Trifluralin Uygulaması.....	31
4.5. Morfolojik Gözlemler	32
4.5.1. Canlı bitki oranı (%).....	32
4.5.2. Bitki boyu (cm)	32
4.5.3. Yaprak eni, boyu (cm).....	33
4.5.6. Yapraklarda tüylülük, kalınlaşma, buruşma durumu (var/yok).....	33
4.5.7. Çiçeklenmeye gün sayısı (gün)	35

4.5.8. Meyve eni, boyu (cm)	36
4.5.9. Meyvedeki tohum sayısı (adet)	37
4.6. Stoma İncelemeleri.....	37
4.6.1 Stoma eni boyu (br).....	37
4.6.2 Birim alandaki stoma sayısı (adet)	38
4.6.3. Stoma (bekçi) hücrelerindeki kloroplast sayısı (adet).....	39
4.7. Polen Canlılığı (%).....	39
4.8. <i>In vitro</i> Polen Çimlenme Oranı (%)	40
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	44
6. KAYNAKLAR	45
ÖZGEÇMİŞ.....	48

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Otopoliploid bitki elde edilmesi	3
Şekil 3.1. Yerel kırkgünlük fasulye tohumları ve bitkisi	15
Şekil 3.2. Tohumların kolhisin çözeltisinde bekletilmesi.	16
Şekil 3.3. Kotiledon aşamasındaki bitkilerin apikal meristemlerine uygulama.....	17
Şekil 3.4 Çimlendirilen tohumlara erken kotiledon aşamasında kolhisin uygulaması	18
Şekil 3.5 Kotiledon aşamasında ve ilk gerçek yaprak aşamasındaki bitkiler	20
Şekil 3.6. Trifluralin uygulaması öncesi bitkilerin ve büyüme ucunun durumu.....	20
Şekil 3.7. Trifluralin uygulaması.....	21
Şekil 3.8. Bitkilerin seradan tarla koşullarına aktarıldıktan sonraki görünümleri	22
Şekil 3.9. 40X10 objektif ve oküler ile stoma hücrelerinin görünümü	25
Şekil 3.10. Kontrol bitkilerine ait, asetocarmin ile farklı renklerde boyanmış polenler	25
Şekil 3.11. Asılı damlada <i>In vitro</i> polen çimlendirme.	26
Şekil 4.1. Aksilar tomurcuklara kolhisin uygulaması sonrası.....	29
Şekil 4.2. Kotiledon aşamasındaki bitkilere trifluralin uygulaması.....	31
Şekil 4.3. %0.1 kolhisin dozunun uygulandığı bitki ve kontrol bitkisi.....	34
Şekil 4.4. %0.1 kolhisinin 6 saat süre ile uygulandığı bitki ile kontrol bitkisinin çiçekleri.....	35
Şekil 4.5. Fasulye bitkisinde farklı kolhisin ve trifluralin dozlarının uygulanmasından sonra elde edilen meyvelerin görünümü.....	36
Şekil 4.6. Stoma (Bekçi) hücrelerinin 10X40 oküler ve objektiften görünümü	38
Şekil 4.7. Asetocarmin ile polen canlılıkları	42
Şekil 4.8. Değişik uygulamalara ait polen görünümleri.....	42
Şekil 4.9. Kontrol ve %0.1 kolhisin uygulanan bitkiye ait polenlerin çimlenme durumları.....	42
Şekil 4.10. Fasulye bitkilerine ait yaprak polen ve stoma hücrelerinin görünümü.	43

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Türkiye’de 2010 yılı baklagil sebzeleri üretim miktarı.....	1
Çizelge 1.2. Türkiye’de 2010 yılı bölgeler göre taze fasulye üretim miktarları	1
Çizelge 4.1. 2010 yılında apikal meristeme kolhisin uygulamasından sonra hayatta kalan bitki sayıları.	28
Çizelge 4.2. 2011 yılı denemesindeki bitki sayıları ile ilgili veriler	28
Çizelge 4.3. 2011 yılında apikal meristeme trifluralin uygulamasından 10 gün sonra hayatta kalan bitki sayıları.	30
Çizelge 4.4. 2010 yılındaki denemedeki bitki sayılarına ait veriler.....	31
Çizelge 4.5. Apikal meristemlere kolhisin uygulaması sonucu bazı özelliklere ait elde edilen ortalama değerler.....	33
Çizelge 4.6. Kolhisin dozlarının uygulanmasından sonra yapılan stoma incelemeleri sonucu elde edilen veriler.	39
Çizelge 4.7. Asetocarmin ile boyama ve <i>In vitro</i> polen çimlendirme sonucu elde edilen polen canlılık değerleri.....	41

1. GİRİŞ

Türkiye dünya fasulye üretiminde 2009 yılı verilerine göre Çin ve Endonezya'dan sonra üçüncü sırada yer almıştır (**Anonim 2009**). Fasulyenin anavatanı kimi araştırmacılara göre, Güney Amerika kabul edilmekte ve fasulyenin, 16.yy'dan itibaren Avrupa'ya getirilerek, buradan yayılım gösterdiği söylenmektedir (**Bayraktar 1970**). Bazı kaynaklarda ise fasulyenin geçmişinin 7000 yıl önceye dayandığı ve Peruda İnkalar tarafından yetiştirildiği bilgisi yer almaktadır. Ana vatanının Meksika'nın güneyinden başlayarak, Guatelema, Colombia ve Peruyu içine alan Orta ve Güney Amerika ülkeleri olduğu sanılmaktadır. Amerikanın keşfinden sonra Colombus tarafından Avrupaya getirilen fasulyenin ülkemizdeki geçmişinin ise yaklaşık 250- 300 yıl önceye dayandığı söylenmektedir (**Şalk ve ark. 2008**).

Çizelge 1.1. Türkiye'de 2010 yılı baklagil sebzeleri üretim miktarı (**Anonim 2010**)

Baklagil Sebzeleri	Üretim (ton)
Fasulye (Taze)	587.967
Bezelye	90.191
Barbunya Fasulye (Taze)	70.614
Bakla (Taze)	41.929
Börülce (Taze)	16.591

Çizelge 1.2. Türkiye'de 2010 yılı bölgelere göre taze fasulye üretimi (ton) (**Anonim 2010**)

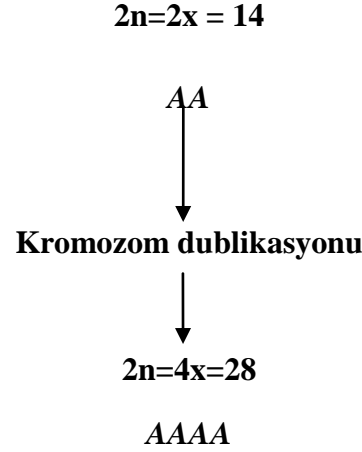
Bölgeler	Üretim (ton)
Kuzeydoğu Anadolu	5.912
Ortadoğu Anadolu	11.196
Güneydoğu Anadolu	4.899
İstanbul	5.080
Batı Marmara	27.817
Ege	97.554
Doğu Marmara	69.601
Batı Anadolu	26.770
Akdeniz	125.596
Orta Anadolu	12.133
Batı Karadeniz	181.744
Doğu Karadeniz	19.665

Fasulye besin değeri oldukça yüksek bir sebzedir. Fasulyenin taze, konserve taze dane ve kuru olarak tüketildiği bilinmektedir. İnsan beslenmesinde bu denli önemli bir besin

olmasında elbette içeriğinde barındırdığı yüksek protein değerinin payı tartışmasızdır. Ayrıca içerdiği *phasol* ve *phasolin* adlı maddelerin insülin yapısında yer alması bakımından, kan şekerini düşürücü fonksiyonu da bulunmaktadır (**Şalk ve ark. 2008**). Yapılan epidemiyolojik çalışmalarda kolon kanseri, obezite, kalp damar hastalıkları gibi bazı rahatsızlıklar ile diyet lifi tüketimi arasındaki ilişki ortaya konulmuş ve diyet lifi tüketiminin önemine vurgu yapmıştır. Fasulyede bulunan yüksek lif, onun sağlık açısından önemini açıkça ortaya koymaktadır (**Ekici ve Ercoşkun 2007**).

Fasulyenin birçok çeşidi olmasına rağmen, piyasada en çok bulunan çeşitleri, *Phaseolus vulgaris* ve *Phaseolus coccineus*'tur (**Bayraktar 1970**).

Sebzecilikte yüksek verim ve kalite özellikleri taşıyan çeşitler elde etmek üzere değişik bitki ıslahı yöntemleri uygulanmaktadır. Poliploidi ıslahı olarak bilinen poliploid bitkilerin elde edilmesi ve üretimde kullanılması bu yöntemlerdendir. Poliploidi bir bireyin bütün hücrelerindeki tüm kromozom setinin kopyalarının sayısı ile ilgilidir. Kromozom takımları türlere özgüdür. Her bitkinin temel bir kromozom sayısı bulunmaktadır, bir arada bulunan temel sayıdaki kromozom genom olarak tanımlanır ve “**x**” ile temsil edilir. Fertil bir bitki normal şartlarda anneden gelen bir genom ve babadan gelen bir başka genomu taşır ve bu durum örneğin **2n=2x=14** olarak *Fragaria vesca* için gösterilebilir. Burada “**2n**” döl almaşında bitki düzeyini (bitki hayatıyetinde sporofitik safhayı) gösterirken yanında rakam bulunmadan tek başına duran “**n**” ise gamet safhasını göstermektedir. Hücrede bulunan genom sayısına göre bitkiler ploidi düzeyi açısından farklılaşırlar. Eğer hücre kromozomlarını iki adet genom çerçevesinde bulunduruyorsa diploid, üç ve üzeri sayıda genom taşıyorsa hücre poliploid olarak adlandırılır. Gametler de tek genom taşıyabileceği gibi (haploid; monoploid), iki ve daha fazla genom taşıyabilirler (diploid, poliploid). Doğal halleriyle bitkiler diploid veya poliploid durumda bulunurlar. Eşit olmayan sayıda homolog kromozom takımı içeren poliploid organizmalar nesillerini devam ettiremezler, bu açıdan nesillerini eşeyli üreme yoluyla sürdüren türlerde genellikle triploid, pentaploit vs. durumuna rastlanmaz (**Klug ve Cummings 2002**).



Şekil 1.1. Otopoliploid bitki elde edilmesi

Poliploidi değişik bakımlardan yararlıdır. Birçok poliploid bitki diploid atalarından daha yüksek vigor (yaşama gücü) gösterirken yüksek oranda heterozigoti göstererek heterozis etkisine benzer bir özelliikle karşımıza çıkabilirler. Dolayısıyla poliploidler yeni ve yararlı fenotipik varyasyon gösterebilmektedir. Poliploidlerin oluşumlarının suni olarak teşvik edilmesiyle de bu tür faydalı fenotipik varyasona ulaşılabilir. Bunun yanında poliploidler melezleme bariyerlerinin aşılmasında yararlı olabilmektedir. Örneğin diploid düzeyde melezleme yapılamamasına karşı tetraploid düzeyde bunun mümkün olup olmadığı araştırılmalıdır. Tetraploid bitkiler triploid bitkilerin elde edilmesinde bir ara form olarak gereklidir. Bunun yanında uzak akraba türlerarası melezlemelerde F_1 de ortaya çıkan kısırılık poliploid düzeyde aşılabilmektedir (**Thomas 1993, Rejeb ve Benbadis 1989**). *Brassica*'larda olduğu gibi mevcut birçok poliploid tür bu şekilde ortaya çıkmıştır (**Briggs ve Knowless 1967**). Bunun yanında şu anda iki adet genoma sahip diploid bitkilerin daha önce polipliodi düzeyine ulaştığı ancak zamanla kromozomların diploid gibi hareket etmeye başladığı da bilinmektedir (**Bowers ve ark. 2003**).

Poliploidi iki şekildedir, Otopoliploidi durumunda ilave olan her bir kromozom takımı atasal türün aynısıdır. Allopoliploidi ise, birbirine çok yakın iki türün hibridizasyonu ile ortaya çıkmaktadır (**Klug ve Cummings 2002**). Otopoliploid bitkiler doğada kendiliğinden

ortaya çıkabilmektedir. Bunun yanında oluşumları *in vivo* ve *in vitro* ortamda teşvik de edilebilmektedir. Bu bitkiler doğada başlıca iki şekilde oluşmaktadır. Bunlardan birincisinde somatik hücrelerin kromozom sayısı spontan olarak iki katına çıkmaktadır. Burada meristemde oluşan ve kromozom sayısı katlanmış hücreler ile kromozom sayısında değişiklik olmamış olan hücreler birlikte gelişebilmektedir. Bu şekilde kimerik dokular ve organlar ortaya çıkabilmekte ya da bitkide yaralanma ve kallus oluşumu ve bundan rejenerasyon esnasında kendiliğinden kromozom sayısı iki katına çıkabilmekte ve buradan gelişen doku ve organlar yaşamlarına poliploid olarak devam edebilmektedir. Kromozom sayısı katlanmış (iki katına çıkmış) olan organlardan çiçek ve tohumların gelişmesi ve bunların üretimde kullanılması ya da poliploid dokuların/organların vejetatif çoğaltmada rol alması sonucunda poliploid bitkiler kültür bitkisi olarak ploidi düzeyinde farklılaşmış bir şekilde yaşamlarına devam edebilmektedir. Doğada otopoliploidinin kendiliğinden ortaya çıkmasında ikinci bir yol ise kromozom sayısı indirgenmemiş gametlerdir. Bunların oluşturacağı zigot ve sonrasında gelişen tohum ve bitki tamamen poliploid olacaktır (**Harlan ve De Wet 1975, Ramsey ve Schemske 1998**).

Kendiliğinden ortaya çıkmış olan ya da oluşumu teşvik edilmiş olan poliploidlerin teşhisi önem taşımaktadır. Bu amaçla temelde sitoloji çalışmaları yapılır ve buradan elde edilen sonuçlar bitkinin morfolojisiyle ilişkilendirilir. En temel çalışma sitoloji çalışması olup kromozom sayısının belirlenmesi ile kesin sonuca ulaşılabilir (**Darlington ve Lacour 1979, Rejeb ve Benbadis 1989**). Bunun bir kez yapılması sonrasında bitkinin diğer bazı sitolojik ve morfolojik özellikleri belirlenir ve elde edilen sonuçlar kromozom sayısı ile ilişkilendirilir. Poliploid bitkilerde görülen değişiklikler şöyledir:

1. Hücre büyüklüğünde, dolayısıyla doku ve organlarda büyüme (*gigantizm*): çiçeklerde ve yapraklarda büyüme, daha büyük fakat sayıca daha az tohum
2. Organların şekil ve yapılarında (*strüktür*) farklılaşma: yapraklarda kalınlaşma, buruşukluk görünümü ve tüylülüğün artışı
3. Bitkinin fizyolojisinde değişiklik: bitki-su ilişkilerinde ve fotosentezde farklılaşma
4. Bitkinin fenolojisinde farklılaşma: daha geç meydana gelen ve daha uzun süren çiçeklenme vb.
5. Stomalarda bekçi hücrelerinde bulunan kloroplast sayısında artış: stoma büyüklüğünde ve birim alandaki stoma sayısında değişme
6. Gamet canlılığının ve dolayısıyla fertilitenin azalabilmesi

Günümüzde planlı olarak yürütülen ıslah çalışmalarının yanı sıra, mevcut gen kaynaklarımızın değerlendirilmesi, ve koruma altına alınması gen kaynaklarımızın muhafazası açısından çok önemlidir. Modern tarımda kullanılan ve büyük bölümü F₁ hibrit olan ticari çeşitlerin kullanımı arttıkça önemli karakterleri taşıyan yerel populasyonlar dolayısıyla genetik kaynaklar yok olmaktadır. Yerel populasyonlar bir yöreye çok iyi adapte olmuş bitkilerden oluşur ve modern ıslahta ihtiyaç duyulabilecek çok önemli karakterleri kodlayan genleri taşıyabilirler. Gerek orijinal sebze populasyonlarının kendine özgü güzel tad vb. özellikleri gerekse ıslahta yararlanılabilecek diğer agronomik karakterleri üzerlerinde toplaması dolayısıyla yerel populasyonlar genetik kaynak olarak büyük önem taşımaktadır. Bunların korunması, değerlendirilmesi ve mümkün olduğu durumlarda geliştirilmesi büyük önem taşımaktadır (**Esquinas-Alcasar 1993, Rubenstein ve ark. 2005**). Ülkemiz bulunduğu coğrafyanın sağladığı büyük avantaj dolayısıyla birçok bitkinin anavatanı ya da ikincil gen merkezi konumundadır. Türkiye’de Mikro Gen Merkezleri ve yaygın sebze türleri şunlardır:

1. Trakya-Ege mikrogen merkezi: kavun;
2. Güney-Doğu Anadolu mikrogen merkezi: soğan, sakız kabağı, karpuz kavun, hıyar, fasulye;
3. Samsun-Tokat-Amasya mikrogen merkezi: fasulye, bakla, lahana;
4. Kayseri ve civarı: bezelye;
5. Ağrı ve civarı: karpuz, kavun (**Balkaya ve Yanmaz 2001**).

Bahsi geçen yörelerimizden yerel çeşitlerin toplanması ve korunması büyük önem taşımakta ve bu amaçla bazı çalışmalar sürdürülmektedir (**Küçük ve ark 2002, Balkaya ve Yanmaz 2005, Madakbaş ve ark. 2007**).

Bu amaçla “**Kırkgünlük**” isimli yerel bir fasulye çeşidi Tokat yöresinden elde edilmiştir. Bu çeşit Tokat ili şartlarına iyi uyum sağlamış erkenci ve lezzetli bir çeşittir. Ekimi Tokat bölgesinde nisan ayı sonlarına doğru yapılmakta ve yaklaşık olarak kırk günde çiçeklenmektedir. Bu populasyona ait bitkilerin taze baklaları yemeklik ve konservelik ve turşuluk olarak kullanılabilir. Fasulye besin değeri açısından önemli olup A, C vitamini ve folik asit ve diğer bazı önemli vitamin ve mineralleri içermektedir (**Li, 2008**). Anavatanı orta ve güney Amerika olmasına rağmen (**Silbernagel 1986**) yukarıda sayılan olumlu özelliklerinden dolayı fasulyenin mutfağımızda önemli bir yeri vardır.

Burada sunulan tez çalışması ülkemiz sebze genetik kaynaklarının korunması ve ıslah çalışmaları yoluyla değerlendirilmesi amacına yöneliktir. Bunun için Tokat yöresinden toplanmış olan yerel fasulye çeşiti “**Kırgünlük**”de kromozom sayısının katlanması (otopoliploidinin teşviki) kolhisin ve trifluralin kullanılarak gerçekleştirilecektir. Bu çalışmada yaygın olarak kullanılan kolhisine alternatif olarak trifluralinin etkinliği özellikle araştırılacaktır. Üretilecek olan poliploid (otopoliploid) fasulyelerde meydana gelebilecek bazı morfolojik ve sitolojik değişiklikler incelenecektir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Poliploid bitkilerin oluşumu suni olarak teşvik edilebilmektedir. Bu amaçla hücre bölünmesine müdahale etmek gerekmektedir. Bunun için mitoz bölünmede hücre içinde kromozom sayısı iki katına çıktıktan sonra kromozomların kutuplara çekilmesini sağlayan iğ iplikleri depolimerize edilir (ortadan kaldırılır). Kutuplara çekilemeyen ancak sayısı iki katına çıkmış olan kromozomlar bölünme olmayan aynı hücre içerisinde kalır ve bu şekilde kromozom sayısı iki katına çıkarılmış olur. Bu amaçla depolimerizasyon ajanı (depolimerisation agent) adı verilen bazı bileşikler kullanılmaktadır. Bunlardan en yaygın olanı kolhisindir. Kolhisin fasulyede allopoliploidlerin elde edilmesinde türlerarası bir melezleme sonrasında başarıyla kullanılmıştır (**Rejeb ve Benbadis 1989**). Ancak gerek yüksek oranda mutajenik olması ve çevreye olan görece yüksek zararı gerekse çok pahalı olması dolayısıyla Kolhisine alternatif bileşiklerin kullanımı araştırılmıştır. Bu bağlamda oryzalin, trifluralin, amiprofos-methyl, N₂O'da da aynı amaçla *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda başarıyla kullanılabilceği ortaya çıkarılmıştır (**Grzebelus ve Adamus 2004, Bouvier ve ark 2006**). Ancak Kolhisin dışındaki bileşiklerin fasulyede poliploid elde edilmesine yönelik olarak kullanımına ilişkin bir çalışmaya literatürde rastlanmamaktadır.

Sen ve Vidyabhusan (1960), soya fasulyesinin 4 çeşidinde ototetraploidiyi teşvik etmek amacıyla, tohumları kolhisin çözeltisinde bekletme ve pamuk bir tıpayı çimlenen fidelerin apikal meristemlerine yerleştirme yoluyla uygulama yapmışlar ve sonuçta pamuk bir tıpa yoluyla genç fidelerin apikal meristemlerine uygulama yapmanın daha başarılı bir yöntem olduğu sonucuna varmışlardır. Bu amaçla kolhisinin altı farklı dozunu, (%0.01, %0.025, %0.05, %0.1 ve %0.25) 6 farklı sürede ($\frac{1}{1}$, $\frac{1}{2}$, 3, 6, 12 ve 24 saat) uygulamışlardır. Araştırmacılar, otopoliploidiyi teşvik etmeyi başardıkları bitkilerde, tohumların diploidlere göre daha geç çimlendiklerini, gövdenin tetraploidlerde daha kalın olduğunu, yapraklarının daha kalın, koyu yeşil renkli, daha fazla sayıda ufak yaprağa sahip olduklarını bildirmişlerdir. Aynı çalışmanın sonuçlarına göre, tetraploidlerin yaprakları daha tüylü, stoma hücrelerinin boyutu da bu bitkilerde diploidlere göre %20-35 oranında artış göstermiştir. Buna rağmen, stoma hücrelerinin birim alandaki sayısında %65 civarında azalma kaydedilmiştir. Çiçeklenmenin ototetraploid bitkilerde diploid bitkilere göre daha geç olduğu, çiçeklerde fazladan petal ve stamen bulunduğu tespit edilmiştir. Polen canlılıkları açısından, steril polenlerin frekansının ototetraploidlerde daha yüksek olduğu, diploidlerde 3 porlu olan

polenlerin bu bitkilerde 4 hatta 5 porlu yapıya sahip oldukları araştırmacılar tarafından gözlemlenmiştir. Tetraploid bitkilerde tohum tutma oranının da diploid bitkilere göre oldukça azaldığı kaydedilmiştir.

Nohut üzerinde yapılan bir başka çalışma, **Sohoo ve ark. (1970)** tarafından yapılmıştır. Araştırma için yine depolimerizasyon ajanı olarak, kolhisin kullanılmıştır. Bu çalışmada tetraploid bitki elde etmede en başarılı uygulamanın, %0.25 kolhisin konsantrasyonunda, 2 saat süre ile elde edildiği bildirilmiştir.

Pundir ve Maesen (1982), nohutta (*Cicer aritenum* L.) otopoliploidinin teşvik edilmesi amacıyla, 4 ve 6 saat süre ile, %0.25 %0.05 ve %0.025 kolhisin dozlarını kullanmışlardır. Araştırmada uygulama bölgesi olarak tohum ve genç fideler kullanılmıştır. Tohum uygulaması için, iyi gelişmiş, her uygulama için 500 adet tohum, kolhisin'in %0.25 %0.05 ve %0.025 konsantrasyonlarında 4 ve 6 saat süreyle bekletilmiştir. Uygulama sonrası çeşme suyunda yıkanan tohumların tarlaya ekimleri yapılmıştır. Başka bir uygulama ise fidelere yapılmış, bunun için, 3:1 oranında toprak ve çiftlik gübresi ile doldurulmuş, küçük saksılarda fidelerin üretimi gerçekleştirilmiştir. Fidelerin ortaya çıkmasının ardından, apikal meristem etrafına bir pamuk tampon yerleştirilmiş ve pamuk nemli kalacak şekilde, düzenli aralıklarla iki farklı konsantrasyonda kolhisin çözeltisi damlatılmıştır. Bu uygulamada, her kolhisin konsantrasyonu için 100 fide kullanılmıştır. Araştırmanın sonunda çalışmacılar, otopoliploidi bitki elde etmede en iyi etkinin, tohuma muamelede %0.25 kolhisin konsantrasyonu ile 4 saat uygulamada sağlandığını belirlemişlerdir. Araştırmaya göre fidelere uygulamanın beklenen sonucu vermediği bildirilmiştir. Uygulama sonrası araştırmacılar, ototetraploid durum gösteren bitkilerde yaprakların daha geniş, çiçeklerin, stomaların, polenlerin ve tohumların daha büyük olmasına rağmen, polen boyanabilirlik ve bakla tutma ortalama yüzdelerin düştüğünü kaydetmişlerdir.

Bazı bitkiler ise doğal şartlarda hem diploid hem de poliploid formda olabilirler (**Simmonds 1989**). Poliploidi bitkilerin hem adaptasyon hem de tür farklılaşmasını sağlayan bir mekanizma olup angiospermilerin %47-70'i poliploiddir (**Ramsey ve Schemske 1998**). Poliploid bitkilerden muz, elma, zencefil, karpuz, bazı turunçgiller triploid olabilirken, bazı buğday türleri, mısır patates lahanaya, pırasa, tütün, yer fıstığı tetraploid olabilmekte, krizantem, ekmeklik buğday, triticale, yulaf ve kivi heksaploid olup, çilek, dahlia ve şeker kamışı gibi bazı türler de oktaploid ploid düzeyindedir (**Harlan ve deWet 1975, Ross ve ark 1992, Ladzinsky 1998**).

Rejep ve Benbadis (1989), *Phaseolus coccineus* L. erkek kısır hattı ile yabancı genotip *Phaseolus acutifolius* A. Gray arasında melezme sonucu oluşan F₁ bitkilerindeki kısırılığın aşılması amacıyla, kolhisin uygulaması ile verimli allotetraploidler oluşturulması sağlanmaya çalışılmıştır. Araştırmacılar, genç bitki parçalarının köklerini 3 saat süre ile %1 lik kolhisin solüsyonunda bekletmişlerdir. Uygulamanın ardından, gövdenin temel parçaları ile köklenen parçacıklar su ile durularak perlit dolu kapların içene transfer edilmiştir. Uygulamadan sonra bitkilerde stoma incelemesi yetişkin yaprakların altından alınan epidermis örnekleri ile yapılmıştır. Ayrıca kök ucu kromozom sayımı feulgen tekniğinden faydalanarak yapılmıştır. Uygulama yapılan bitkilerde ve F₁ hibritlerde mikrosporogenesis incelenmesi için olgunlaşmamış çiçek tomurcukları %45 lik asotacarmin ile boyanarak incelenmiştir. Araştırmanın sonucunda belirgin morfolojik ve sitolojik karakterlerin tanımlanmasının poliploid olmayan bitkilerden poliploidleri ayırmada önemli olduğu kaydedilmiştir. Oluşan allotetraploidler kontrol bitkilerinden daha yavaş bir gelişme göstermişlerdir. Araştırmacılar büyük çiçek ve geniş yapraklı görünüşleri ile allotetraploidleri F₁ hibritlerinden ayırmışlardır. Sonuç olarak allotetraploidlerde yapraklar daha geniş, daha tüylü, daha kalın ve koyu renklidir. Stoma analizleri sonucu allotetraploidlerin diploid yada ana baba ebeveynlerinden daha büyük stoma hücrelerine sahip olduğu görülmüştür. Stomanın sayısal yoğunluğu diploid bitkilerdekenden daha az olmasına rağmen, *Phaseolus acutifolius* ebeveyniyle benzerlik göstermiştir. Ayrıca allotetraploidlerin polen çapı ana baba hatlarınınkinden yaklaşık iki kat daha büyük olduğu gözlenmiştir. Araştırmada, kromozomu ikiye katlandığı şüpheli olan tüm hibrit bitkilerinde poliploidi durumları kromozom sayımı ile doğrulanmıştır.

Bouvier ve ark. (1994), yaptıkları çalışmalarda *in vitro* ortamdaki haploid elma filizlerinin kromozom dublikasyonunu teşvik etmede iki mitotik ajan olan kolhisin ve oryzalin kullanarak, iki kimyasal ajanın, söz konusu etkisini karşılaştırmışlardır. Araştırmada, kolhisin için, 0.025 0.25 ve 1.25 mM konsantrasyonu, oryzalin için ise 5, 15 ve 30 mM konsantrasyonları denenmiştir. Uyguma sırasında farklı üç teknikten faydalanan araştırmacılar, ilk denemede *in vitro* ortamda yetiştirilen elma filizlerini, kolhisin ve oryzalinin farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış, çözeltilerine daldırmışlar ve sonuçta hayatta kalan bitki oranını oldukça düşük bulmuşlardır. Kolhisinin ile uygulamada oryzaline göre hayatta kalan bitki sayılarının az olduğu tespit edilmiştir. İkinci denemede depolimerizasyon ajanları kültür ortamına eklenmiş ancak, sonuçta genotip ya da kimyasal ajan türüne bakılmaksızın hiçbir başarı elde edilmemiştir. Üçüncü denemede filizler iki kimyasal ajanın ilave edildiği agar ortamlarına bırakılmış, ve en fazla başarı bu teknikle yakalanmıştır.

Araştırmanın sonunda, en düşük uygulama ile en fazla başarının elde edildiği ve kromozom dublikasyonu için, oryzalinin kolhisinden daha iyi bir seçenek olabileceği belirtilmiştir.

Poliploidi seviyesinin kromozom sayımı ile belirlenmesi uzun zamandır bilinen bir metod olması yanında, klasik metodlara kıyasla daha kesin bir fikir vermesi, diğer indirekt metodlardan daha başarılı bir şekilde uygulanması bu tekniği önemli kılmaktadır. **Sarı ve ark. (1999)** bildirdiğine göre, **De Laat ve ark. (1987)**, kromozom sayımının iyi donanımlı bir laboratuvar ve uzman bir ekip gerektirmesi, gibi nedenlerden dolayı kloroplast sayısının kromozom sayısına alternatif bir yaklaşım olabileceği fikrini ortaya atmışlardır. Ayrıca kromozom sayım tekniğinde teknik donanım ve deneyimli elemanın sağlanması koşullar yerine getirilse bile bazı bitki türlerinde kromozom sayımlarının çok güç, hatta imkansız olduğu durumlar olabilmektedir (**Ellialtıoğlu ve ark. 2001**). Bununla birlikte poliploidi olasılığının düşük olduğu durumlarda kromozom sayımının etkili olarak kullanılmadığı, indirekt metodlardan flow sitometri tekniğini kullanarak başarı sağladıklarını ifade etmişlerdir. Flow sitometri bitki çekirdek DNA içeriğini tahmin etmede kullanılan etkili bir tekniktir.

Sarı ve ark. (1999), bildirdiğine göre, **Brown ve ark. (1991)** Brüksel lahanasıyla yaptıkları çalışmalarda, klasik kromozom sayımına alternatif olarak stoma büyüklüklerini kullanmışlar, bu bitkilerin haploid olanlarında stoma büyüklüğünün 14 µm, diploidlerde 20 µm, triploidlerde ise, 24 µm olduğunu tespit etmişlerdir.

Poliplodi belirlemede kromozom sayımına alternatif olarak, morfolojik gözlemlerde bitkilerin üretimi için uzun zamana ihtiyaç duyulması, flow sitometri tekniğinin ise, yoğun çaba ve masraf gerektirmesi nedeniyle, kloroplast sayısı ve stoma ölçümleri yoğun çabaya gereksinim duymadan kullanılabilen pratik yöntem olarak kullanılabilir.

Sarı ve ark. (1999), karpuzda (*Citrullus lanatus*) yaptıkları çalışmada direkt metod olarak kromozom sayımı ile indirekt metod olarak, flow sitometri, stoma boyu, bekçi hücrelerdeki kloroplast sayısı ve morfolojik gözlemleri kullanarak poliploidi durumlarını belirlemeye çalışmışlardır. Araştırmacılar ışınlanmış polen yoluyla tozlanma sonucu oluşan Haploid Sugar Baby ve Halep Karası karpuz çeşitlerini kullanarak, bu çeşitlerin haploid ve diploid formlarında indirekt ve direkt metodları kullanarak poliploidi durumlarını incelemişlerdir. Araştırma sonucu, haploid bitkilerin stoma uzunluğu, 17-18 µm, çapı ise 10-12 µm iken, diploid bitkilerin stoma uzunluğu, 23-24 µm, çapı 18 µm olduğu gözlenmiştir. Stoma bekçi hücrelerindeki kloroplast sayısı ise haploid bitkilerde 6-7 iken, bu sayı diploid bitkilerde 11-12 arasında değişiklik gösterdiği tespit edilmiştir.

Bitkilerde ploidi düzeyinin belirlenmesi amacıyla değişik yöntemler geliştirilmiş ve kullanılmıştır. Bitkinin morfolojisi bize poliploidi konusunda bir fikir verse bile, bu konuda en eski ve güvenilir olarak kullanılan yöntem, özellikle kök uçları gibi hızlı büyüyen doku ve organlarda gerçekleştirilen kromozom sayımıdır (**Ellialtıoğlu ve ark. 2001**).

Kavun ve karpuz bitkilerinde tozlamada ışınlanmış polen kullanımıyla haploid bitkilerin oluşumu teşvik edilebilmektedir. Ancak ortaya çıkan haploid bitkilerin kromozom sayısının tekrar iki katına çıkarılması gerekmekte olup bu amaçla kolhisin kullanılmıştır (**Sarı ve Abak 1996, Yetişir ve Sarı 2003, Bal ve ark 2003**).

Tepe ve ark. (2002), nane bitkisinde *in vitro* kolhisin uygulamaları ile poliploid bitki elde etmeyi amaçlamışlardır. Araştırmacılar, arazide yetişen nane bitkilerinden aldıkları tek boğum explantlarını aseptik koşullarda 30g/L sükröz 6g/L agar, 0,5 mg/L BA içeren MS besin ortamlarında kültüre almışlardır. Bir ayın sonunda *in vitro* sürgünlerden tek boğum explantları ve sürgün uçları, 100 veya 150 mg/L kolhisin içeren besin ortamlarında 5, 7 ve 10 gün süreyle yetiştirilerek ardından kolhisin içermeyen besin ortamlarına aktarılmışlardır. İki ay sonra serada dış koşullara alıştırılan bitkilerin kök uçlarında kromozon sayımları yapılarak ploidi oranları belirlenmiştir. Araştırmada sürgün ucu ve tek boğum explantlarının kolhisin uygulamalarında kullanılabileceği ve explantların 5 gün 100 mg/L kolhisin uygulamasın ardından kolhisin içermeyen ortamlara aktarılması durumunda %25 – 27 oranında poliploid bitkiler elde edilebileceği ortaya konulmuştur. Bu çalışmanın sonunda uygulama yapılan bitkilerde değişik ploidi düzeyleri saptanmıştır. Ayrıca çalışmada miksploid yapıda bitkilere de rastlanmıştır. 10 güne çıkarılan uygulama süresinde bitki gelişme oranını ve dikilen explant başına elde edilen poliploidi oranının düştüğü tespit edilmiştir. Araştırmacılar kromozom sayımı ile yaprak morfolojilerini inceleyerek stoma sayısı ile kromozom sayısı arasında benzer bir ilişki olduğunu bildirmişlerdir.

Joshi ve Verma (2004), baklada (*Vicia faba*) ototetraploidiyi teşvik etmek amacıyla kolhisin kullanmışlardır. Araştırmacılar, 60 bakla tohumunu distile su içinde 20 saat 25 ± 2 °C 'de bırakmışlar ve ardından tohumları %0.005 konsantrasyonundaki kolhisin çözeltisinde 8 saat ve 24 saat süreyle tutmuşlardır. Uygulamanın ardından tohumlar musluk suyunda 1 saat süreyle yıkanarak, kolhisin dokulardan uzaklaştırılmaya çalışılmış, daha sonra ise topraktan yapılmış saksılar içine ekilmişlerdir. Kontrol bitkilerinin tohumları ise, distile su içinde 8 ve 24 saat bekletilmiştir. Uygulama sonrası değişik aralıklarla gelişme oranları ve morfolojik veriler kaydedilmiştir. Otopoliploidinin teşvik edilmesi amacıyla yapılan bu çalışmada en

fazla başarının, tohuma %0.005 kolhisin konsantrasyonunda 8 saat ile sağlandığı ortaya çıkarılmıştır. Araştırmada kullanılan 30 tohumdan 15 tanesinin poliploid olduğu indirekt metodlar ve kromozom sayımı ile doğrulanmıştır. Aynı kolhisin konsantrasyonu kullanılarak 24 saatlik uygulama süresinde ise tohumların hiçbirinin çimlenmediği gözlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, poliploidlerde uygulamanın ilk evrelerinde diploidlere nazaran daha yavaş bir gelişme gözlendiğini kaydeden araştırmacılar, daha sonraki süreçlerde poliploidlerde gigantizmin (devlik) varlığından söz etmişlerdir. Gigantizm ile beraber poliploidlerde diploidlere nazaran, daha kalın gövde ve daha koyu yeşil yaprakların varlığı gözlenmiştir. Diploid kontrol bitkilerinde ilk çiçeklenme 53 günde olurken, poliploidlerde ise, 92 güne kadar çıktığı kaydedilmiştir. Stoma hücrelerinin ve polen tanelerinin boyutları poliploidlerde artmış, birim alandaki stoma sayısı ise kontrol bitkilerine kıyasla azalma göstermiştir. Çiçeklerin boyutunda ve görünümünde de diploid bitkiler ile poliploidler arasında farklılık görülmüş, çiçek kanatları üzerinde poliploidlerde koyu beneklerin varlığı yanında, çiçeklerin bitki üzerinde diploidlere nazaran 2-3 gün daha fazla süre ile kaldığı rapor edilmiştir. Polen fertilesi, asetocarmin boyama yöntemiyle belirlenmeye çalışılmış, sonuç olarak diploidlerde polen boyanabilirliği %100 bulunurken, poliploidlerde bu oran %50 den daha az bulunmuştur. Polen morfolojisi bakımından poliploid bitkilerin polenleri üç köşeli iken kontrol bitkilerinin polenlerinin elips görünümünde olduğu gözlenmiştir. Poliploid bitkilerde bakla boyutu ve tohumlar artmasına rağmen, bahsi geçen özelliklerde sayıca azalma görülmüştür. Sonuçta bakla ve bitki başına tohum sayısının diploid bitkilerle kıyaslandığında önemli oranda azaldığı bildirilmiştir. Araştırmada uygulamanın ardından morfolojik gözlemlerin yanında sitolojik incelemeler yapılarak, polen ana hücrelerinde mayoz bölünmedeki kromozom durumları gözlenmeye çalışılmıştır. Araştırmacılar, ayrıca kök ucu kromozom sayımı ile poliploidi seviyeleri belirleyerek, indirekt metodlarla yapılan tahminleri doğrulamışlardır.

Fernandes ve ark. (2006), *Allium cepa*'da trifluralin kullanarak, bu herbisistin poliplod bitki oluşturma durumlarını ve herbisistin hücre bölünmesindeki etkisini incelemişlerdir. Söz konusu çalışmada tarımda kullanımı tavsiye edilen trifluralin dozu dikkate alınarak, saflık derecesi 445 gr/L olan trifluralin için en yüksek doz hazırlanmıştır. Ticari üretimden seyreltilerek oluşturan 0.42 ppm, 0.84 ppm, 1.67 ppm ve 3.34 ppm dozlarının etkilerini araştırmak için *Allium cepa* kökleri 24 saat süreyle, trifluralinin değişik konsantrasyonlarına maruz bırakılmıştır. Araştırmacılar, bu uygulamadan sonra bazı kökleri 48 saat süre ile saf su içinde tutarak, bir düzeltme uygulamasına maruz bırakmışlar, ardından

başka petri kaplarına aktarımlarını gerçekleştirmişlerdir. Bu uygulamaların etkilerini ise mitoz bölünme sırasındaki hücre durumlarında izleyerek, belirlemeye çalışmışlardır.

Örçen (2006), Tütün (*Nicotiana tabacum* cv. Sarıbağlar) 3-5 yapraklı haploid bitkicikleri diploid hale getirmek amacıyla antimitotik ajan olarak, trifluralinin 0, 10, 30 ve 50 μM konsantrasyonları için, 24, 48 ve 72 saatlik uygulama sürelerini kullanmışlardır. Araştırmada her uygulama için 50 adet bitki kullanılmıştır. Araştırmanın sonucunda uygulama süresinin artmasının yaşamalarını devam ettiren bitki sayısında azalmaya yol açtığı, en fazla katlama oranının ise 10 μM konsantrasyonu ile 24 saatlik uygulama süresinde görüldüğü bildirilmiştir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

Bu çalışma 2010 ve 2011 yıllarında Namık Kemal Üniversitesi Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı Laboratuvarı ve serasında yürütülmüştür.

2010 yılındaki çalışmalar ön deneme şeklinde yürütülmüş, fasulyede otopoliploidiyi elde etmeye yönelik bu çalışmada, 2011 yılındaki denemelerden elde edilen veriler kullanılmıştır.

Denemelerin sitolojik gözlemleri Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü ve Tarla Bitkileri Sitogenetik Laboratuvarında yapılmıştır. *In vitro* polenlerinin çimlendirilmesi için Bitki Koruma Anabilim Dalı Fitopatoloji Laboratuvarından yararlanılmıştır.

3.1. Materyal

Araştırmada bitkisel materyal olarak Tokat yöresine ait olan yerel “**kırkgünlük**” fasulye çeşidi kullanılmıştır. Yerel kırkgünlük fasulye çeşidi, Tokat yöresine iyi uyum sağlamış, erkenci, kılçıksız ve lezzetli bir çeşittir. Özellikle yetiştiriciler tarafından istenilen özellikleri barındırması sebebiyle, Tokat yöresi için önemli bir yere sahiptir. Tohum kabuğu açık kahverengi ve tohum üzerinde mor benekler yer almaktadır. Tohum şekli hafif yassı, oval biçimlidir (Şekil 3.1). Taze baklaları açık yeşil üzerine açık kırmızıya benzer lekeler taşıyan, baklaları içinde yaklaşık 4-6 tohum taşıyan bir çeşittir. Bakla yaklaşık 10-12 cm boyutunda olup, ortalama 1.5 cm genişliğindedir. Morfolojik olarak, bodur forma sahip olan bu yerel çeşit, yan dallarda çok fazla dallanma ile toplu bir gelişme göstermektedir. Erkenci bir çeşit olan yerel kırkgünlük popülasyonunun ekimden çiçeklenmeye gün sayısı hava şartlarına bağlı olarak, 40-42 gündür. Yetiştiriciler tarafından taze ve konserve şeklinde veya derin dondurucuda muhafaza edilerek tüketilmektedir. Bu çeşit kuru fasulye olarak tercih edilmemektedir.



A



B

Şekil 3.1. Yerel Kırkgünlük fasulye tohumları ve bitkisi

3.2. Yöntem

2010 yılındaki ön denemelerinde fasulyede otopoliploidinin uyartılması amacıyla kolhisin ve trifluralin kotiledon aşamasındaki bitkilerin apikal meristemlerine ve tohuma uygulanmıştır.

2011 yılındaki denemeler ise kolhisin ve trifluralin çözeltilerine, erken kotiledon aşamasındaki bitkilerin tamamının daldırılması, geç kotiledon aşamasındaki bitkilerin apikal meristemlerine kolhisin ve trifluralin uygulanması ve gelişmiş bitkilerin aksilar tomurcuklarına (yan sürgün) kolhisin ve trifluralin uygulaması şeklinde yürütülmüştür.

3.2.1. Kolhisin çözeltisinde tohumların bekletilmesi

Bu amaçla, bazı hastalıkların tedavisinde (gut hastalığı vb) kullanılan ve 1 tabletinde yaklaşık 0,5 mg kolhisin etken maddeli Kolsin isimli ilaç kullanılmıştır.

2010 yılında gerçekleştirilen ön denemede kolhisin içeren ilaçtan %0, %0.005 ve %0.0025'lik çözeltiler hazırlanmış, bu amaçla öncelikli olarak %0.005 çözelti hazırlanıp, daha sonra %0.0025 seyreltilerek oluşturulmuştur.

Cözeltinin Hazırlanması

Denemede kullanılmak üzere bir tabletinde 0.5 mg kolhisin içeren ilaçtan 10 tablet 100 ml su içerisinde çözündürülerek, %0.005 kolhisin konsantrasyonuna sahip solüsyon

hazırlanmıştır. Bu çözeltilerden 50 ml alınarak, su ile 100 ml tamamlanmış ve böylece %0.0025 konsantrasyona sahip kolhisin çözeltisi elde edilmiştir.

2010 yılında (19 Mart) kolhisin'le uygulama için 90 bitkiye 90 viyol hesabı yapılarak, ticari olarak satılan viyollere, viyollerin $\frac{3}{4}$ 'ü dolu olacak şekilde torf doldurulmuştur. Kolhisin çözeltisinde 24 saat bekletilen tohumlar, çözeltilerden çıkarıldıktan sonra, 2 kez musluk suyunda yıkanmış ve daha sonra yine musluk suyu konmuş kavanozlarda 20 dakika bekletilmiştir (Şekil 3.2). 1 gün süreyle suda bekletilen kontrol bitkileri ve %0.005 ve %0.0025 kolhisin konsantrasyonuna sahip çözeltilerde bekletilen tohumlar torf doldurulmuş, ortamlara ekilmiştir. Ekilen her bir tohumun bağlı bulunduğu viyoller tek tek etiketlenmiştir.

Uygulamadan 10 gün sonra hayatta kalan bitki sayıları ve morfolojik değişimler kaydedilmiştir.



Şekil 3.2. Tohumların kolhisin çözeltisinde bekletilmesi

3.2.2. Kotiledon aşamasındaki bitkilere kolhisin uygulaması

Ön denemeler için 2010 yılında (23 Nisan 08:15) yerel kırkgünlük fasulye tohumları çeşme suyunda iki kez yıkanarak, yine çeşme suyunda 9 saat bekletilmiştir. Kolhisin uygulaması için bitki tohumları (17:00) torfa (ticari yetiştirme ortamına) ekilmiştir. Ekimi yapılan tohumlardan çimlenen bitkilere kolhisin uygulaması ekimden bir hafta sonra (1 Mayıs 13:00) yapılmıştır. Bunun için, %0, %0.05 ve %0.1'lik dozlarda çözeltiler hazırlanmış ve ısıtmasız cam serada her doz için 10 bitki olacak şekilde toplam 90 bitkiye uygulama

yapılmıştır. Uygulama esnasında buharlaşmayı önlemek amacıyla, bitkilerin üzeri uygulama süresi olan 3 saat boyunca polietilen ile örtülmüştür.

2011 yılı denemesi için tohum ekimi (23 Nisan 17:00) yapılmış, ve ekimden 10 gün sonra (3 Mayıs 2011 07:00) uygulamalara başlanmıştır. Bu amaçla kolhisinin %0.1 ve %0.05 dozları 3 ve 6 saat süre ile bitkinin apikal meristemlerine kolhisin çözeltisine daldırılmış pamuk yerleştirmek suretiyle uygulanmıştır (Şekil 3.3).



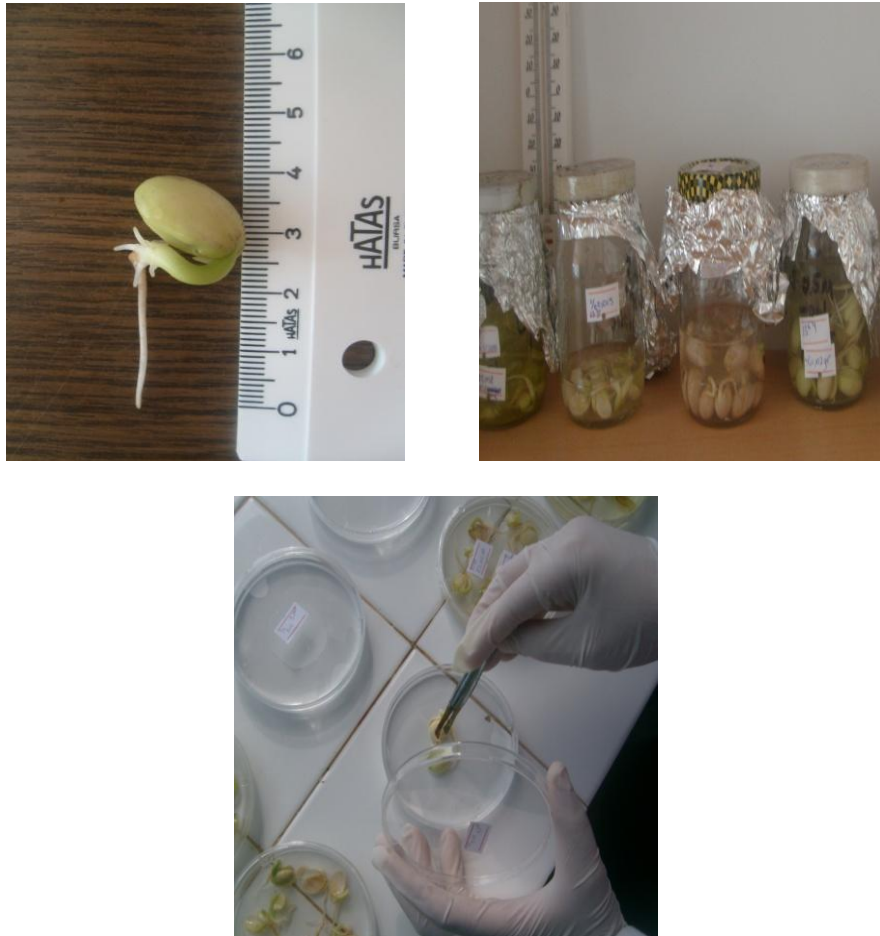
Şekil 3.3. Kotiledon aşamasındaki bitkilerin apikal meristemlerine uygulama

Kotiledon aşamasındaki bitkilere uygulama yapabilmek için, fasulye bitkisinin tohum kabuğu yırtılarak, apikal meristemine damlatacağımız depolimerizasyon ajanını kabul edecek uygun bir duruma gelmesi beklenmiştir. Ancak bu durumda büyüme ucunun erken evrede olması istendiğinden son aşamada büyüme ucu ikinci gerçek yaprak sürgünleriyle iyice sarılmış halde bulunmaktadır. Böyle bir durum ise kolhisin ve trifluralinin büyüme ucuna etki etmesini zorlaştırmaktadır. Bu amaçla 2011 yılında erken kotiledon aşamasındaki bitkilerin tamamının hazırlanan kolhisin çözeltilerine daldırılması denemesi gerçekleştirilmiştir. Bu deneme için tohumlar saf suda çimlendirilmiş, ardından kotiledon aşamasına gelen bitkilerin kolhisin çözeltisine daldırılması (22 Mayıs) gerçekleştirilmiştir.

Araştırma için, iki farklı kolhisin dozu (%0.02 ve %0.005), iki farklı süre (3 ve 6 saat) kullanılmıştır. Bu amaçla 100 mg kolhisin 500 ml saf su içerisinde çözülmüştür. Bu şekilde %0.02'lik konsantrasyona sahip olan çözelti seyreltilerek, %0.005 lik kolhisin çözeltisi

oluşturulmuştur. Bu konsantrasyonu elde etmek için ise, %0.02 lik çözeltilerden 25 ml alınarak, üzeri saf su ile 100 ml tamamlanmış ve böylelikle %0.005 konsantrasyonuna sahip kolhisin çözeltisi hazırlanmıştır.

Uygulama için 5. gündeki bitkiler, henüz kotiledon aşamasındayken, 3 saat ve 6 saat süre ile hazırlanan bu çözeltiler içine bırakılmışlardır. Kolhisinin apikal meristem üzerindeki etkisini arttırmak amacıyla, bitkilere iki grup halinde uygulamalar yapılmıştır. Bu amaçla birinci grup bitkilerin hem tohum zarfları yırtılmış, hem de kotiledonlarından biri koparılmış, diğer gruptaki bitkilerin ise sadece tohum kabukları yırtılmıştır (Şekil 3.4). Ayrıca kolhisin uygulamasında yüzey gerilimin önüne geçebilmek amacıyla çözeltinin miktarıyla doğru orantılı olarak, eser miktarda yayıcı ve yapıştırıcı olarak tarımsal ilaçlamalarda kullanılan citowett isimli madde damlatılmıştır. Uygulama sürelerinin ardından bitkiler saf su içerisinde 2,5 saat tutularak, kolhisin dokulardan uzaklaştırılmaya çalışılmıştır. Kontrol bitkileri ise uygulama süreleri boyunca saf suda bekletilmiş, ardından yine 2,5 saat saf su ile dolu olan başka bir ortamda bekletilmişlerdir.



Şekil 3.4. Çimlendirilen tohumlara erken kotiledon aşamasında kolhisin uygulaması.

3.2.3. Aksilar tomurcuklara kolhisin uygulaması

2011 yılında (8 Mayıs), 510 adet bitki tohumu ticari torf doldurulmuş, plastik saksılara ekilmiş, ancak bir haftanın sonunda bu tohumlardan ancak 456 tanesinin çimlendiği görülmüştür. Bunun üzerine çimlenerek gelişimini sürdüren bitkilerde uygun döneme geldiklerinde aksilar tomurcuklara kolhisin uygulaması yapılmıştır. Bu amaçla (1 Haziran 2011) tepe tomurcukları kesilerek, aksilar tomurcukların gelişmesi için beklenmiştir. Tepe tomurcuklarının kesilmesinden 3 gün sonra, aksilar tomurcuklar gelişmeye başlar başlamaz sadece tepe tomurcuğunun kesildiği yerin altındaki aksilar tomurcuk sürgünü kalacak şekilde diğer yan sürgünler temizlenmiştir. Bu işlemin ardından 5. günün sonunda bitkilere kolhisinin %0.02'lik konsantrasyonu 3 ve 6 saatlik süreler şeklinde uygulanmıştır. Denemede her uygulama için 12 bitki kullanılmıştır.

3.2.4. Kotiledon aşamasındaki bitkilere trifluralin uygulaması

2010 yılındaki ön denemeler, fasulyede uygulanacak trifluralin dozuna karar verebilmek için, Bıyıklı Köyü'nden (Tekirdağ Merkez) yerel bir çeşit alınmış ve letal (öldürücü) dozları araştırmak amacıyla bu çeşit üzerinde yürütülmüştür. Bu amaçla litresinde 480 g trifluralin etken maddeli herbisistin %100, %50 ve %30 sulu çözeltileri bitkilere uygulanmış, yapılacak diğer denemelerde kullanılacak trifluralin dozu belirlenmeye çalışılmıştır.

2010 yılında (23 Nisan 8:15) yerel kırkgünlük fasulye tohumları, çeşme suyunda iki kez yıkanarak, yine çeşme suyunda 9 saat bekletilmiştir. Trifluralin uygulaması için bitki tohumları torf doldurulmuş plastik saksılara (17:00) ekilmiştir. Ekimden bir hafta sonra kotiledon aşamasındaki bitkilerin apikal meristemlerine trifluralin uygulaması (1 Mayıs 13:00) yapılmıştır. Bu uygulamalar için, litresinde 480 g trifluralin etken maddeli herbisistin %0, %5 ve %10 dozları kullanılmış, ve her doz için 10 bitki olacak şekilde ısıtmasız cam serada, toplam 90 bitkiye uygulama yapılmıştır.

2011 yılı denemesi için tohum ekimleri (23 Nisan) yetiştirme ortamı olarak, torf doldurulmuş, plastik saksılara yapılmıştır (Şekil 3.5). Şekil 3.6'da uygulamalar öncesi bitkinin durumları görülmektedir. Kotiledon aşamasındaki bitkilerin apikal meristemlerine uygulama (8 Mayıs 07:00) yapılmıştır. Bu amaçla bitkilerin apikal meristemleri litresinde 480 gr trifluralin etken madde içeren ilacın, %1 ve %5 olmak üzere iki farklı dozuna 3 saat ve 6 saat

süre ile maruz bırakılmıştır. Uygulama sırasında bitkilerin apikal meristemleri etrafına pamuk yerleştirilip, trifluralin çözeltisi bu pamuğa damlatılarak, trifluralinin bitkinin büyüme ucuna temas etmesi sağlanmaya çalışılmıştır.

Paralel bir başka çalışma (22 Mayıs 2011) ise, saf suda çimlendirmeye (17 Mayıs) bırakılan ve kotiledon aşamasına gelen bitkilerin trifluralin çözeltisine daldırılması şeklinde gerçekleştirilmiştir.

Araştırmada iki farklı trifluralin dozu (%0.2 ve %0.01), iki farklı süre (3 ve 6 saat) kullanılmıştır. Bu amaçla, %0.2 lik çözelti oluşturulmuştur. Bu konsantrasyondan seyreltilerek, %0.01 lik trifluralin çözeltisi elde edilmiştir. Bu konsantrasyonu elde etmek için ise, %0.2 lik çözülden 5 ml alınarak, üzeri saf su ile 100 ml tamamlanmış ve böylelikle %0.01 konsantrasyonuna sahip trifluralin çözeltisi hazırlanmıştır.



A



B

Şekil 3.5. Kotiledon aşamasında (A) ve ilk gerçek yaprak (B) aşamasındaki bitkiler.



A



B

Şekil 3.6. Trifluralin uygulaması öncesi bitkilerin (A) ve bitki büyüme ucunun (B) durumu

3.2.5. Aksilar tomurcuklara trifluralin uygulaması

2011 yılı denemesinde aksilar tomurcuklara uygulama yapmak için, litresinde 480 g trifluralin etken madde içeren herbisistin %0.4 konsantrasyonu 3 ve 6 saat süre ile uygulanmıştır. Bu amaçla bitki tohumları (8 Mayıs) ısıtmasız cam sera ortamında, torf doldurulmuş plastik saksılara ekilmiş ve bu bitkiler daldırma işlemi için gerekli uzunluğa geldiklerinde, tepe tomurcukları kesilerek, aksilar tomurcukların gelişmesi beklenmiştir. Tepe tomurcuklarının kesilmesinden 5 gün sonra, aksilar tomurcukların gelişmeye başladığı evreden itibaren sadece tepe tomurcuğunun kesildiği yerin altındaki aksilar sürgün kalacak şekilde diğer yan sürgünler temizlenmiştir. Bu işleminden 5 gün sonra bitkilere trifluralin (%0.4 konsantrasyonu, 3 ve 6 saat süre ile) uygulaması yapılmıştır (Şekil 3.7).



A



B

Şekil 3.7. Trifluralin Uygulaması.

A. Aksilar tomurcuklara trifluralin uygulaması

B. Trifluralinin uygulamadan sonra dokulardan uzaklaştırılması

3.2.6. Seradaki bitkilerin tarlaya aktarılması

2010 (ön deneme) ve 2011 yılında yapılan her iki denemede de uygulamadan 10 gün sonra hayatta kalan fasulye bitkileri üzerinde etiketleme işlemleri yapılmış, ısıtmasız cam seradan alınarak, tarlaya aktarımları gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.8). Tarlaya aktarımı yapılan bitkilerin rutin kültürel bakım işlemleri (sulama, yabancı ot temizliği gibi) **Şalk ve ark. (2008)**'na göre yapılarak, bu ortamda bitkilerin gelişim seyri incelenmiştir.



Şekil 3.8. Bitkilerin seradan tarla koşullarına aktarıldıktan sonraki görünüşleri

3.2.7. Morfolojik gözlemler

2011 yılında yapılmış olan denemenin sonucu için, bitkilerde aşağıdaki morfolojik gözlemler yapılmıştır. Uygulamaların etkisini araştırmak amacıyla ölçüm sonuçları düzenli aralıklarla kaydedilmiştir.

Canlı bitki oranı (%): Uygulamadan 10 gün sonra, hayatta kalan bitki sayısı yüzde olarak hesaplanmıştır. Her uygulama için oranlar ayrı ayrı hesaplanmıştır. Ancak trifluralin uygulamasındaki bitkiler için bu oran daha sonraki evrelerde tekrar belirlenmiştir.

Bitki boyu (cm): Bitkinin ilk çiçeklenme döneminde cm olarak belirlenmiştir. Deneme alanındaki bitkilerden her uygulama için tesadüfen 10 bitki seçilerek, toprak yüzeyinden en uç noktasına kadar ölçüm yapılarak, bu ölçümlerin ortalaması alınmıştır.

Yaprak eni, boyu (cm): Fasulye çok fazla dallanma gösteren bir yapıya sahip olduğu için, yaprak örneklerini almada bir standart belirlenmemiştir. Bu amaçla ölçümler ilk

çiçeklenme döneminden itibaren, tesadüfen seçilen yaprak örnekleri kullanılarak yapılmıştır. Uygulama yapılan her bitki yaprağının eni ve boyu ölçülerek, bu ölçümlerin ortalaması veri olarak kullanılmıştır.

Yapraklarda tüylülük, kalınlaşma, buruşma durumu (var/yok): Denemede uygulamalardan sonra yaşamını devam ettiren bitkiler düzenli aralıklarla gözlenmiş ve morfolojik olarak yaprak durumları, tüylülük, kalınlaşma, buruşma, damarlanma vb. durumları ilk çiçeklenme döneminde veriler dikkate alınarak, var ya da yok şeklinde belirlenerek kaydedilmiştir.

Çiçeklenmeye gün sayısı (gün): Uygulamadan sonra yaşamını devam ettiren bitkilerde ilk çiçeklerin bitkide görülmeye başlandığı zamanki veriler dikkate alınmıştır (**Zeytin 1988**).

Meyve eni, boyu (cm): Bitkilerde ilk olgun meyvenin görüldüğü tarihte bakla boyu çiçek sapından itibaren ölçülerek, cm olarak ifade edilmiştir. Bitkideki meyve eni ise, baklaların orta kısmından ölçüm yapılarak, cm olarak ifade edilmiştir. Kontrol bitkileri için, deneme alanından tesadüfen 10 bitki seçilerek, bunların baklalarının ortalama uzunlukları alınmıştır.

Meyvedeki tohum sayısı (adet): Her uygulama sonucu poliploidi şüphesi taşıyan bitkilerden, meyvedeki tohum sayılarını tespit etmek amacıyla bitkiler üzerinde tohumların tamamen kuruması sağlanmış, tohumlar bitki üzerinde yeteri kadar kuruduktan sonrada bitkilerden bakla örnekleri alınarak, her bakladan çıkan tohum sayıları kaydedilerek, ortalama tohum sayıları bulunmuştur.

3.2.8. Stoma incelemeleri

Stoma incelemeleri için bitkilerin tümünde, üstten başlayarak, tesadüfi seçilmiş yaprak örneği alınarak yapılmıştır. Her yaprak örneği için 1 adet preparat hazırlanmış, bu preparatlarda stoma eni, boyu, birim alandaki stoma sayısı ve bekçi hücre başına kloroplast sayısı tespit edilmiştir. Ancak bazı bitkilerde uygulamalar sonucu karışık yaprak tipleri ortaya

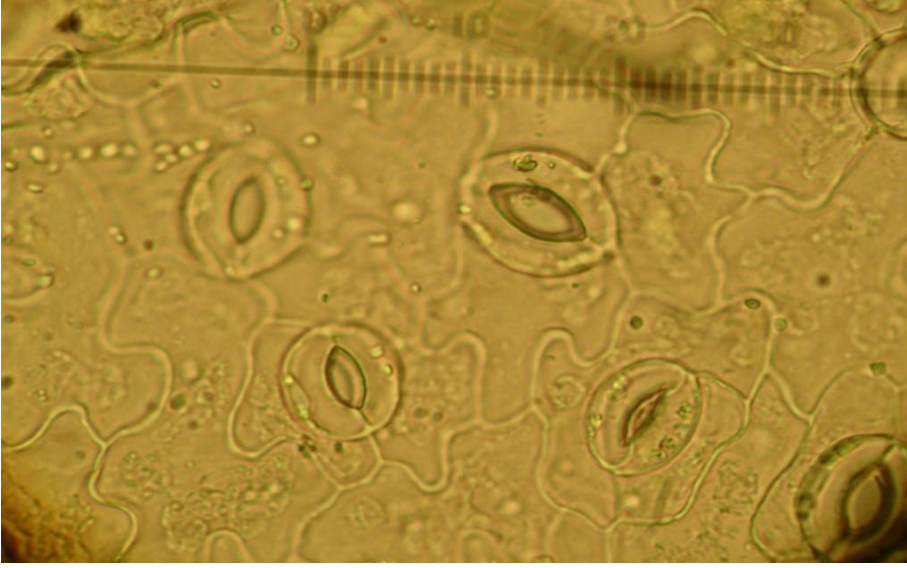
çıkması, bu bitkiler ayrıca değerlendirmeye alınmıştır. Bu tür bitkilerin teşhisi için bu bitkilerden birden fazla yaprak örneği alınarak, daha fazla sayıda preparat hazırlanmıştır.

Fasulye bitkisinde stoma incelemesi için yaprak örneklerinin alt epidermisi çok dikkatli bir biçimde soyulmaya çalışılsa bile, bazı bitkilerde olduğu gibi fasulyede de var olan yoğun damarlanma nedeniyle denenilen birçok metod işe yaramamış, her seferinde epidermis hücreleri bitkinin damarlanma bölgelerinden parçalanmıştır. Bu amaçla, ilk olarak, laboratuvara getirilen yaprak örneklerinin alt kısımlarına, şeffaf tırnak cilası sürülerek, tırnak cilasının 5 dakika kadar kurumaya beklenmiştir. Bu sürenin ardından, yine şeffaf selobant yaprağın tırnak cilası sürülmüş olan, kısmına yapıştırılarak, daha sonra yavaşça çıkarılmıştır. Çıkarılan selobant üzerinde yaprak altı epidermis dokusunun olduğu gibi çıktığı görülmüştür. Elde edilen bu yapı lam üzerine yerleştirilerek, mikroskopta gerekli incelemeler yapılmıştır (Şekil 3.9). Yalnız bu metod daha çok birim alandaki stoma sayısını tespit etmede daha etkili olmuştur. Stoma incelemelerinde, özellikle stoma hücrelerindeki kloroplastları net olarak görebilmek için, alınacak kesitin çok ince olmasına dikkat edilmiştir (**Qin ve Rotino 1995, Sarı ve ark. 1999**).

Stoma eni ve boyu (br): Bu amaçla, yukarıda sözü edilen yöntemle bitkinin alt epidermis dokusu örneği 1 damla musluk suyu damlatılmış lam üzerine diseksiyon amaçlı eğik iğne uçlu pens yardımıyla yerleştirilerek, stoma hücrelerinin eni ve boyu ölçülmüştür. 40 büyütme objektif ile 10 büyütme oküler mikrometre vasıtasıyla stoma çapı ve uzunluğu ölçülmüş, daha sonra ölçümlerden elde edilen değerler, birim olarak ifade edilmiştir (**Qin ve Rotino 1995, Sarı ve ark. 1999**).

Birim alandaki stoma sayısı (adet). Bitkinin yaprak örneklerinden alınan alt epidermis örneklerindeki stoma yoğunluğunu ölçmek için, dört farklı alanda kaç adet stoma bulunduğu, 40 büyütme objektif ile 10 büyütme oküler yardımıyla sayılarak, bu sayıların ortalaması alınmıştır (**Qin ve Rotino 1995, Sarı ve ark. 1999**).

Stoma (bekçi) hücrelerindeki kloroplast sayısı (adet): Stoma eni ve boyunun ölçümü yapılan preparatlarda lam üzerine musluk suyu yerine %1'lik AgNO₃ çözeltisinden 1 damla damlatılarak, stoma hücrelerindeki kloroplastlar sayılmıştır (**Qin ve Rotino 1995, Sarı ve ark. 1999**). Her bitki için, 10 adet stoma sayılarak, bu stoma hücrelerinin sahip olduğu kloroplast sayıları bulunmuş ve bu ölçümlerin ortalaması alınmıştır.



Şekil 3.9. 40x10 objektif ve oküler ile stoma hücrelerinin görünümü



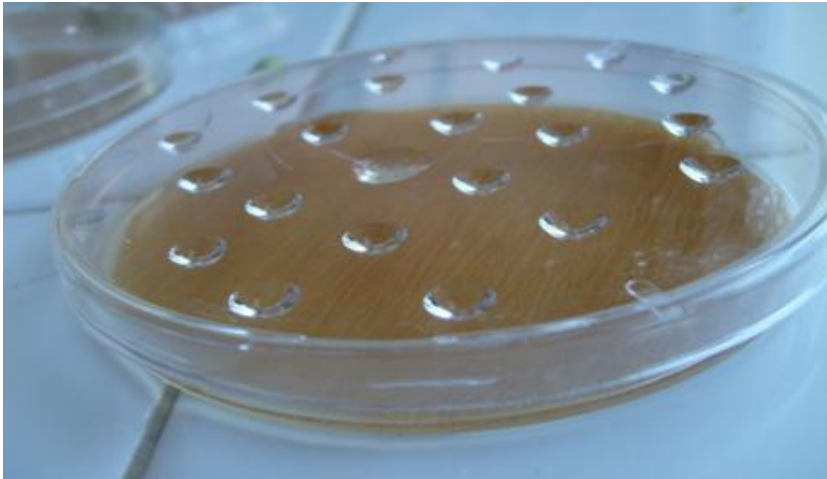
Şekil 3.10. Kontrol bitkilerine ait asetocarmin ile farklı renklerde boyanmış polenler.

3.2.9. Polen canlılığı (%)

Bitkiler çiçeklenme dönemine geldiklerinde ilk çiçeklerine bu bitkilerden tohum elde edebilmek amacıyla dokunulmamıştır. Bu amaçla polen morfolojisi ve canlılıklarını incelemeye haziran ayının ikinci haftasında başlanmıştır. Polen canlılığı aseto carmin kullanılarak belirlenmiştir (Şekil 3.10). Canlılığı belirlemeye yönelik olarak, 500 polen tanesi sayılmış, kırmızı renge boyanan polen taneleri canlı, boyanmayanlar ise cansız kabul edilmiştir. Sayım işleminden sonra canlılık oranları yüzde olarak hesaplanmıştır (**Porch ve Jahn 2001**).

3.2.10. *In vitro* polen çimlenme oranı (%)

In vitro ortamda polenlerin çimlendirmesi amacıyla Brewbaker ve Kwack's çimlendirme ortamı kullanılmıştır. Çimlendirmede *in vitro* asılı damla tekniğinden faydalanılmıştır (Bal ve Abak 2005). Ancak sükröz oranını belirlemek amacıyla, %15, ve %30 konsantrasyonları denenmiştir. Bu amaçla kullanılacak besi ortamları 100 ml olarak hazırlanmış, her iki konsantrasyondaki sıvı besi yeri hem steril hem de steril edilmeden denenmiştir. Besi ortamında 0.01 g Borik Asit, 0.03 g Kalsiyum Nitrat, 0.02 g Magnezyum Sülfat, 0.01 g Potasyum Nitrat kullanılarak, %15 ve %20 sükröz konsantrasyonundaki besi ortamları polenleri çimlendirmede kullanılmıştır. Hazırlanan çözeltiler eşit oranlarda deney tüplerine paylaştırılarak, bu tüplerin ağzı pamukla kapatılıp, 121 C⁰ de 1 atmosfer basınçta 15 dakika otoklavda steril edilmiştir. Hazırlanan besi ortamlarına sabah ve akşam, her uygulamada morfolojik olarak farklılık arz eden bitkilerden açmamış 4 çiçek tomurcuğu ıslak kurutma kağıdı yerleştirilmiş petri kaplarına konularak, laboratuvara getirilmiş ve bir iğne yardımıyla çiçek tomurcuklarından anterler alınmıştır. Besi ortamları pastör pipeti yardımıyla plastik steril petri kaplarının üst kapağına birer damla olacak şekilde bırakılmıştır. Bu şekildeki besi ortamlarına bitkilerden alınan anter örnekleri 3'erli gruplar halinde bırakılmıştır. Ekimin ardından petri kutuları koyu bir zemin üzerine konulmuş ve iki adet iğne yardımıyla, ortama bırakılan anterler patlatılarak, polenlerin ortama dağılması sağlanmıştır. Petri kaplarının alt kısmı ıslak kurutma kağıdı ile kaplanarak, ortamın nemi sağlanmaya çalışılmıştır (Şekil 3.11). Ekimden 2-3 saat sonra yapılan gözlemlerde çimlenme oranları belirlenmiştir (Brewbaker ve Kwack 1963).



Şekil. 3.11 Asılı damlada *In vitro* polen çimlendirme

4.ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Kotiledon Aşamasındaki Bitkilere Kolhisin Uygulaması

2010 yılındaki ön denemede kotiledon aşamasındaki bitkilere en başarılı kolhisin uygulaması %0.05 kolhisin konsantrasyonunda 3 saat süre ile alınmıştır. Uygulanan %0.1 kolhisin dozunda ise hayatta kalıp, tarla koşullarında gelişimini devam ettiren bitki sayısı sadece 4 adet olmuştur (Çizelge 4.1).Yaşamını devam ettiren %0.1 kolhisin dozunun 5 saat süre ile uygulandığı bu bitkilerde yaprak morfolojisi ve stoma incelemeleri bakımından kontrol bitkileri ile aralarında belirgin bir farklılık tespit edilememiştir. Aynı uygulama, %0.05 kolhisin dozu ile yapıldığında ise hayatta kalan bitki sayıları artmış, uygulama yapılan 30 bitkiden 15 tanesi yaşamını devam ettirmiştir. Yaşamını devam ettirmiş olan bu 15 bitkiden 8 tanesinde kontrol bitkilerine göre bazı farklılıklar görülmüştür. Gözlemlenen bu farklılıklar tam anlamıyla tespit edilmediği için, bu çalışmada daha çok 2011 denemesinden elde edilen veriler değerlendirilmeye alınmıştır.

2011 yılındaki denemede ise kotiledon aşamasındaki bitkilere %0.05 ve %0.1 kolhisin dozları iki farklı sürede uygulanmıştır. En başarılı uygulama sayılabilecek kolhisin dozu %0.1 ile 6 saatlik uygulamada gerçekleşmiştir. Bunun yanı sıra %0.1 kolhisin dozunda 3 saat süre ile bitkilere yapılan uygulamadaki başarı %0.05 konsantrasyonundaki iki farklı uygulama süresinden daha yüksek olmuştur. Uygulamanın ardından, seradan tarlaya aktarılan bitkilerde iki hafta sonra yapılan gözlemler sonucu morfolojik olarak %0.05 kolhisin dozunda 6 saatlik uygulama yapılan bitkilerdeki farklılıklar, aynı dozda 3 saatlik uygulamadakilerden daha fazla olmuştur (Çizelge 4.2). Ancak %0.05 kolhisin dozunun uygulandığı bitkiler vejetatif olarak geliştikçe, bahsedilen morfolojik farklılıklar daha çok alt yapraklarla sınırlı kalmış ve bitkiler daha sonraki evrelerde kontrol bitkilerinin görünümüne benzer bir gelişim seyri izlemişlerdir.

2011 (22 Mayıs)'de çimlendirilmiş 5 günlük tohumlara kolhisin uygulamasının ardından hayatta kalıp, gelişimini devam ettiren bitkilerde %0.02 ve %0.005 dozları arasında bir farklılık gözlenmemiştir. Uygulama süreleri arasında da aynı yargıya varmak mümkün olmuştur. Böylelikle saf suda çimlendirilmeye bırakılıp, 5. günde iken, kolhisinin iki farklı dozunu iki farklı sürede uygulama yoluyla elde edilen bitkiler ile kontrol bitkileri arasında morfolojik olarak bir fark tespit edilmemiştir. Uygulamanın ardından saf suda 2,5 saat süresinde bekletilerek, kolhisini dokulardan uzaklaştırmayı hedefleyen yaklaşım, kök uçlarına zarar vermiş, bu nedenle bitkiler gelişimlerine devam edebilmek için yan kök oluşturma yoluna gitmişlerdir. Ayrıca uygulama sırasında kolhisinin dokulara ulaşmasını kolaylaştırmak

amacıyla tohum kabukları yırtılarak, tek kotiledonu koparılan bitkiler ile tohum kabukları yırtılarak, kotiledonları koparılmayan bitkiler arasında bir farklılık gözlenmemiştir. Ancak uygulama sırasında ilk gerçek yaprak sürgünleri ile sarılmış halde bulunan büyüme ucuna kolhisinin yeterince iyi temas edemediği düşünülebilir. Bu çalışmada kullanılan ve bir tabletinde 0.5 mg kolhisin içeren ilacın kullanım olarak bir sakınca yaratmadığı gözlemlerimiz yoluyla kanıtlanmıştır.

Çizelge 4.1. 2010 yılı apikal meristeme kolhisin uygulamasından sonra hayatta kalan bitki sayıları

Kolhisin Dozları	Uygulama Yapılan Bitki Sayısı	Uygulamadan Sonra Yaşayan Bitki Sayısı
%0	30	30
%0,05	30	15
%0,1	30	4

Çizelge 4.2. 2011 yılı denemesindeki bitki sayıları ile ilgili veriler.

Kolhisin Dozları	Uygulama süresi	Uygulama yapılan toplam bitki sayısı (adet)	Uygulamadan 10 gün sonra yaşayan bitki sayısı (adet)	Morfolojik olarak farklı olan bitki sayısı (adet)	Morfolojik olarak farklı olan bitki oranı (%)
%0.0	3 saat	30	30	0	0
	6 saat	30	30	0	0
%0.05	3 saat	30	30	0	0
	6 saat	30	30	0	0
%0.1	3 saat	30	30	28	%93,3
	6 saat	30	30	29	%97

4.2. Aksilar Tomurcuklara Kolhisin Uygulaması

2011 yılındaki denemedenin ardından kolhisinin tüm dozlarında bitkilerin aksilar tomurcuklarının zarar görerek, tamamen kuruduğu gözlenmiştir (Şekil 4.1).



A



B

Şekil 4.1. Aksilar tomurcuklara kolhisin uygulaması sonrası. **A.** Uygulamadan hemen sonra tomurcukların durumu **B.** Uygulamadan 10 gün sonra tomurcukların durumu.

4.3. Kotiledon Aşamasındaki Bitkilere Trifluralin Uygulaması

2010 ve 2011 denemelerinden elde edilen verilere göre uygulanan hiçbir trifluralin dozu uygulama yapılan sürelerin hiçbirinde otopoliploidiyi teşvik etmede yeterli görülmemiştir. (Çizelge 4.3 ve Çizelge 4.4). Yapılan ölçüm ve gözlemler, uyguladığımız trifluralin dozlarının bitkiler için öldürücü doz olduğunu göstermiştir. Bunun yanı sıra ticari yetiştirme ortamlarından alınıp, tarla koşullarına bitkilerin aktarılması sırasında bitkilerin yaşadıkları çevresel stres, trifluralin uygulamasında bitkilerin yaşama şanslarını büyük oranda azaltmıştır. Ancak son bahsedilen neden kolhisin dozu uygulanan bitkiler için de geçerli olduğu için, yaşamını devam ettiren bitki sayılarındaki farklılığın, uygulamada kullanılan trifluralin dozlarından kaynaklandığı söylenebilir. Bunun yanı sıra trifluralin uygulanan bazı bitkilerin tepe tomurcukları ölmesine rağmen, yaşamlarının bundan sonraki kısımlarını yan sürgün oluşturarak devam ettirdikleri gözlenmiştir. Genel olarak kolhisin ile kıyaslandığında ise trifluralinin kolhisin kadar etkili olmadığı belirlenmiştir.

2010 ön denemesinde kotiledon aşamasındaki bitkilerin apikal meristemlerine uygulama yapmak amacıyla, %5 ve %10 trifluralin etken maddeli herbisistin sulu çözeltisine maruz bırakılan bitkilerin büyük bir kısmının yaşamını devam ettiremediği gözlenmiştir. Söz konusu bitkiler büyüme uçları öldüğü halde, durmadan gövdelerini kalınlaştırmışlar, bu şekilde hayatta kalmaya çalışmışlardır.

2011 denemesinde kotiledon aşamasında trifluralin dozlarına maruz kalan bitkilerin büyük çoğunluğunun apikal meristemlerinin zarar gördüğü tespit edilmiştir. Uygulamadan 10 gün sonra yapılan gözlemler sonucu uygulama yapılan bitkilerden tamamının yaşadığı gözlenmiş (Şekil 4.2) ancak zarar gören apikal meristemlerinden dolayı bitkilerin çoğunun yaşamını devam ettiremediği ya da yaşamını devam ettirse bile ilk gerçek yapraklarını kısa sürede dökerek, sadece gövdelerini kalınlaştırdıkları görülmüştür. Bunun yanısıra yaşamını devam ettirmek için, bazı bitkilerin apikal meristemin altındaki koltuklardan yan sürgün geliştiren bitkiler ile apikal meristemleri zarar görmeyen bitkilerin varlığı da tespit edilmiştir. Hayatta kalmayı başaran bitkilerin gelişimleri kontrol bitkileri ile kolhisin dozlarının uygulandığı bitkilerin çok gerisinde kalmış, bu bitkilerin çiçeklenmeleri bile 1 ay sonrayı bulmuştur. Diğer bitkilerle çiçeklenme zamanları ise farklı zamanlara rastladığı için, sıcaklık gibi faktöre fazlasıyla maruz kalmışlar bu nedenle de bakla tutma oranları azalmış, ve vejetatif gelişimleri oldukça yavaşlamıştır. Bu yüzden, yanıltıcı bilgiler vereceği düşüncesiyle, bu bitkilerin sitolojik ve morfolojik gözlemleri yaptığımız çalışmanın sonuçlarında veri olarak kullanılmamıştır.

Çizelge 4.3. 2011 yılında apikal meristeme trifluralin uygulamasından 10 gün sonra hayatta kalan bitki sayıları

Trifluralin Dozları	Uygulama süresi	Uygulama yapılan toplam bitki sayısı (adet)	Uygulamadan 10 gün sonra yaşayan bitki sayısı (adet)
%0.0	3 saat	30	30
	6 saat	30	30
%5	3 saat	30	30*
	6 saat	30	30*
%1	3 saat	30	30*
	6 saat	30	30*

*Bitkilerin tamamı daha sonraki süreçlerde hayatlarını devam ettirememişlerdir.

Çizelge 4.4. 2010 yılındaki denemede bitki sayıları verileri

Trifluralin Dozları	Uygulama yapılan toplam bitki sayısı (adet)	Uygulamadan sonra yaşayan bitki sayısı (adet)	Morfolojisi değişen bitki sayısı (adet)	Morfolojisi değişen bitki oranı (%)
%0.0	30	30	0	0
%5	30	6	2	33,3
%10	30	3	0	0



A B
Şekil 4.2. Kotiledon aşamasındaki bitkilere trifluralin uygulaması
A. Uygulama öncesi B. Uygulama sonrası

4.4. Aksilar Tomurcuklara Trifluralin Uygulaması

2011 yılı denemesinde litrede 480 g trifluralin içeren herbisistin %0.4 konsantrasyonunun aksilar tomurcuklara uygulamasının ardından bitkilerin sürgünlerinin zarar gördüğü gözlenmiştir. Uygulamadan 10 gün sonra yapılan gözlemlerde ise bitkilerin uygulama yapılan bölgelerindeki aksilar tomurcukların tamamen kurdukları tespit edilmiştir.

4.5. Morfolojik Gözlemler

4.5.1. Canlı bitki oranı (%)

2010 yılındaki denemede Kolhisin ile trifluralin uygulamaları arasında büyük farklılıklar olmuş, en fazla hayatta kalan bitki sayıları kolhisinin %0.05 dozuyla kaydedilmiştir. Bu yılda gerçekleştirilen denemede %0.1 kolhisin dozunda hayatta kalan bitki sayıları daha az olmuştur.

2011 yılındaki denemede apikal meristemlere kolhisin uygulamasından sonra hayatta kalma oranları, %0.1 ve %0.05 kolhisin dozlarının her ikisinde de aynı olmuştur.

4.5.2. Bitki boyu (cm)

2011 yılında %0.1 kolhisin dozunun uygulandığı bitkilerin boyları, kontrol bitkilerine göre başlangıçta daha yavaş bir seyir izlemiş ancak %0.05 kolhisin dozunun, 3 saat ve 6 saat süre ile apikal meristemlerine uygulama yapılan bitkilerin gelişmelerinde çok fazla bir gerilemeye neden olmadığı gözlenmemiştir. Ancak, trifluralin uygulaması yapılan bitkilerin gelişmesinde anormal olarak değerlendirilebilecek bir gerileme kaydedilmiş ve bu bitkilerin hayatta kalanlarının boyları 10 cm'yi geçmemiştir. Trifluralin uygulaması yapılan bitkilerin bazılarında apikal meristemlerin ciddi zarar gördüğü ve bunun sonucu olarak bitkinin, apikal meristemin altında kalan kısmından tekrar bir sürgün geliştirdiği gözlenmiştir. Dolayısıyla bu bitkilerin vejetatif gelişimleri diğerlerinin çok gerisinde kalmıştır. Ancak %1 trifluralinin 6 saat süre ile uygulandığı bitkilerden hayatta kalan tek bir tanesinde bitki boyu ve gelişmesi %0.1 kolhisin dozunun uygulandığı bitkiler ile benzerlik göstermektedir.

Denemede kolhisinin %0.1 dozu ile otoploiploidinin uyartılması amacıyla yönelik iki farklı süre kullanılarak yapılan uygulamadan gelişen bitkilerin boyları, %0.05 kolhisin dozunun uygulandığı bitkilerin boylarından daha kısa olmuştur (Çizelge 4.5). Diğer kontrol bitkilerine kıyasla bu bitkilerin gelişmeleri daha yayvan bir görünüm kazanmıştır. Kontrol bitkileri daha çok toplu bir gelişme göstermelerine karşın, %0.1 kolhisin dozu uygulanan bitkiler daha dağınık bir gelişme göstermişlerdir.

Çizelge 4.5. Apikal meristemlere kolhisin uygulaması sonucu bazı özelliklere ait elde edilen ortalama değerler.

	Kolhisin dozları ve uygulama süreleri				Kontrol
	%0.1		%0.05		
	Süreler				
	3 saat	6 saat	3 saat	6 saat	
Bitki Boyu	32.21	25.83	66.20	54.87	51.35
Meyve Eni	1.87	1.88	1.78	1.73	1.60
Meyve Boyu	12.62	12.95	12.94	13.17	12.80
Yaprak eni	10.24	10.79	10.30	10.60	10.41
Yaprak boyu	11.96	12.26	15.03	15.15	13.92
Meyvedeki tohum sayısı	4.71	4.25	5.68	5.25	5.45

4.5.3. Yaprak eni, boyu (cm)

2011 yılındaki denemeden elde edilen bitkilerde yapılan ölçümler sonucu, %0.1 Kolhisin uygulanan bitkilerin yaprak enlerinin, kontrol bitkilerine kıyasla daha geniş olduğu görülmüş ve değerler ölçülerek cm olarak ifade edilmiştir (Çizelge 4.5). Yaprak eni en büyük değeri 13.5 cm olarak %0.1 kolhisin dozunun 3 ve 6 saatlik uygulama süresinde ölçülmüştür. En büyük yaprak boyu ise, 17.5 cm olarak ölçülmüş ve bu değere denemede yer alan kontrol bitkilerinde ve %0.05 kolhisin uygulanan bitkilerde rastlanılmıştır. Elde edilen bulgulara göre, kolhisinin uygulama dozu arttıkça, yaprak boyutunun küçüldüğü, buna karşın yaprak eni ile boyu arasındaki farkın azaldığı görülmüştür. %0.1 kolhisin dozu bitkinin apikal meristemlerine 6 saat süre ile uygulandığında bitkinin eni ile boyu arasındaki farkın, 3 saatlik uygulama süresinden daha az olduğu kaydedilmiştir.

4.5.6. Yapraklarda tüylülük, kalınlaşma, buruşma durumu (var/yok)

Kotiledon aşamasındaki bitkilerin apikal meristemlerine kolhisin ve trifluralin uygulamasının bitkinin ilk ve ikinci gerçek yapraklarında buruşmaya neden olduğu gözlenmiştir. Ancak bitkilerin seradan tarla koşullarına aktarılmasının ardından, vejetatif gelişme ile birlikte bazı bitkilerdeki buruşuk yaprak görünümü sadece alt yapraklarla sınırlı kalmış ya da aynı bitki üzerinde hem buruşuk yaprak tipini hem de normal yaprak tipini barındırmıştır. Özellikle %0.05 kolhisin dozunun uygulandığı bitkilerde, bitkiler tarla koşullarına aktratıldıktan iki hafta sonra yapılan incelemelerde, 6 saatlik uygulama yapılan

bitkilerin 30 tanesinden 4 tanesinin tamamı buruşuk yapraklı iken, 13 tanesinde ise bitkinin belirli bir kısmının buruşuk yaprak görünümünde olduğu gözlenmiştir. Buna karşın %0.05 kolhisin dozunu 3 saatlik süre ile uygulamak daha az sayıda buruşuk yaprak görünümünde bitki oluşumuna neden olmuş ve bu durum tüm yaprakları buruşuk olan bitki sayısının 3 olduğu, normal ve buruşuk görünümlü yaprak barındıran bitki sayısının ise, 2 olduğu tespit edilmiştir. kolhisinin %0.1 dozunun 3 saat süresince bitkinin apikal meristemlerine uygulanmasının ardından, bitkilerin tamamına yakını buruşuk görünümlü olmuş, sadece iki bitkide buruşuk olmayan, normal yaprak görünümü tespit edilmiştir (Şekil 4.3). Aynı kolhisin dozunu 6 süre ile bitkinin apikal meristemlerine uygulama ise 30 bitkiden 29'unda buruşuk görünümlü yaprak tipine neden olmuştur. Trifluralin uygulamasından sonra hayatta kalan bitkilerin bazıları ikinci gerçek yapraklarını apikal meristemin altındaki gövde kısmından tekrar oluşturmuş ve bu şekildeki yaprakların ise normal bir görünümde olduğu gözlenmiştir. Ancak trifluralinin %1 dozunu 6 saat süre ile uygulamak suretiyle elde edilen ve gelişimini devam ettiren tek bitkinin yapraklarının tümünün buruşuk görünümde olduğu belirlenmiştir. Her iki uygulamanın ardından da yapraklarda gözlenen buruşukluk durumu yaprak kalınlığı ile uyumluluk göstermiş ve buruşuk görünümlü yaprağa sahip olan bitkilerin tümünde yapraklar kontrol bitkilerine kıyasla daha fazla kalınlaşma göstermiştir. Buruşuk görünümlü yaprakların alt kısımlarında parmaksı çıkıntılar oluşmuş ve bu bitkilerde yaprak damarlanmasının belirginleştiği tespit edilmiştir. Ayrıca bu bitkilerin stoma incelemeleri sırasında, mikroskop görüntülerinde tüy hücrelerinin kontrol bitkilerine göre daha büyük olduğu gözlenmiştir.



A



B

Şekil 4.3. %0.1 kolhisin dozunun uygulandığı (A) ve kontrol (B) bitkisi

4.5.7. Çiçeklenmeye gün sayısı (gün)

Tarla koşullarında kontrol bitkilerinin 40-42 günde çiçeklenme dönemine girdikleri kaydedilmiştir. Uygulama yapılan bitkiler ile kontrol bitkileri arasında çiçeklenme dönemine giriş zamanları arasında büyük bir farklılık gözlenmemiştir. Ancak, %0.1 kolhisin dozunun 3 saat ve 6 saat süre ile uygulandığı bitkilerin 4'er tanesinde çiçeklenme 2 haftaya kadar çıkabilen bir gecikme göstermiştir. Çiçeklenme dönemi kontrol bitkilerinde 35-40 gün sürerken, uygulama yapılan bitkilerde bu süre iki haftaya kadar uzamaktadır. Araştırma sırasında yapılan gözlemlerde kontrol bitkileri ile %0.05 kolhisin dozu uygulanan bitkilerin çiçeklenme dönemleri ve vejetatif gelişme süreleri arasında bir farklılık tespit edilememiştir. 17 Temmuz 2011 tarihinde yapılan gözlemlerde kontrol bitkileri ve %0.05 kolhisin dozunun uygulandığı bitkilerde çiçek oluşumun durduğu ve baklaların tohum bağlamaya başladığı gözlenmiştir. Bu durumun aksine %0.1 kolhisin dozunun uygulandığı bitkilerden poliploid olduğu şüpheli olanlarda çiçek oluşumun devam ettiği ve vejetatif kısımlarının, kontrol bitkileri ile %0.05 kolhisin dozu uygulanan bitkilerdekinden daha yeşil olduğu gözlenmiştir. Yapılan araştırmaya göre %0.1 kolhisin dozunun 3 ve 6 saat süre ile fasulye bitkilerine uygulanması sonucu bitkilerin kontrol bitkilerine göre daha geç çiçeklenmeye başladığı, bununla birlikte çiçeklenmenin kontrol bitkilerinden 1-2 haftaya kadar daha uzun sürdüğü tespit edilmiştir. Çiçeklenme yoğunlukları da kolhisin uygulamasına maruz kalan bitkiler ile kontrol bitkileri arasında değişiklik göstermiştir. Çiçekler %0.1 kolhisin uygulanan bitkilerde diğerlerine göre daha büyük olmuştur (Şekil 4.4).



Şekil 4.4.%0.1 kolhisinin 6 saat süre ile uygulandığı bitki ile kontrol bitkisinin çiçekleri.

4.5.8. Meyve eni, boyu (cm)

Araştırma sonuçlarına göre hiçbir uygulamada meyve eni boyu belirgin olarak birbirinden farklı bulunmamıştır (Çizelge 4.5). Kolhisin dozu arttıkça meyve eninin bir miktar artış gösterdiği tespit edilmiştir. Meyve eninin en yüksek değeri 1.91 cm ile %0.1 kolhisinin 3 saatlik uygulaması ile ölçülmüş, meyve boyunun en yüksek değeri ise, 13.17 cm ile %0.05 kolhisin dozunun 6 saat süresince uygulandığı bitkilerin meyvelerinde ölçülmüştür. Uygulamaların meyve eni ve boyutunda fasulyenin ekonomik olarak değerini arttıracak herhangi bir olumlu özellik sağlamadığı gözlenmiştir (Şekil 4.5). Araştırmada bakla eni ve boyunda belirgin farklılıklar tespit edilememesine rağmen, bitkinin sahip olduğu bakla sayılarında farklılıklar kaydedilmiştir. Özellikle %0.1 kolhisin dozunun uygulandığı bitkilerde bitki başına düşen bakla sayıları da diğer bitkilere kıyasla azalmıştır.



Şekil 4.5. Fasulye bitkisinde farklı kolhisin ve trifluralin dozlarının uygulanmasından sonra elde edilen meyvelerin görünümü.

4.5.9. Meyvedeki tohum sayısı (adet)

Uygulamadan sonra tohum oluşturan bitkilerin baklalarındaki tohumların ortalama değerlerine bakıldığında %0.1 kolhisin dozlarının farklı sürelerde uygulanmasından gelişen bitkilerin meyvelerindeki tohum sayıları arasında belirgin bir farklılık olmadığı tespit edilmiştir. Bununla birlikte %0.05 kolhisin dozu ile kontrol bitkilerinin meyvelerindeki tohum sayıları benzerlik göstermiştir (Çizelge 4.5). %0.1 kolhisin dozu uygulaması yapılan bitkilerin meyvelerinde sayılan tohum sayıları çoğunlukla 4 olarak ölçülürken, bu sayının %0.05 kolhisin dozunun uygulandığı bitkiler ile kontrol bitkilerinde çoğunlukla 6 adet tohum olduğu görülmüştür.

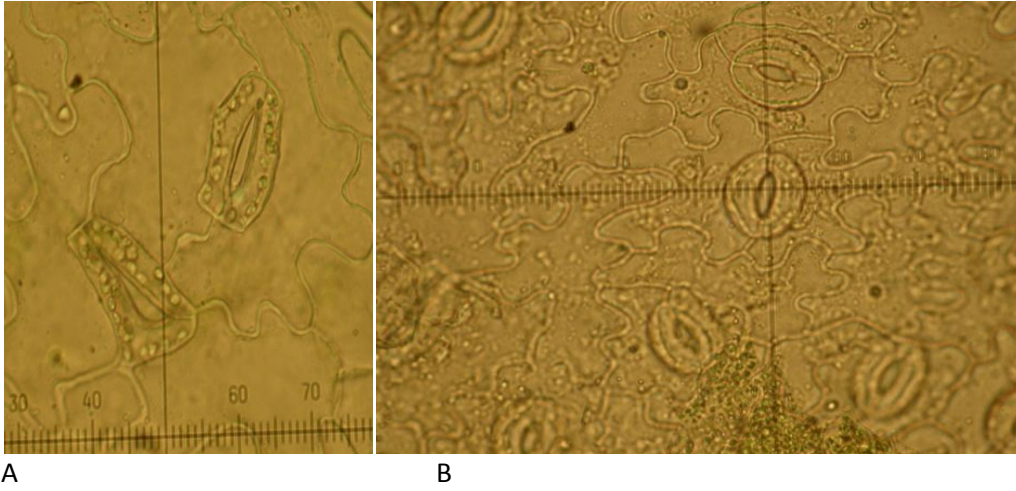
4.6. Stoma İncelemeleri

4.6.1 Stoma eni boyu (br)

Denemede yer alan ve poliploidi olduğu şüpheli olan tüm bitkilerin stomalarında yapılan gözlemler sonucunda, özellikle buruşuk yaprak görünümüne sahip bitkilerin stomaları kontrol bitkilerinkinden belirgin olarak büyüklük göstermişlerdir. Bu şekilde kontrol bitkilerinden belirgin olarak ayredilen bitkilerde stoma eni boyu büyürken aynı zamanda stomaların morfolojik yapısında da anormallikler gözlenmiştir (Şekil 4.6). Kontrol bitki stomalarının ise daha düzgün şekilli, eni ve boyu arasında çok fazla değişiklik olmadığı gözlenmiştir.

Stoma eni ve boyunun %0.1 kolhisin dozunun 3 ve 6 saat süre ile uygulandığı bitkilerde en büyük değerlerini aldığı kaydedilmiştir. %0.05 kolhisin dozunun 3 ve 6 saat süre ile uygulandığı bitkilerde ise stoma eni ve boyunun kontrol bitkilerinkine benzer değerler aldıkları tespit edilmiştir. Ancak %0.05 kolhisin dozunun uygulandığı bazı bitkilerin yapraklarının buruşuk görümlü ve diğer bölgelere kıyasla daha kalın, koyu yeşil yapraklı bir yapıda görülmesi nedeniyle bitkilerin bu bölgelerinden yaprak örnekleri alınarak bunlarda stoma incelemeleri yapılmıştır. Bu incelemelerin sonucu olarak, bu yaprak örneklerinden ölçülen stoma en ve boy değerleri %0.1 kolhisin dozunun uygulandığı bitkilerde ölçülen

stoma en ve boy değerleri ile benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir (Çizelge 4.6). Stoma eninin en büyük değeri, 14.7 br ile %0.1 kolhisin dozunun 6 saat uygulandığı bitkilerde ölçülmüştür. Stoma boyutunun en büyük değerinin ise, yine %0.1 kolhisin dozunun 6 saat uygulandığı bitkilerde 25.8 br olarak ölçülmüştür. Uygulama yapılan bitkilerde ölçülen en düşük stoma boyu, buruşuk ve daha kalın yaprak görünümüne sahip olmasına rağmen, 12.5 br ile %0.1 kolhisin dozunun 3 saat süre ile uygulandığı bitkilerde görülmüş, stoma eninin en küçük değeri ise %0.1 kolhisin dozunun 6 saat süre ile uygulandığı bitkilerde 8.9 br olarak ölçülmüştür.



Şekil 4.6. Stoma (bekçi) hücrelerinin 10x40 büyütmeli oküler ve objektiften görünümü.
A. %0.1 kolhisin uygulanmış bitkilerin stoma hücreleri. B. Kontrol bitkilerinin stoma hücreleri.

4.6.2 Birim alandaki stoma sayısı (adet)

Birim alandaki stoma sayılarını tespit etmek amacıyla mikroskopta 4 farklı alanda sayımlar gerçekleştirilerek yapılmıştır. Bu sayımların ortalaması sonucunda, %0.1 kolhisin dozu uygulanmış bitkilerdeki yaprak örneklerinden elde edilen verilere göre, bu bitkilerdeki birim alanda sayılan stoma sayısı diğer bitkilere göre daha az olmuştur (Çizelge 4.6). Buna rağmen, kontrol bitkileri ile %0.05 kolhisin dozunun uygulandığı bitkilerin birim alandaki stoma sayıları arasında bir farklılık bulunmamıştır. Araştırmalarımız sonucu stoma büyüklükleri arttıkça, birim alana düşen stoma sayısının azaldığı gözlenmiştir.

4.6.3. Stoma (bekçi) hücrelerindeki kloroplast sayısı (adet)

Yapılan stoma incelemelerinde bekçi hücrelerindeki kloroplast sayıları çok fazla değişiklik göstermiştir. Kloroplast sayılarının genel olarak stoma büyüklüğü ile beraber arttığı tespit edilmiştir. Denemede %0.1 kolhisin dozunun uygulandığı bitkilerde iki uygulama süresinde de bekçi hücrelerinde sayılan kloroplast sayılarında da değişiklik tespit edilmiştir. En fazla kloroplasta sahip stoma hücresine %0.1 kolhisin dozunun 6 saat süre ile uygulandığı bitkilerde rastlanmış, ve bu bitkide kloroplast sayısı 25 olarak sayılmıştır. %0.05 kolhisinin 3 ve 6 saat uygulandığı bitkilerde yapılan kloroplast sayımlarında ise, kontrol bitkilerinininkine yakın değerlere sahip oldukları görülmüştür (Çizelge 4.6). %0.05 kolhisin dozunun uygulandığı ve buruşuk yaprak örneklerinden elde edilen verilerde en fazla kloroplast sayısı ise 18 olarak, 3 saatlik uygulamada sayılmıştır.

Çizelge 4.6. Kolhisin dozlarının uygulanmasından sonra yapılan stoma incelemeleri sonucu elde edilen veriler.

	Kolhisin Dozları				kontrol
	%0.1		%0.05		
	Süreler				
	3 saat	6 saat	3 saat	6 saat	
Stoma Eni (br)	11.21	10.50	10.90*	9.80*	7.83
Stoma Boyu (br)	17.38	16.70	14.20*	16.20*	10.00
Kloroplast Sayısı (adet)	17.09	17.04	13.80*	15.70*	8.86
Birim Alandaki Stoma Sayısı (adet)	14.27	15.72	24.25*	26.75*	38.25

*Buruşuk yaprak örneklerinden elde edilen değerler.

4.7. Polen Canlılığı (%)

Araştırma sonuçlarına göre, asetocarmin ile polen canlılığını tespit etmek amacıyla, %0.1 ve %0.05 kolhisin dozunun uygulandığı bitkilerdeki çiçek tomurcuklarından elde edilen polenlerin canlılık oranları ve morfolojileri büyük bir değişkenlik göstermiştir. Kolhisinin uygulama dozu ve uygulama süresi arttıkça boyanan polen sayısı azalmış, bunun yanı sıra, polen morfolojilerindeki farklılıkta belirginleşmiştir (Şekil 4.7). Kontrol bitkilerinin polenleri ile %0.05 kolhisin dozunun polenleri arasında yapısal bir farklılık göze çarpmamıştır. Ancak %0.05 kolhisin dozunun uygulandığı bitkilerin bazı kısımlarında buruşuk yaprak görünümünü korudukları gözlenmiş, ve bu kısımlardan alınan çiçek tomurcuklarındaki polen canlılık

oranları %30.4 bulunmuş ve polenlerin morfolojileri de %0.1 kolhisin dozu uygulanan bitkilerin polen morfolojileri ile benzerlik göstermişlerdir. Araştırmadan elde edilen verilere göre %0.1 kolhisin dozunun 6 saat süre uygulandığı bitkilerde en yüksek canlılık oranı, %64.2 bulunmasına rağmen, bu uygulamadaki diğer bitkiler için canlılık oranlarının genelde %50'nin altında olduğu tespit edilmiştir. Bu bitkilerdeki polen morfolojilerinin kontrol bitkisinin polen morfolojilerinden gözle görülür bir şekilde farklı olduğu tespit edilmiştir. Bu bitkilerde polenler genelde 4 porlu, bazen 5 porlu, kare şeklinde bir görünüme sahipken, kontrol bitkilerinde polenler genelde 3 porlu, üçgen biçimde görünmektedirler (Şekil 4.8). Uygulama yapılmış, gerek stoma incelemeleri ile gerekse kontrol bitkilerinden ayıredilen morfolojik özelliklerinden dolayı şüphe uyandıran bu bitkilerde polen çeperlerinin, kontrol bitkilerinininkine nazaran daha kalın bir yapıda oldukları gözlenmiştir.

4.8. *In vitro* Polen Çimlenme Oranı (%)

2011 (28 Haziran)'de yapılan *in vitro* polen çimlendirme sonuçlarına göre en yüksek çimlenme değeri, kontrol bitkilerinden elde edilmiştir (Şekil 4.9). Buna rağmen, %0,05 kolhisin dozunun 3 ve 6 saat süre ile uygulandığı bitkilerin polenlerinde çimlenme oranları neredeyse aynı olmuştur. Farklı alanlarda 500 polen sayılmasıyla elde edilen oranlar kontrol bitkileri için, 228, %0.05 kolhisin dozunun 3 saat süre uygulandığı bitkilerin polenleri için, 159 ve %0.05 kolhisin dozunun 6 saat süre ile uygulandığı bitkilerin polenleri için ise, 158 olmuştur. Ancak çimlenme oranları %0.1 kolhisin dozu için gayet farklı çıkmış, çimlenen polen miktarı düşmüştür. Oran olarak %0.1 kolhisin dozunun 3 saat süre ile uygulandığı bitkilerde sayılan 500 polenden 16'sının çimlendiği, aynı kolhisin dozunun 6 saat süre ile uygulanmasından elde edilen bitkilerde ise, sadece 13 polenin çimlendiği belirlenmiştir. %0.1 kolhisin dozunun farklı sürelerde uygulanmasından elde edilen bitkilerin *In vitro* polen çimlenme oranları arasındaki farklılığın kaynağı bulunamamıştır. Bütün bunlara rağmen, araştırma sonuçlarına göre *In vitro* ortamda çimlenen polen oranları, asetocarmin ile belirlenen canlı polen oranlarından daha az olmuştur.

In vitro polen çimlendirme testlerinde kolhisinin %0.1 konsantrasyonuna maruz kalan bitkilerde morfolojik olarak farklı büyüklük ve şekilde polen yapıları ile karşılaşmıştır. Bunun yanı sıra polenlerdeki bu büyüklük ve şekil farklılıkları kontrol bitkilerinde neredeyse hiç gözlenmemiştir. *In vitro* polen çimlendirme çalışmalarında kontrol bitki polenlerine kıyasla uygulama yapılan bitkilerdeki polenlerin tüp oluşturma yüzdeleri düşük olduğu gibi,

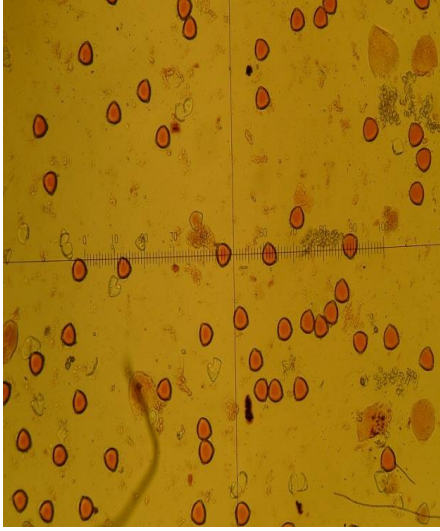
tüp oluştursa bile oluşturulan polen tüplerinin kontrol bitkilerinininkine kıyasla daha kısa veya bozuk yapıda polen tüpü oluşturdıkları gözlenmiştir (Şekil 4.10).

In vitro polen çimlendirilirken %15 ve %30 şeker içeren Brewbaker ve Kwack sıvı besi ortamları hem steril edilerek hem de steril edilmeden kullanılmıştır. Araştırmada besi ortamının steril edilmesinden ziyade, polen çimlendirmede kullanılan şeker miktarının önemli olduğu gözlenmiştir.

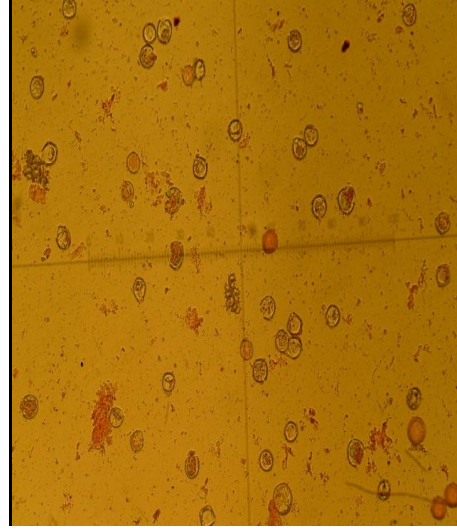
Çizelge 4.7. Asetocarmin ile boyama ve *In vitro* polen çimlendirme sonucu elde edilen polen canlılık değerleri

Uygulamalar	%0.1 kolhisin		%0.05 kolhisin		Kontrol
	3 saat	6 saat	3 saat	6 saat	
Asetocarmin ile Boyama	38.58	34.57	32.6*	30.2*	85.2
<i>In vitro</i> Polen Çimlendirme	2.6	3.2	31.8 *	31.6*	45.6

*Buruşuk görünümlü yaprak örneklerinden alınan çiçek tomurcuklarından elde edilen polen canlılık oranları



A



B

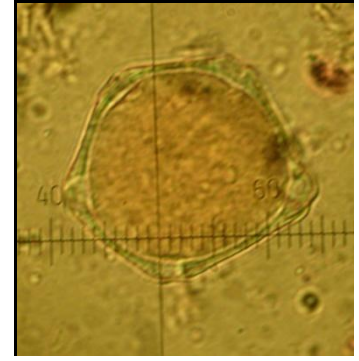
Şekil 4.7. Asetocarmin ile polen canlılıkları. A. Kontrol bitkisi polenleri B. %0.1 kolhisin uygulanmış bitkinin polenleri



A

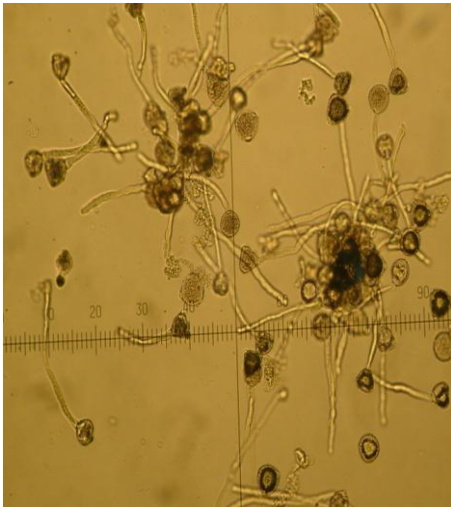


B



C

Şekil 4.8. Değişik uygulamalara ait polen görünümleri. A. Kontrol bitkilerine ait polen, B. 4 porlu %0.1 kolhisin dozu uygulanmış bitkiye ait polen, C. 5 porlu %0.1 kolhisin dozu uygulanmış bitkiye ait polen.



A.



B

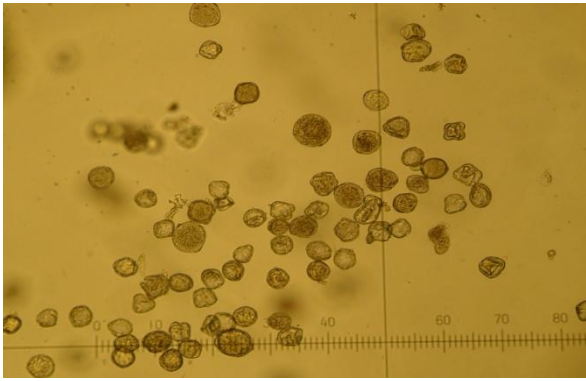
Şekil 4.9. Kontrol (A) ve %0.1 kolhisin uygulanan (B) bitkiye ait polenlerin çimlenme durumları.



A



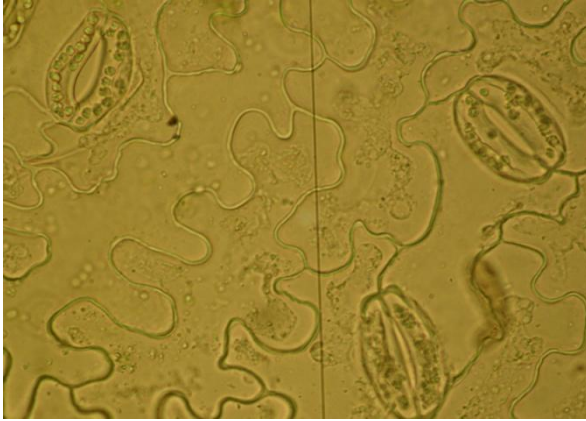
B



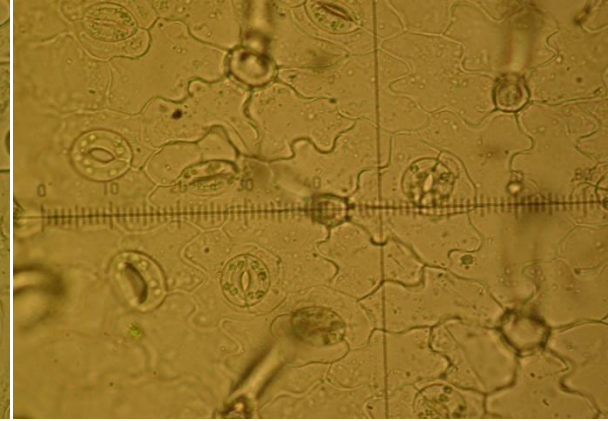
C



D



E



F

Şekil 4.10. Fasulye bitkilerine ait yaprak (A. %0,1 kolhisin uygulanmış bitki, B. Diploid kontrol bitkisi), polen (C. %0,1 kolhisin uygulanmış bitkide *in vitro* polen çimlenme durumu, D Diploid bitkide *in vitro* polen çimlenme durumu) ve stoma hücrelerinin (E. %0,1 kolhisin uygulanmış bitkide stoma hücrelerinin durumu, F. Diploid kontrol bitkisi stoma hücrelerinin durumu) görünümü.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Kolhisin ve trifluralin uygulaması birbiri ile kıyaslandığında araştırmada kolhisin ile uygulama yapmanın daha başarılı bir sonuç verdiği söylenebilir. Bundan yola çıkılarak, yerel kırkgünlük fasulye bitkilerinde poliploidiyi teşvik etmek amacıyla %0.1 kolhisin dozunu apikal meristemlere uygulamanın diğer yöntemlere oranla daha başarılı bir yöntem olduğu gözlenmiştir. Bunun yanı sıra çimlendirilmiş tohumlara kolhisin ve trifluralin uygulaması ve yine aynı kimyasalların aksilar tomurcuklara uygulanmasından elde edilen araştırmalar başarılı bulunmamıştır. Sonuçlardan elde ettiğimiz veriler ışığında %0.1 kolhisin dozunu 6 saat süresince apikal meristemlere uygulama yapmak ile, 3 saat süresinde uygulama yapmak arasında ortalamalara bakıldığında, çok önemli bir farklılık olmamasına rağmen, bitkilerin morfolojik ve sitolojik gözlemleri sonucu %0.1 kolhisin dozunu bitkinin apikal meristemlerine 6 saat süre ile uygulamak bitkilerde daha fazla sayıda morfolojik ve sitolojik farklılık yaratmıştır. %0.05 kolhisin dozunun uygulanması 3 ve 6 saatlik sürenin her ikisinde de başlangıçta bazı morfolojik farklılıklar oluşturmasına rağmen, zamanla bu farklılıkların ortadan kalkması nedeniyle, bu bitkiler poliploid olma şüphesi taşıyamamışlardır. Aynı bitki üzerin %0.05 kolhisin dozunun uygulandığı bazı fasulye bitkilerinin tüm yapraklarında karyotip çalışmalarının yapılabilme imkanı olsaydı bu bitkilerden bir kısmının kimerik olma durumu belirlenebilirdi. Ancak gözlemlerimizi morfolojik farklılıkların çok daha yoğun olarak gözlenebildiği %0.1 kolhisin dozu uygulanmış diğer bitkiler üzerinde yaptığımız için, özellikle kimerik oluşumları bu çalışmada tespit etmek bizim için sorun oluşturmuştur. Ancak yaptığımız çalışmada uygulama dozlarının miktarları ve süreleri temel alındığında bile, %0.1 kolhisin dozu uygulanmış pek çok bitkide yaprak morfolojileri, stoma büyüklükleri, kloroplast sayılarına dayanarak, bu bitkilerin poliploid olma olasılıklarının kuvvetli olduğu söylenebilir. Diğer depolimerizasyon ajanı olarak kullanılan trifluralin uygulaması uygulanan dozlara bağlı olarak, kolhisin uygulamasının aksine benzer sonuçlar vermemiş, uygulamadan sonra hayatta kalan bitki oranları dikkate alındığında, %1 trifluralin dozu, %5 trifluralin dozuna göre daha fazla bitkinin hayatta kalmasına imkan sağlamıştır. Ancak zaman içerisinde bu bitkiler de tarla koşullarında hayatlarını devam ettirememişlerdir.

Araştırma sonucuna göre; aksilar tomurcuklarda yeterli sonuç alınamamıştır. Bu durum bitkilere uygulanan kolhisin ve trifluralin dozlarının yüksek olmasından kaynaklanıyor olabilir. Böylelikle bu tarzda yapılacak diğer çalışmalarda uygulanacak kolhisin ve trifluralin dozlarının azaltılarak uygulanması daha başarılı sonuçlar elde edilmesine olanak sağlayabilir.

6. KAYNAKLAR

- Anonim (2009). <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx> (Erişim tarihi: 01.10.2011)
- Anonim (2010). Türkiye İstatistik Kurumu, Bitkisel Üretim İstatistikleri http://www.tuik.gov.tr/VeriBilgi.do?tb_id=45&ust_id=13 (Erişim tarihi: 15.08.2011)
- Bal U, Abak K (2005). Effects of sucrose, maltose, pH and phloroglucinol on the germination of globe artichoke pollen *in vitro*. European Journal of Horticultural Science (Gartenbauwissenschaft) 70 (3): 142 - 148.
- Bal U, Sarı N and Yılmaz H (2003). Effects of E20 and MS based media on *in vitro* induction of auxillary buds and shoot development from haploid *Cucumis melo* microcuttings. Pakistan Journal of Biological Sciences 6: 1130-1138.
- Balkaya A, Yanmaz R (2001). Bitki genetik kaynaklarının muhafaza imkanları ve tohum gen bankalarının çalışma sistemleri. Ekoloji-Çevre Dergisi 10(39): 25-30.
- Balkaya A, Yanmaz R (2005). Promising kale (*Brassica oleracea* var. acephala) populations from Black Sea region, Turkey. NZ J Crop and Hort Sci 33:1-7.
- Bayraktar K. (1970). Özel Sebzeçilik Cilt II. İzmir: Ege Üniversitesi Matbaası.
- Bouvier L, Fillon FR, Lespinasse Y (1994). Oryzalin as an efficient agent for chromosome doubling of haploid apple shoots *in vitro*. Plant Breeding 113: 343-346.
- Bowers JE, Chapman BA, Rong J, Paterson AH (2003). Unravelling angiosperm genome evolution by phylogenetic analysis of chromosomal duplication events. Nature 422: 433-438.
- Brewbaker JL, Kwack BH (1963). The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth. Am. J. Bot. 50: 859-865.
- Briggs EN, Knowles PE (1967). An introduction to plant breeding. Reinhold Publishing Corp., New York.
- Brown SC, Devaux P, Marie D, Bergounioux C, Petit PX (1991). Cytometrie en flux: Application a l'analyse de la ploïdie chez les vegetaux. Biofuture 105, 2-16
- Chehregani A, Malayeri BE, Kavianpour F, Yazdi HL (2006). Effect of acid rain on the development, structure and viability of pollen grains in bean plants (*Phaseolus vulgaris*). Pakistan J Biol Sciences 9(6): 1033-1036.
- Darlington CD, Lacour LF (1979). The handling of chromosomes. George Allen & Unwin Ltd., London.
- Debouck D.G. (1999) Diversity in *Phaseolus* species in relation to the common bean. İçinde: S.P. Singh (ed.), Common bean improvement in the twenty-first century. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, s. 25-52.
- De Laat AMM, Göhde W, Vogelzang MJ (1987). Determination of ploidy of single plants and plants populations by flow cytometry. Flow Cytometry, 99: 303-307.

- Ekici L, Ercoşkun H (2007). Et ürünlerinde diyet lif kullanımı. Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi, 1:83-90
- Ellialtıglu Ş, Sarı N, Abak K (2001). Haploid Bitki Üretimi. Bitki Biyoteknolojisi I- Doku Kültürü ve Uygulamaları, Babaoğlu M, Gürel E, Özcan S,(editörler).Selçuk Üniversitesi Basımevi. Konya, s:137-189
- Esquinas-Alcasar JT (1993). Plant genetic resources. İçinde: Hayward MD, Bosemark NO, Romagosa I (editörler). Plant Breeding, Principles and prospects. s.33-50, Chapman & Hall: London.
- Fernandes TC, Mazzeo, DE, & Marin-Morales, MA (2007). Mechanism of micronüklei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. Science Direct, 88: 252-259.
- Grzebelus E, Adamus A (2004). Effect of anti-mitotic agents on development and genome doubling of gynogenic onion (*Allium cepa* L.) embryos. Plant Science. 167: 569-574.
- Harlan JR, deWet JMJ (1975). On O. Winge and a prayer: the origins of polyploidy. The Botanical Review 41(4): 361-390.
- Joshi P, & Verma, RC (2004). High Frequency Production of Colchicine Induced Autotetraploids in Faba Bean (*Vicia faba* L.). Cytologia, 141-147.
- Klug SW, Cummings RM (2002). Genetik Kavramlar. İçinde: Öner, C Kromozom mutasyonları kromozom sayısı ve düzeyindeki değişiklikler. s. 259 Palme Yayıncılık Ankara.
- Küçük A, Abak K, Sari N (2002). Cucurbit genetic resources collections in Turkey. İçinde: Díez MJ, Picó B, Nuez F (compilers) Cucurbit genetic resources in Europe. Ad hoc meeting, 19 January 2002, Adana, Turkey. Int Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. pp.46-51; ISBN 92-9043-556-9
- Ladizinsky G (1998). Plant evolution under domestication. Springer: Dordrecht
- Li TSC (2008). Vegetables and fruits: nutritional and therapeutic values. CRC Press
- Madakbaş SY, Ergin M, Özçelik H, Küçükomuzlu B (2007). Orta Karadeniz Bölgesinde yetiştirilen bazı bodur taze fasulye populasyonlarından seçilen bodur Ayşe Kadın özelliğinde saf hatların bazı morfolojik ve tarımsal özelliklerinin belirlenmesi. Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi 21 (41): 68-73.
- Örçen N (2006). Androjenetik tütün haploidlerinde asetenafthen ve trifluralinin antimitotik etkileri. Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bornova, İzmir
- Porch TG, Jahn M (2001). Effects of high-temperature stress on microsporogenesis in heat-sensitive and heat-tolerant genotypes of *Phaseolus vulgaris*. Plant, Cell and Environment 24: 723–731.
- Pundir R, Rao NK, Van der Maesen LJ (1982). Induced autotetraploidy in chickpea (*Cicer arietinum* L.). Springer , 65:119-122.
- Qin X, Rotino GL (1995). Chloroplast number in guard cells as ploidy indicator of in vitro-grown androgenic pepper plantlets. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 41: 145-149

- Rejeb RB, Benbadis A (1989). Fertile allotetraploid from the cross between *Phaseolus coccineus* L. and *Phaseolus acutifolius* A. *Gray Plant Cell Reports* 8:178-181
- Ross N, Crowhurst D, Whittaker R, Gardner C (1992). The genetic origin of kiwifruit. *Acta Hort. (ISHS)* 297:61-62
- Rubenstein KD, Heisey P, Shoemaker R, Sullivan J, Frisvold G (2005). Crop genetic resources: An Economic Appraisal. Bulletin Number 2, United States Department of Agriculture; www.ers.usda.gov
- Sari N, Abak K (1996). Haploid karpuzda in vitro kromozom katlanması amacıyla değişik doz ve sürelerde uygulanan kolhisinin etkisi. *Tr.J. of Agric. and Forestry* 20: 555-559.
- Sari N, Abak K, Pitrat M (1999). Comparison of ploidy level screening methods in watermelon: *Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. and Nakai. *Scientia Horticulturae* 82: 265-277
- Sen KN, Vidyabhusan RV (1960). Tetraploid Soybeans. *Euphytica*,9:317-322
- Silbernagel MJ (1986) Snap bean breeding. İçinde: Basset MJ Breeding vegetable crops. s.243-282. Avi: Westport, Connecticut
- Simmonds NW (1989). Principles of crop improvement. Longman: London, New York
- Sohoo M, Athwal DS, Chandra S (1970). Colchicine Induced Polyploidy in Chickpeas (*Cicer arietinum* L.). *Springer* 40: 163-168.
- Şalk A, Arın L, Devenci M, Polat S (2008). Özel Sebzeçilik Namık Kemal Üniversitesi Bahçe Bitkileri Bölümü Tekirdağ.
- Tepe Ş, Ellialtıoğlu Ş, Yenice N, Tıprıdamaz R (2002). *In vitro* kolhisin Uygulaması ile Poliploid Nane (*Mentha longifolia* L.) Bitkilerin Elde Edilmesi. Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 2002, 15(2): 63-69
- Thomas H (1993). Chromosome manipulation and polyploidy. İçinde: Hayward MD, Bosemark NO, Romagosa I (editörler). *Plant Breeding, Principles and prospects*. s.79-92, Chapman & Hall: London
- Yetisir H, Sari N (2003). A New *in vivo* method for chromosome duplication in haploid muskmelon (*Cucumis melo* L.). *Scientia Horticulturae* 98 (3): 277-283
- Zeytun A (1988). Çarşamba Ovasında yetiştirilen fasulye çeşitlerinin fenolojik ve morfolojik tespiti üzerine bir araştırma.Yüksek Lisans Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun.

ÖZGEÇMİŞ

01.10.1983 tarihinde Tokat'ta doğdu. Lise öğrenimini Tokat'ta tamamladı. 2005 yılında Balıkesir Üniversitesi Necatibey Eğitim Fakültesi Biyoloji Öğretmenliği'nden mezun oldu. 08.02.2007 tarihinde atanmış olduğu Namık Kemal Üniversitesi Rektörlüğü'nde halen görevini sürdürmektedir.