



The Effect of Different Oryzalin and Colchicine Concentrations Supplemented to *In vitro* Regeneration Medium on Tetraploid Plant Production in Eggplant

İlknur Çeğil^{1,a*}, Sebahattin Çürük^{1,b}

¹Horticulture Department, Faculty of Agriculture, Mustafa Kemal University, 31034 Antakya/Hatay, Turkey

*Corresponding Author

ARTICLE INFO	ABSTRACT
<p><i>Research Article</i></p> <p>Received : 24/10/2018 Accepted : 08/02/2019</p> <p>Keywords: Pollen fertility Colchicine Chromosome doubling <i>In vitro</i> regeneration Oryzalin</p>	<p>The objective of this study is to obtain tetraploid plants in eggplant cultivars, Faselis (F₁) and Karnaz (F₁), by applying colchicine and oryzalin in <i>in vitro</i> regeneration medium (RM: MS with 10 µM BA and 1 µM IAA). In the study, leaf explants which have been incubated on the solidified RM for 5 or 7 days were cultured on the same medium with 2.5 or 3.75 mM colchicine for 8, 16 or 32 hours; or with 28.8 or 43.2 µM oryzalin for 12, 24 or 36 hours. Then the explants were transferred to RM without colchicine and oryzalin. Callus, buds or short shoots formed in the RM were transferred to MS medium with 0.5 µM BA to obtain long plants. The ploidy levels of regenerants were determined by flow cytometry. In Karnaz, higher tetraploid plant formation was achieved from 3.75 mM colchicine compared to 2.5 mM colchicine. The highest tetraploid plant rate was obtained by applying of 43.2 µM oryzalin for 24 hours to the explants after incubation on the RM for 7 days. Pollen viability of the tetraploid plants produced by application of colchicine and oryzalin were 76.99% and 81.19% and germination were 19.14% and 17.98%. In Faselis, tetraploid plants were obtained by applying 2.5 mM colchicine to the explants for 8 or 32 hours after incubation on RM for 7 days. However, in the oryzalin experiment, the higher tetraploid plants were produced when the explants were incubated for 5 days in the RM. Pollen viability of the tetraploid plants obtained from applications of colchicine and oryzalin were 86.41% and 95.68% and germination were 26.54% and 28.47%.</p>

Türk Tarım – Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi 7(4): 606-616, 2019

Patlıcanda *In vitro* Rejenerasyon Ortamında Farklı Orizalin ve Kolhisin Konsantrasyonlarının Tetraploid Bitki Üretimine Etkisi

MAKALE BİLGİSİ	ÖZ
<p><i>Araştırma Makalesi</i></p> <p>Geliş : 24/10/2018 Kabul : 08/02/2019</p> <p>Anahtar Kelimeler: Çiçek tozu verimliliği <i>In vitro</i> rejenerasyon Kolhisin Kromozom katlaması Orizalin</p>	<p>Bu çalışmanın amacı, Faselis F₁ ve Karnaz F₁ patlıcan çeşitlerinde kolhisin ve orizalinin <i>in vitro</i> rejenerasyon ortamında kullanılmasıyla tetraploid bitki elde etmektir. Araştırmada, yaprak eksplantları 10 µM BA ve 1 µM IAA içeren katı MS rejenerasyon ortamında 5 ve 7 gün bekletilmiştir. Ardından bu eksplantlara kolhisinin 2,5 ve 3,75 mM konsantrasyonları 8, 16 ve 32 saat süreyle; orizalinin ise 28,8 ve 43,2 µM konsantrasyonları 12, 24 ve 36 saat süreyle uygulanmış ve tekrar kolhisinsiz ve orizalinsiz rejenerasyon ortamına aktarılmıştır. Rejenerasyon ortamında oluşan kallus, tomurcuk veya kısa sürgünler 0,5 µM BA ile desteklenmiş MS ortamına alınarak bitkilerin oluşması sağlanmış ve ploidi seviyesi flow sitometri ile belirlenmiştir. Karnaz F₁ çeşidinin eksplantlarına 3,75 mM kolhisin dozunun uygulaması sonucu, 2,5 mM'a göre daha yüksek tetraploid bitki oluşumu sağlanmıştır. Bu çeşitte uygulanan orizalin denemesinde ise en yüksek tetraploid bitki oluşumu, eksplantların 7 gün rejenerasyon ortamında bekletilmesinden sonra 43,2 µM orizalin konsantrasyonunun 24 saat uygulamasından elde edilmiştir. Karnaz F₁ çeşidinde kolhisin ve orizalin uygulamasından elde edilen tetraploid bitkilerde çiçek tozu canlılığı %76,99 ve %81,19, çimlenme %19,14 ve %17,98 olarak gerçekleşmiştir. Faselis F₁ çeşidinin rejenerasyon ortamında 7 gün bekletilen yaprak eksplantları 2,5 mM kolhisin konsantrasyonunda 8 ve 32 saat inkübe edildiğinde, diğer uygulamalara göre daha yüksek tetraploid bitki elde edilmiştir. Aynı çeşidin orizalin denemesinde, eksplantların 5 gün rejenerasyon ortamında bekletilmesi sonucu daha yüksek tetraploid bitki üretilmiştir. Faselis F₁ çeşidinde kolhisin ve orizalin uygulamaları sonucu üretilen tetraploid bitkilerde çiçek tozu canlılığı %86,41 ve %95,68, çimlenme ise %26,54 ve %28,47 olarak belirlenmiştir.</p>

^a ilknr_ilknr@hotmail.com

^b <https://orcid.org/0000-0002-1480-3942> | sebahattincuruk@gmail.com

^c <https://orcid.org/0000-0003-0542-3363>



Giriş

Patlıcan (*Solanum melongena* L.), dünyanın tropikal ve ılıman bölgelerinde (Asya ve Afrika gibi) ekonomik açıdan önemli bir sebze türüdür (Kashyap ve ark., 2003; Singh ve ark., 2006). Anavatanı Hindistan olan patlıcan, antikçağ (Hindistan) ve ortaçağ (Arap coğrafyası ve Avrupa) medeniyetlerinde gıda, ilaç ve süs bitkisi gibi farklı kullanım alanları olan ve afrodizyak özelliklerinin olduğuna inanılan bir sebzedir (Daunay, 2008). Dünya’da 2012-2016 yılları ortalamasına göre en çok üretim yapan ülkeler, sırasıyla Çin (29,81 milyon ton), Hindistan (12,95 milyon ton), Mısır (1,22 milyon ton), Türkiye (823 bin ton) ve İran (584 bin ton) olmuştur (FAO, 2018).

Kültür patlıcanı özellikle bakteriyel hastalıklar, *Fusarium* ve *Verticillium* solgunlukları, nematod ve bazı böcekler olmak üzere birçok hastalık ve zararlıya karşı duyarlıdır (Collonnier ve ark., 2001; Asensio ve ark., 2014). Toprak kökenli *Fusarium*, *Verticillium* ve *Meloidogyne* spp. gibi patojenlerin patlıcanda önemli sayılabilecek ürün kayıplarına neden olabileceği, bakteriyel solgunlukla (*Ralstonia solanacearum*) bulaşık topraklarda bu kaybın %50-100 dolayında olduğu bildirilmektedir (Hanudin ve ark., 1992; Gousset ve ark., 2005). Yabani patlıcanın (*Solanum torvum* Sw.) ise *Fusarium oxysporum*, *Verticillium*, kök-ur nematodu ve bazı bakteriyel solgunluklara karşı dayanıklı olduğu bildirilmektedir (Bletsos ve ark., 2003; Gousset ve ark., 2005; Daunay ve Hazra, 2012). Yabani patlıcanda bulunan bu özelliklerin kültür patlıcanına aktarılması amacıyla melezleme ve somatik hibridizasyon yöntemleri kullanılarak çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Ancak, bu iki türün belirtilen yöntemlerle melezlenmesi sonucu oluşan interspesifik melezlerin genelde kısır olması sebebiyle, şu ana kadar yapılan çalışmalardan olumlu sonuç alınamamıştır (Collonnier ve ark., 2003; Kumchai ve ark., 2013; Plazas ve ark., 2016).

Söz konusu melezleme engelini aşmak için çeşitli yaklaşımlar uygulanabilir. Örneğin *S. torvum* ve *S. melongena*’ya antimitotik ajanları uygulayarak her iki türde üretilen verimli tetraploid bitkilerin melezlenmesi sonucu fertil interspesifik bitkilerin üretilmesi söz konusu olabilir. İkinci yaklaşım olarak *S. melongena* x *S. torvum* melezlenmesiyle oluşan kısır diploid interspesifik genotipler ile *S. melongena* çeşitlerinin kromozom katlamasını sağlayarak oluşan tetraploid bitkilerin melezlenmesi gerçekleştirilebilir. Her iki yaklaşımın uygulanabilmesi için öncelikle *S. melongena* çeşitlerinde tetraploid bitki üretilmesinin sağlanması gerekmektedir. Nitekim yapılan farklı çalışmalar sonucunda, yabani diploid patates genotiplerinin kromozom sayısının katlanmasıyla, *Solanum* üyesi olan tetraploid kültür patatesiyle eşeysel uyumluluğunun sağlandığı bildirilmiştir (Jansky, 2006). Ramanna ve Hermsen (1981), yumru oluşturmayan diploid *S. etuberosum* ile yumru oluşturan diploid *S. pinnatisectum*’un melezlenmesi sonucu oluşturdukları kısır interspesifik hibrit genotiplerde kromozom katlamasını yaparak, fertil tetraploid bitkileri üretmişlerdir. Daha sonra bu tetraploid bitkilerin polenleriyle tetraploid olan *S. acaule* melezlenerek, verimli hekzaploid genotipler oluşturulmuştur (Chavez ve ark., 1988).

S. melongena çeşitlerine antimitotik ajanlar kullanılmak suretiyle üretilen tetraploid bitkiler, üretim ve ıslah materyali olarak da kullanılabilir. Zira poliploid bitkilerde, morfolojik değişiklikler, genetik uyum ve çevresel streslere karşı dayanıklılığın diploidlere göre daha üstünlük gösterdiği bildirilmektedir (Mears, 1980; Tal, 1980; Xiong ve ark., 2006). Osborn ve ark. (2003)’nın bildirdiğine göre, poliploid bitkilerin, diploidlere kıyasla yüksek bir gen ekspresyon seviyesine sahip olduğu ifade edilmiştir. Öte yandan poliploid bitki oluşumunun fiziksel özellikler (kuraklık stresi veya hastalık direnci) ve kültürel özellikler (çiçek açma, hasat vs.) açısından da bahçe bitkileri ve tarımda ticari anlamda da başarı sağladığı rapor edilmiştir (Al Hakimi ve ark., 1998; Riddle ve ark., 2006; Xiong ve ark., 2006). Mitotik poliploidleşme uygulamaları, bitkilerde önemli morfolojik ve fizyolojik değişiklikler meydana getirdiğinden, günümüzde bitki ıslahında kullanılmaktadır (Dhooghe ve ark., 2011; Sakhanokho ve Islam-Faridi, 2014). Kulkarni ve Borse (2010) biberde (*Capsicum annuum* cv. GVC-111) kolhisin uygulayarak, kuvvetli köke sahip tetraploid yapıda poliploid bitkiler elde etmişlerdir.

Tüm bu yaklaşımlar haricinde, embriyo kurtarma yöntemiyle de melezleme engelini aşmak mümkündür. Çağlar ve Bağcı (2004)’nın yapmış oldukları çalışmada, *Cucumis* cinsi içinde yer alan *Cucumis melo* (Kavun, 2n=24) ve *Cucumis sativus* (Hıyar, 2n=14) arasında türler arası melezleme yoluyla gen aktarımını gerçekleştirme ve *Cucumis melo* var. *flexuosus* (Acur, 2n=24)’u bu iki tür arasında köprü olarak kullanabilme olanaklarını araştırmışlardır. Bu amaçla; *Cucumis melo*, *Cucumis sativus* ve *Cucumis melo* var. *flexuosus* arasında melezlemeler yaparak, hibrit embriyoların oluşturulması ve embriyo kurtarma yöntemi ile bu embriyolardan *in vitro* kültürde bitki elde etmeye çalışmışlardır. Araştırmanın sonucuna göre, kullanılan tüm melezleme kombinasyonlarından embriyo kurtarma yoluyla MS ortamı üzerinde kültüre alınan embriyolardan toplam 32 bitki elde etmişlerdir. Ayrıca *Cucumis* cinsi içinde yapılan türler arası melezlemelerde, bitkilerin çoğaltılması ve fertil F1 döllerinin elde edilmesinde kromozom katlaması yapılması gerektiğini öne sürmüşlerdir. Yapılan farklı bir çalışmada Kabaş ve ark. (2016), domateste bakteriyel kanser hastalığına dayanıklılık kazandırmak amacıyla duyarlı bir tür olan *S. esculentum* ile dayanıklı olan *S. peruvianum* türlerini melezlemişlerdir. *S. esculentum* ve *S. peruvianum* arasında 120 melezleme yapmışlardır. Melezleme sonucu %90 oranında meyve tutumu gerçekleşerek 60 meyve kaydetmişlerdir. F₁ hibritleri oluşturmak için 30 meyvede embriyo kurtarma tekniğini uygulamışlardır. Sonuç olarak toplamda 80 adet dayanıklı bitki elde etmişlerdir.

Patlıcanda yaprak eksplantlarının rejenerasyonu sırasında uygulanan antimitotik ajanların tetraploid bitki üretimine etkisi açısından literatürde herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmada, patlıcanın *in vitro* rejenerasyon ortamında kolhisin ve orizalinin farklı dozları ve uygulama süresinin tetraploid bitki üretimine olan etkisi araştırılmıştır.

Materyal ve Yöntem

Materyal

Araştırma Eylül 2014-Kasım 2016 tarihleri arasında, Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü'ne ait, gün uzunluğu kış aylarında 12 saat olacak şekilde ek ışıklandırmayla ayarlanabilen, ısıtma ve pet soğutma sistemi bulunan bir cam sera ve biyoteknoloji laboratuvarında yürütülmüştür. Araştırma kapsamında, *S. melongena*'nın Karnaz F₁ (Bursa Tohum) ve Faselis F₁ (De Ruiter Seeds, Hollanda) çeşitleri kullanılmıştır.

Yöntem

Tohumlar, 100 ml'sinde 2 damla Tween 20 bulunan ve %1 sodyum hipoklorit içeren bir çözeltide 20 dakika boyunca manyetik karıştırıcıda çalkalanmış, ardından 5 kez steril saf sudan geçirilerek yüzeysel dezenfeksiyon tamamlanmıştır. Daha sonra, bu tohumlar *in vitro* koşullarda hormonsuz MS (Murashige ve Skoog, 1962) ortamında çimlendirilerek bitki oluşumu sağlanmıştır. Oluşan bitkilerin yaprak eksplantlarına, aşağıda açıklandığı gibi kolhisin ve orizalin uygulanarak, verimli poliploid (tetraploid) bitkiler üretilmeye çalışılmıştır. Elde edilen bireylerin tetraploid olup olmadığı Flow Sitometri yöntemi (Tuna, 2014) kullanılarak belirlenmiştir. Tetraploid olduğu belirlenen bitkilerin çiçeklenmesi incelenerek, çiçek tozu canlılık ve çimlenme oranları (%) hesaplanmıştır.

Kolhisin ve Orizalin Uygulamaları

Uygulama konsantrasyonu ve süresi; *in vitro* koşullarda 2,5 ve 3,75 mM kolhisin konsantrasyonları 8, 16 ve 32 saat, orizalinin ise 28,8 ve 43,2 µM konsantrasyonları 12, 24 ve 36 saat süreyle uygulanmıştır. Kolhisin her uygulama için taze hazırlanmış olup, ortamlara otoklavdan sonra filtre sterilizasyonu yapılarak eklenmiştir. Orizalin ise steril kabin içerisinde dimetil sülfoksit (DMSO)'de çözülürerek ortamlara otoklavdan sonra ilave edilmiştir.

Araştırmada kullanılan yaprak eksplantlarının *in vitro* rejenerasyonu, 10 µM BA ve 1 µM IAA içeren MS ortamında gerçekleştirilmiştir. *In vitro* koşullarda rejenerasyon ortamına aktarılmış olan yaprak eksplantları, bu ortamda 5 ve 7 gün bekletildikten sonra, aynı ortam içerisine yukarıda belirtilen kolhisin ve orizalin konsantrasyonları eklenerek, belirtilen sürede inkübe edilmiş ve tekrar kolhisinsiz ve orizalinsiz rejenerasyon ortamına aktarılmıştır. Bu şekilde kültüre alınmış olan eksplantlar üzerinde oluşan kallus, tomurcuk veya tomurcuk benzeri yapıların sürgüne dönüştürülmesi için 0,5 µM BA ile desteklenmiş MS ortamı, iyi gelişme göstermiş olan sürgünlerin köklendirilmesi için ise MS ortamı kullanılmıştır (Çürük ve ark., 2014a). MS ortamına aktarılmış olan eksplantlar 25±1°C sıcaklık, 25-30 µmol/m²s ışık yoğunluğunda (16 saat ışık, 8 saat karanlık) kültüre alınmıştır. Rejenerasyon ortamında kolhisin ve orizalin uygulanması sonucu, kallus oluşturan eksplant oranı (%), tomurcuk benzeri yapı oluşturan eksplant oranı (%), sürgün oluşturan eksplant oranı (%), sürgün büyütme ortamında eksplant başına oluşan sürgün sayısı (adet), eksplant başına saksıya aktarılan bitki sayısı (adet), saksıda tutan bitki oranı (%), eksplant başına saksıda tutan bitki sayısı (adet), tetraploid bitki sayısı (adet/eksplant) belirlenmiştir.

Bitkilerin Yetiştirilme Koşulları, Ploidi Düzeyinin Belirlenmesi ve Çiçek Tozu Canlılığı

Yapılan çalışmalar sonunda, kolhisin veya orizalin uygulanarak elde edilen ve *in vitro* koşullarda bulunan bitkiler, dış koşullara alıştırılarak 0,5 l'lik saksılara dikilmiş, daha sonra ploidi düzeyleri belirlenmiştir. Tetraploid olarak belirlenen ve dikim aşamasına gelen bitkiler, torf:perlit karışımı (2:1) ile doldurulmuş 16 l'lik saksılara dikilmiş ve cam seraya yerleştirilmiştir. Bitkilerin ploidi düzeyi, Partec firmasının DAPI kiti (Sysmex-Partec, Kat. No: 05-5002) ile Partec protokolü kullanılarak, Flow Sitometri ile belirlenmiştir (Tuna, 2014).

Çiçek tozu canlılığı %1'lik 2,3,5 triphenyl tetrazolium chloride (TTC), çimlenmesi ise petride agar yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Çiçek tozları %5 sakkaroz, 50 mg/l borik asit ve %1 agar içeren cam petrielerde 22-25°C'de çimlendirilmiştir (Khan ve Isshiki, 2008). Açılan çiçeklerden alınan çiçek tozları, TTC ve çimlendirme ortamına ekildikten yaklaşık 5 saat sonra ışık mikroskobu altında incelenmiştir. Her genotipten 4 tekerrürde toplam 200 adet çiçek tozu incelenerek canlılık ve çimlenme oranları (%) hesaplanmıştır.

Verilerin Değerlendirilmesi

Denemeler, tesadüf parsellerine deneme düzenine göre kurulmuş olup, elde edilen verilere SAS paket programı ile varyans analizi (ANOVA) uygulanmıştır. *In vitro* çalışmalarda, uygulamalar 4 tekerrürlü kurulmuş ve her tekerrürde 5 eksplant bulundurulmuştur. Çiçek tozu çalışmalarda ise her genotipten 4 tekerrür ve her tekerrürde yaklaşık 50 çiçek tozu olmak üzere toplamda ortalama 200 adet çiçek tozu incelenerek canlılık ve çimlenme oranları (%) hesaplanmıştır. Elde edilen % verilere açı transformasyonu uygulanmış ve eksplant başına düşen bitki gözlemlerinde elde edilen rakamlar 10'dan küçük olduğundan rakamlara 0,5 eklenerek karekök transformasyonu uygulanmıştır. Varyans analizinde %5'te önemli çıkan parametrelerin ortalamaları Duncan testine göre karşılaştırılmıştır.

Bulgular ve Tartışma

Karnaz F₁ çeşidinde, tetraploid bitki elde etmek amacıyla rejenerasyon ortamında gerçekleştirilebilecek kolhisin uygulamasını belirlemek için kurulan denemeden elde edilen ortalama değerler Çizelge 1'de verilmiştir. Üç ana faktörün ve bu faktörlerin ikili ve üçlü interaksiyonlarının kallus oluşturan eksplant oranı ve tomurcuk benzeri yapı oluşturan eksplant oranı üzerine önemli bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir (değerler verilmemiştir). İncelenen diğer özelliklerden sürgün oluşturan eksplant oranı, ikili interaksiyon açısından incelendiğinde en yüksek değer (%89,58), 3,75 mM kolhisin dozunun 32 saat uygulamasından elde edilmiştir. Sürgün büyütme ortamında eksplant başına oluşan sürgün sayısı üzerine sadece rejenerasyon ortamında bekleme süresi etkili olmuş olup, 5 gün bekletilen eksplantlarda 7 gün bekletilenlere göre %38 oranında daha yüksek bulunmuştur. Eksplant başına saksıya aktarılan bitki sayısı bakımından, üç faktörün interaksiyonu önemli bulunmuştur. Buna göre eksplantların rejenerasyon ortamında 5 gün bekletilmesinden sonra 3,75 mM kolhisin dozunun, 32 saat uygulanması sonucu en yüksek saksıya aktarılan bitki sayısı (0,83 adet/eksplant) elde edilmiştir. "Kolhisin dozu × rejenerasyon ortamında bekleme süresi"

ikili interaksiyonuna göre, rejenerasyon ortamında 5 gün bekletilen eksplantların 2,5 mM kolhisin dozuna maruz bırakılması veya 7 gün rejenerasyon ortamında inkübe edildikten sonrası 3,75 mM kolhisin dozunun uygulanması daha yüksek saksıda tutma oranının oluşmasını sağlamıştır. Ana faktörlerden kolhisinin 16 saatlik uygulanması sonucu oluşan eksplant başına saksıda tutan bitki sayısı, 8 ve 32

saatlik uygulamalara göre daha düşük çıkmıştır. Ana faktörlerden kolhisinin 3,75 mM dozunda, 2,5 mM kolhisin dozunun 5 katı kadar tetraploid bitki oluşmuştur. Yapılan bütün kolhisin uygulamalarından, toplam 17 adet tetraploid bitki elde edilmiştir. Elde edilen bu bitkilerden 6 tanesi saksıya aktarıldıktan sonra, gelişmesi yavaşlayarak ölmüştür.

Çizelge 1 Karnaz F₁ çeşidinde rejenerasyon ortamında kolhisin uygulaması sonucu elde edilen değerler
Table 1 Values obtained after application of colchicine in the regeneration medium in Karnaz F₁

KD	ROBS	US	SOEO	SS	BS	BO	STBS	TBS
2,5	5	8	93,75	0,77	0,65 ^{ab}	87,50	0,58	0,08
		16	75,00	0,67	0,52 ^b	91,67	0,46	0,00
		32	60,42	0,54	0,46 ^b	75,00	0,40	0,67
	7	8	68,75	0,60	0,60 ^{ab}	75,00	0,60	0,38
		16	66,67	0,25	0,13 ^c	50,00	0,13	0,50
		32	79,17	0,52	0,52 ^b	75,00	0,52	0,25
3,75	5	8	75,42	0,54	0,54 ^{ab}	0,00	0,48	1,83
		16	76,25	0,54	0,54 ^{ab}	50,00	0,48	1,13
		32	91,67	0,83	0,83 ^a	58,33	0,67	0,96
	7	8	72,92	0,48	0,42 ^b	100,00	0,42	1,75
		16	66,67	0,46	0,40 ^b	87,50	0,33	1,75
		32	87,50	0,50	0,42 ^b	100,00	0,42	1,92
LSD değeri (%5)			Ö.D.	Ö.D.	0,04	Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.
Kolhisin Dozu (mM) × Rejenerasyon Ortamında Bekleme Süresi (gün)								
2,5×5			76,39	0,66	0,54	84,72 ^a	0,48	0,96
2,5×7			71,53	0,46	0,42	66,67 ^{ab}	0,42	0,56
3,75×5			81,11	0,64	0,64	36,11 ^b	0,54	0,81
3,75×7			75,69	0,48	0,41	95,83 ^a	0,39	1,06
LSD değeri (%5)			Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.	9,88	Ö.D.	Ö.D.
Rejenerasyon Ortamında Bekleme Süresi (gün) × Uygulama Süresi (saat)								
5×8			84,58	0,65	0,59	43,75	0,53	0,96
5×16			75,63	0,60	0,53	70,83	0,47	0,56
5×32			76,04	0,69	0,65	66,67	0,53	0,81
7×8			70,83	0,54	0,51	87,50	0,51	1,06
7×16			66,67	0,35	0,26	68,75	0,23	1,13
7×32			83,33	0,51	0,47	87,50	0,47	1,08
LSD değeri (%5)			Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.
Kolhisin Dozu (mM) × Uygulama Süresi (saat)								
2,5×8			81,25 ^{ab}	0,69	0,63 ^a	81,25	0,59	0,23
2,5×16			70,83 ^b	0,46	0,32 ^b	70,83	0,29	0,25
2,5×32			69,79 ^b	0,53	0,49 ^a	75,00	0,46	0,46
3,75×8			74,17 ^b	0,51	0,48 ^{ab}	50,00	0,45	1,79
3,75×16			71,46 ^b	0,50	0,47 ^{ab}	68,75	0,40	1,44
3,75×32			89,58 ^a	0,67	0,63 ^a	79,17	0,54	1,44
LSD değeri (%5)			4,47	Ö.D.	0,03	Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.
Kolhisin Dozu (mM)								
2,5			73,96	0,56	0,48	75,69	0,45	0,31 ^b
3,75			78,40	0,56	0,52	65,97	0,46	1,56 ^a
LSD değeri (%5)			Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.	0,14
Rejenerasyon Ortamında Bekleme Süresi (gün)								
5			78,75	0,65 ^a	0,59 ^a	60,42	0,51	0,78
7			73,61	0,47 ^b	0,41 ^b	81,25	0,40	1,09
LSD değeri (%5)			Ö.D.	0,06	0,05	Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.
Uygulama Süresi (saat)								
8			77,71	0,60	0,55 ^a	65,63	0,52 ^a	1,01
16			71,15	0,48	0,39 ^b	69,79	0,35 ^b	0,84
32			79,69	0,60	0,56 ^a	77,08	0,50 ^a	0,95
LSD değeri (%5)			Ö.D.	Ö.D.	0,06	Ö.D.	0,07	Ö.D.

KD: Kolhisin Dozu (mM), ROBS: Rejenerasyon Ortamında Bekleme Süresi (gün), US: Uygulama Süresi (Saat), SOEO: Sürgün Oluşturan Eksplant Oranı (%), SS: Sürgün Büyütme Ortamında Eksplant Başına Oluşan Sürgün Sayısı (adet), BS: Eksplant Başına Saksıya Aktarılan Bitki Sayısı (adet), BO: Saksıda Tutan Bitki Oranı (%), STBS: Eksplant Başına Saksıda Tutan Bitki Sayısı (adet), TBS: Tetraploid Bitki Sayısı (adet/eksplant), Varyans analizi önemli bulunan uygulamaların ortalamaları arasındaki farklılıklar Duncan testiyle P<0,05'e göre belirlenmiştir, ÖD: Önemli Değil, LSD: Least Significant Difference

Tetraploid bitki oluşumu bakımından üçlü interaksyon uygulamaları arasındaki fark önemli olmamakla birlikte, en yüksek tetraploid bitki oluşumu, yaprak eksplantlarının 7 gün rejenerasyon ortamında bekletildikten sonra 3,75 mM kolhisin konsantrasyonunun 32 saat uygulamasında gerçekleşmiştir. Xu ve ark. (2016)'nın kavakta yapmış oldukları benzer bir çalışmada, *P. pseudo-simonii* × *P. nigra* 'Zheyin3#' × *P. × beijingensis* bitkisinin eksplantlarını 3 gün süreyle 75 µM kolhisin içeren ortamda bekletmesi sonucu tetraploid bitki elde ettiklerini belirtmişlerdir.

Karnaz F₁ çeşidinin rejenerasyon ortamında belli sürelerde bekletilen eksplantlarına farklı konsantrasyon ve sürede yapılan orizalin uygulaması sonucu, incelenen özelliklerden elde edilen ortalama değerler Çizelge 2'de sunulmuştur. Çizelgede ortalama değerleri verilmeyen gözlemlerden kallus oluşturan eksplant oranı, sürgün oluşturan eksplant oranı, saksıda tutan bitki sayısı ve ortalama değerleri verilen tetraploid bitki oranı bakımından, denenen faktörlerin önemli bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir. İncelenen diğer özellikler değerlendirildiğinde ise bu faktörlerin üçlü interaksyonlarının, istatistiksel olarak önemli olmadığı belirlenmiştir. Ayrıca, tomurcuk benzeri yapı oluşturan eksplant oranı ve eksplant başına saksıya aktarılan bitki sayısı hariç, diğer özellikler üzerine ikili interaksyonların etkisi önemli bulunmamıştır. İkili interaksyonların etkisi açısından bakıldığında, 5 gün rejenerasyon ortamında bekletilen eksplantlara 43,2 µM orizalin dozunun uygulanmasıyla en yüksek tomurcuk benzeri yapı oluşturan eksplant oranının elde edildiği görülmektedir. Eksplant başına saksıya aktarılan bitki sayısı, "rejenerasyon ortamında bekleme süresi x uygulama süresi" interaksyonu bakımından önemli bulunmuş olup, en yüksek eksplant başına saksıya aktarılan bitki sayısı (0,56 adet), eksplantların rejenerasyon ortamında 7 gün bekletilmesinden sonra 12 saat orizalin uygulamasından elde edilmiştir. Bunun yanı sıra, ana faktörlerin bazı özellikler üzerine etki ettiği belirlenmiştir. Oniki saatlik orizalin uygulandığında, sürgün büyütme ortamında eksplant başına oluşan sürgün sayısı (0,71 adet), 24 ve 36 saatlik orizalin uygulamalarına göre daha yüksek bulunmuştur. Genel olarak, 28,8 µM orizalin dozunda eksplant başına saksıda tutan bitki sayısı (0,42 adet), 43,2 µM orizalin uygulamasına kıyasla daha yüksek olmuştur. Aynı parametre açısından 12 saatlik orizalin uygulaması, 24 ve 36 saatlik uygulamalara göre daha etkili bulunmuştur. Karnaz F₁ çeşidinde yapılan orizalin uygulamalarına bağlı olarak elde edilen tetraploid bitki oranları istatistiksel olarak farklı olmamakla birlikte, sonuç alınan uygulamalardan toplamda 22 adet tetraploid bitki elde edilmiştir. Bu bitkilerden 2 tanesi saksıya aktarıldıktan sonra ölmüştür. Stanys ve ark. (2006), *Chaenomeles japonica* türünde eksplantlara 20 ila 40 µM orizalin 1 gün süreyle uyguladıklarında tetraploid bitkiler üretmişlerdir. Karnaz F₁ çeşidinin rejenerasyon çalışmalarında, orizalin uygulaması ile oluşturulan tetraploid bitki sayısının, kolhisin uygulamasına oranla daha fazla olduğu saptanmıştır.

Karnaz F₁ çeşidinin rejenerasyon ortamına kolhisin uygulaması sonucu oluşan tetraploid bitkilerin çiçek tozu canlılığı ve çimlenme oranları, ortalaması sırasıyla %76,99 ve %19,14 olarak belirlenmiştir (Çizelge 3). Leon ve ark.

(2015), *Physalis ixocarpa* (2n=2×=24) türünde kolhisin uygulamasıyla üretilen autotetraploid bitkiler ve bunlardan üretilen nesiller arasında, çiçek tozu canlılığının %60,20–67,93 oranında olduğunu belirterek özel bir farklılık olmadığını ifade etmişlerdir. Aynı çeşidin orizalin uygulaması sonucu üretilen tetraploid bitkilerin ise çiçek tozu canlılığı ortalaması %81,19, çimlenme ortalaması ise %17,98 olarak belirlenmiştir (Çizelge 3).

Faselis F₁ çeşidinde rejenerasyon ortamında kolhisin uygulamasından elde edilen veriler incelendiğinde; kallus oluşturan eksplant oranı, sürgün büyütme ortamında eksplant başına oluşan sürgün sayısı ve saksıda tutan bitki oranı gözlemleri açısından denenen ana faktörlerin üçlü interaksyonlarının önemli olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4). Eksplant başına saksıda tutan bitki sayısı ve tetraploid bitki sayısı üzerine, denenen ana faktörler ve interaksyonlarının etkisi önemli çıkmadığından, ortalama değerler çizelgede verilmemiştir. Üçlü interaksyon bakımından, incelenen özelliklerden kallus oluşturan eksplant oranı açısından, eksplantların 5 gün rejenerasyon ortamında bekletildikten sonra 2,5 mM kolhisin konsantrasyonu içeren rejenerasyon ortamında 16 veya 32 saat inkübe edilmesiyle ve 7 gün bekleme süresinden sonra eksplantlara 3,75 mM kolhisinin 32 saat uygulanmasıyla daha yüksek oranlar elde edilmiştir. Eksplantlar, rejenerasyon ortamında 5 gün bekledikten sonra 32 saat süresince 3,75 mM kolhisin dozuna maruz bırakıldıklarında, sürgün büyütme ortamında eksplant başına en yüksek sürgün sayısı (0,88 adet) oluşmuştur. Eksplantlar, 7 gün rejenerasyon ortamında bekletildikten sonra 2,5 mM kolhisin konsantrasyonu 16 saat veya 3,75 mM kolhisin dozu 8 saat uygulandığında en yüksek saksıda tutma oranı (%100) elde edilmiştir. İkili interaksyonları önemli olan parametreler incelendiğinde ise; 5 gün rejenerasyon ortamında bekletilen eksplantlara 2,5 mM'lık kolhisin uygulandığında elde edilen tomurcuk benzeri yapı oluşturan eksplant oranının, diğer "kolhisin dozu x rejenerasyon ortamında bekleme süresi" interaksyonlarına göre daha düşük olduğu belirlenmiştir. Sürgün oluşturan eksplant oranı ve eksplant başına oluşan sürgün sayısı açısından söz konusu ikili interaksyona bakıldığında, eksplantlar 5 gün rejenerasyon ortamında bekletildikten sonra 3,75 mM konsantrasyonunun uygulanmasıyla en yüksek değer elde edildiği tespit edilmiştir. Farklı uygulama sürelerinin tomurcuk benzeri yapı oluşturan eksplant oranları karşılaştırıldığında, 32 saatlik uygulamanın (%96,88), diğer uygulamalara kıyasla daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Rejenerasyon ortamında 5 gün bekletildikten sonra 3,75 mM kolhisin uygulamasında elde edilen eksplant başına saksıya aktarılan bitki sayısı, diğer "kolhisin dozu x rejenerasyon ortamında bekleme süresi" interaksyonlarından daha yüksek olmuştur. Aynı parametre bakımından, 32 saatlik uygulamaya kıyasla 8 ve 16 saatlik uygulamalardan daha yüksek ortalama elde edilmiştir.

Faselis F₁ çeşidinde rejenerasyon ortamında gerçekleştirilen kolhisin uygulamalarından elde edilen tetraploid bitki sayıları arasındaki farklar istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır (değerler verilmemiştir). Ancak, 2,5 mM kolhisinin 5 gün rejenerasyon ortamında bekletilen eksplantlara 8 saat uygulanması ve aynı

konsantrasyonun 7 gün bekletilen eksplantlara 8 veya 32 saat uygulanması, ayrıca 5 ve 7 gün bekletilen eksplantlara 3,75 mM kolhisin konsantrasyonunun sırayla 16 ve 8 saat uygulanmasından toplamda 5 adet tetraploid bitki elde edilmiştir. Elde edilen tetraploid bitkilerden ikisi *in vitro*

koşullarda sağlıklı gelişmemiştir. Song ve ark. (1997), *Allium fistulosum* × *A. cepa* interspesifik F₁ hibrit bitkisinde en yüksek tetraploid bitki sayısını 2,5 mM kolhisini sıvı ortamdaki kalluslara 72 saat uygulayarak elde etmişlerdir.

Çizelge 2 Karnaz F₁ çeşidinde rejenerasyon ortamında orizalin uygulaması sonucu elde edilen değerler
Table 2 Values obtained after application of oryzalin in the regeneration medium in Karnaz F₁

OD	ROBS	US	TBOEO	SS	BS	STBS	TBS
28,8	5	12	75,00	0,69	0,56	0,44	0,27
		24	64,58	0,50	0,44	0,35	0,50
		36	70,83	0,54	0,42	0,42	0,25
	7	12	87,50	0,88	0,58	0,58	0,21
		24	87,50	0,52	0,52	0,38	0,25
		36	77,08	0,46	0,38	0,38	0,38
43,2	5	12	95,00	0,63	0,49	0,49	0,25
		24	93,75	0,58	0,23	0,23	0,00
		36	91,67	0,48	0,40	0,25	0,38
	7	12	75,00	0,63	0,54	0,48	0,38
		24	79,17	0,35	0,35	0,21	0,63
		36	83,33	0,17	0,00	0,00	0,00
LSD değeri (%5)			Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.
Orizalin Dozu (µM) × Rejenerasyon Ortamında Bekleme Süresi (gün)							
28,8×5			70,14 ^c	0,58	0,47	0,40	0,34
28,8×7			84,03 ^{ab}	0,62	0,49	0,44	0,28
43,2×5			93,47 ^a	0,57	0,37	0,32	0,21
43,2×7			79,17 ^{bc}	0,38	0,30	0,23	0,33
LSD değeri (%5)			4,37	Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.
Rejenerasyon Ortamında Bekleme Süresi (gün) × Uygulama Süresi (saat)							
5×12			85,00	0,66	0,53 ^{ab}	0,46	0,26
5×24			79,17	0,54	0,33 ^{bc}	0,29	0,25
5×36			81,25	0,51	0,41 ^{ab}	0,33	0,31
7×12			81,25	0,75	0,56 ^a	0,53	0,29
7×24			83,33	0,44	0,44 ^{ab}	0,29	0,44
7×36			80,21	0,31	0,19 ^c	0,19	0,19
LSD değeri (%5)			Ö.D.	Ö.D.	0,03	Ö.D.	Ö.D.
Orizalin Dozu (µM) × Uygulama Süresi (saat)							
28,8×12			81,25	0,78	0,57	0,51	0,24
28,8×24			76,04	0,51	0,48	0,36	0,38
28,8×36			73,96	0,50	0,40	0,40	0,31
43,2×12			85,00	0,63	0,51	0,48	0,31
43,2×24			86,46	0,47	0,29	0,22	0,31
43,2×36			87,50	0,32	0,20	0,13	0,19
LSD değeri (%5)			Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.
Orizalin Dozu (µM)							
28,8			77,08 ^b	0,60	0,48 ^a	0,42 ^a	0,31
43,2			86,32 ^a	0,47	0,33 ^b	0,28 ^b	0,27
LSD değeri (%5)			9,26	Ö.D.	0,06	0,05	Ö.D.
Rejenerasyon Ortamında Bekleme Süresi (gün)							
5			81,81	0,57	0,42	0,36	0,27
7			81,60	0,50	0,40	0,34	0,31
LSD değeri (%5)			Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.
Uygulama Süresi (saat)							
12			83,13	0,71 ^a	0,54 ^a	0,50 ^a	0,28
24			81,25	0,49 ^b	0,39 ^b	0,29 ^b	0,34
36			80,73	0,41 ^b	0,30 ^b	0,26 ^b	0,25
LSD değeri (%5)			Ö.D.	0,08	0,07	0,7	Ö.D.

OD: Orizalin Dozu (mM), ROBS: Rejenerasyon Ortamında Bekleme Süresi (gün), US: Uygulama Süresi (Saat), TBOEO: Tomurcuk Benzeri Yapı Oluşturan Eksplant Oranı (%), SS: Sürgün Büyütme Ortamında Eksplant Başına Oluşan Sürgün Sayısı (adet), BS: Eksplant Başına Saksıya Aktarılan Bitki Sayısı (adet), BO: Saksıda Tutan Bitki Oranı (%), STBS: Eksplant Başına Saksıda Tutan Bitki Sayısı (adet), TBS: Tetraploid Bitki Sayısı (adet/eksplant), Varyans analizi önemli bulunan uygulamaların ortalamaları arasındaki farklılıklar Duncan testiyle P<0,05'e göre belirlenmiştir, ÖD: Önemli Değil, LSD: Least Significant Difference

Çizelge 3 Karnaz F₁ çeşidinde rejenerasyon ortamında kolhisin ve orizalin uygulaması sonucu elde edilen tetraploid bitkilerin çiçek tozu canlılığı ve çimlenmesi
 Table 3 Pollen viability and germination of tetraploid plants obtained after application of colchicine and oryzalin in regeneration medium of Karnaz F₁ cultivar

Genotip	Kırmızı Boyanan Çiçek	Pembe ve Kırmızı Boyanan	Çiçek Tozu Çimlenme Oranı (%)
	Tozu Oranı (%)	Çiçek Tozu Oranı (%)	
Kolhisin			
KR-col: 1/I 1.b	71,72	92,93	20,91
KR-col:3/II-1.b	37,74	75,73	21,51
KR-col:3/III-1.b	48,46	77,64	29,01
KR-col:3/IV 5.b	57,97	71,74	10,22
KR-col:4/I 3.b	60,55	90,63	20,55
KR-col:4/I 2.b1.k	47,93	75,74	5,80
KR-col:4/III-1.b	54,05	72,42	24,96
KR-col:5/I-1.b-1.k	38,92	60,73	15,63
KR-col:5/II-1.b	48,47	74,88	27,63
KR-col:9/III-1.b-1.k	46,89	72,85	12,74
KR-col:9/IV 1.b	52,46	81,56	21,50
Ortalama	51,38	76,99	19,14
Orizalin			
KR-ori:1/II 1.bitki 3.k	87,38	95,39	29,43
KR-ori:1/II 1.bitki 5.k	68,82	87,29	25,49
KR-ori:1/III 2.b 1.k	51,49	71,91	13,44
KR-ori:1/III 2.b 2.k	56,74	87,94	12,38
KR-ori:1/II 3.b	64,07	86,66	17,38
KR-ori:2/I 2.b	56,63	83,20	20,78
KR-ori:3/II 1.b	71,47	91,72	18,99
KR-ori:4/I 1.b 1.k	69,09	83,07	12,04
KR-ori:4/III-1.b	56,31	69,62	23,58
KR-ori:5/I 1.b	49,13	73,24	19,73
KR-ori:7/III-1.b	39,92	57,95	11,75
KR-ori:9/I 1.b	71,64	91,04	16,42
KR-ori:9/II 1.b 2.k	80,16	93,83	34,12
KR-ori:9/IV 1.b 1.k	72,40	91,40	14,36
KR-ori:10/II 3.b	54,74	75,78	18,12
KR-ori:10/II 4.b 1.k	50,00	62,90	15,00
KR-ori:10/IV 3.b 1.k	65,00	87,27	14,49
KR-ori:11/I-1.b	55,82	81,73	9,64
KR-ori:11/II 5.b	55,73	78,24	16,48
KR-ori:11/III-2.b-1.k	44,90	73,70	16,09
Ortalama	61,07	81,19	17,98

Genotipler 4 tekrerde toplam 200 adet çiçek tozu incelenerek değerlendirilmiştir.

Faselis F₁ çeşidinde rejenerasyon ortamında orizalin uygulama denemesinde elde edilen veriler Çizelge 5’de özetlenmiştir. Etkisi araştırılan üç ana faktörün kallus oluşturan eksplant oranı, tomurcuk benzeri yapı oluşturan eksplant oranı, sürgün oluşturan eksplant oranı ve sürgün büyütme ortamında eksplant başına oluşan sürgün sayısı üzerine etkisi istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur. Üçlü interaksiyonların etkisinin önemli olduğu özelliklerden eksplant başına saksıya aktarılan bitki sayısı açısından, eksplantların 5 gün rejenerasyon ortamında bekletilmesinden sonra 28,8 µM orizalin konsantrasyonunun 12 veya 24 saat süreyle uygulanmasından en yüksek değerler elde edilmiştir. Ayrıca saksıda tutma oranı bakımından, ikili interaksiyonlardan “rejenerasyon ortamında bekleme süresi x uygulama süresi” interaksiyonunun önemli olduğu belirlenmiştir. Buna göre eksplantların 7 gün rejenerasyon ortamında bekletilmesinin ardından orizalinin 36 saat uygulanması durumunda elde edilen bitkilerin hiçbirisi saksıda tutmadığından, bu uygulama söz konusu interaksiyondaki diğer uygulamalardan farklı bir

istatistiksel grupta yer almıştır. “Orizalin dozu x uygulama süresi” interaksiyonu önemli olan parametrelerden eksplant başına saksıda tutan bitki sayısı, 28,8 µM orizalin 24 saat uygulandığında en yüksek (0,49 adet) bulunmuştur. Ana faktör olan rejenerasyon ortamında bekleme süresinin etkisi incelendiğinde; eksplantların 5 gün rejenerasyon ortamında bekletilmesi sonucu elde edilen tetraploid bitki sayısının (0,23 adet/eksplant), 7 gün bekletilmeye (0,04 adet/eksplant) göre %575 oranında yüksek olduğu belirlenmiştir. Sonuçta; 5 gün rejenerasyon ortamında inkübe edilen eksplantların 28,8 µM orizalin konsantrasyonunda 36 saat bekletilmesi veya 5 ve 7 gün rejenerasyon ortamında kültüre alınan eksplantların sırayla 36 ve 24 saat süreyle 43,2 µM orizalin dozuna maruz bırakılmalarından, toplamda 7 adet tetraploid bitki elde edilmiştir. Ancak elde edilen bu bitkilerden üçü *in vitro* koşullarda sağlıklı gelişmemiştir. Diğer üçü ise saksıya aktarıldıktan sonra ölmüştür. Faselis F₁ çeşidinde eksplantlarına rejenerasyon ortamında uygulanan orizalin konsantrasyonu sonucu elde edilen tetraploid bitki sayısı, kolhisin uygulamasına göre daha yüksek bulunmuştur.

Çizelge 4 Faselis F₁ çeşidinde rejenerasyon ortamında kolhisin uygulaması sonucu elde edilen değerler
Table 4 Values obtained after application of colchicine in the regeneration medium in Faselis F₁

KD	ROBS	US	KOEO	EO	SOEO	SS	SABS	TBO
2,5	5	8	57,50 ^{ab}	72,50	67,50	0,56 ^{ab}	0,45	70,83 ^{ab}
		16	72,92 ^a	79,17	66,67	0,67 ^{ab}	0,48	75,00 ^{ab}
		32	68,75 ^a	93,75	81,25	0,56 ^{ab}	0,44	75,00 ^{ab}
	7	8	60,42 ^{ab}	87,50	66,67	0,60 ^{ab}	0,46	66,67 ^{ab}
		16	58,33 ^{ab}	100,00	93,75	0,71 ^{ab}	0,44	100,00 ^a
		32	58,33 ^{ab}	100,00	93,75	0,65 ^{ab}	0,35	87,50 ^a
3,75	5	8	50,00 ^b	91,67	91,67	0,75 ^{ab}	0,67	41,67 ^{ab}
		16	39,58 ^b	100,00	93,75	0,81 ^b	0,63	66,67 ^{ab}
		32	35,42 ^b	100,00	100,00	0,88 ^a	0,58	87,50 ^a
	7	8	33,33 ^b	93,75	87,50	0,81 ^b	0,48	100,00 ^a
		16	62,92 ^{ab}	88,75	71,25	0,66 ^{ab}	0,47	25,00 ^b
		32	66,67 ^a	93,75	87,50	0,13 ^c	0,06	25,00 ^b
LSD değeri (%5)			5,55	Ö.D.	Ö.D.	0,04	Ö.D.	16,28
Kolhisin Dozu (mM) × Rejenerasyon Ortamında Bekleme Süresi (gün)								
2,5×5			66,39 ^a	81,81 ^b	71,81 ^c	0,60 ^{bc}	0,46 ^b	73,61
2,5×7			59,03 ^a	95,83 ^a	84,72 ^{ab}	0,65 ^b	0,42 ^b	84,72
3,75×5			41,67 ^b	97,22 ^a	95,14 ^a	0,81 ^a	0,63 ^a	65,28
3,75×7			54,31 ^{ab}	92,08 ^a	82,08 ^{bc}	0,53 ^c	0,34 ^b	50,00
LSD değeri (%5)			3,21	3,56	4,09	0,02	0,03	Ö.D.
Rejenerasyon Ortamında Bekleme Süresi (gün) × Uygulama Süresi (saat)								
5×8			53,75	82,08	79,58	0,66 ^a	0,56	56,25
5×16			56,25	89,58	80,21	0,74 ^a	0,55	70,83
5×32			52,08	96,88	90,63	0,72 ^a	0,51	81,25
7×8			46,88	90,63	77,08	0,71 ^a	0,47	83,33
7×16			60,63	94,38	82,50	0,69 ^a	0,45	62,50
7×32			62,50	96,88	90,63	0,39 ^b	0,21	56,25
LSD değeri (%5)			Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.	0,03	Ö.D.	Ö.D.
Kolhisin Dozu (mM) × Uygulama Süresi (saat)								
2,5×8			58,96	80,00	67,08	0,58 ^{ab}	0,45	56,25
2,5×16			65,63	89,58	80,21	0,69 ^a	0,46	70,83
2,5×32			63,54	96,88	87,50	0,60 ^{ab}	0,40	81,25
3,75×8			41,67	92,71	89,58	0,78 ^a	0,57	83,33
3,75×16			51,25	94,38	82,50	0,74 ^a	0,55	62,50
3,75×32			51,04	96,88	93,75	0,50 ^b	0,32	56,25
LSD değeri (%5)			Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.	0,03	Ö.D.	Ö.D.
Kolhisin Dozu (mM)								
2,5			62,71 ^a	88,82	78,26 ^b	0,63	0,44	79,17 ^a
3,75			47,99 ^b	94,65	88,61 ^a	0,67	0,48	57,64 ^b
LSD değeri (%5)			6,50	Ö.D.	8,30	Ö.D.	Ö.D.	19,06
Rejenerasyon Ortamında Bekleme Süresi (gün)								
5			54,03	89,51	83,47	0,70 ^a	0,54 ^a	69,44
7			56,67	93,96	83,40	0,59 ^b	0,38 ^b	67,36
LSD değeri (%5)			Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.	0,05	0,05	Ö.D.
Uygulama Süresi (saat)								
8			50,31	86,35 ^b	78,33 ^b	0,68 ^a	0,51 ^a	69,79
16			58,44	91,98 ^{ba}	81,35 ^{ba}	0,71 ^a	0,50 ^a	66,67
32			57,29	96,88 ^a	90,63 ^a	0,55 ^b	0,36 ^b	68,75
LSD değeri (%5)			Ö.D.	8,83	10,16	0,06	0,06	Ö.D.

KD: Kolhisin Dozu (mM), ROBS: Rejenerasyon Ortamında Bekleme Süresi (gün), US: Uygulama Süresi (Saat), KOEO: Kallus Oluşturan Eksplant Oranı (%), EO: Tomurcuk Benzeri Yapı Oluşturan Eksplant Oranı (%), SOEO: Sürgün Oluşturan Eksplant Oranı (%), SS: Sürgün Büyütme Ortamında Eksplant Başına Oluşan Sürgün Sayısı (adet), SABS: Eksplant Başına Saksıya Aktarılan Bitki Sayısı (adet), TBO: Saksıda Tutan Bitki Oranı (%), Varyans analizi önemli bulunan uygulamaların ortalamaları arasındaki farklılıklar Duncan testiyle P≤0,05'e göre belirlenmiştir, ÖD: Önemli Değil, LSD: Least Significant Difference

Faselis F₁ çeşidinde rejenerasyon ortamında kolhisin ve orizalin uygulamaları sonucu oluşan tetraploid bitkilerin çiçek tozu canlılığı ve çimlenme oranları Çizelge 6'da sunulmuştur. Burada diploid kontrol bitkisinde çiçek tozu canlılık oranı ortalama %97,83 iken, kolhisin

uygulamasından elde edilen tetraploid bitkide bu oran %86,41 olmuştur. Çimlenme oranı ise kontrol bitkide %91,53 ve tetraploid bitkide %26,54 olarak hesaplanmıştır. Çürük ve ark. (2014b)'nın yaptığı çalışmada, patlıcan bitkisinden elde edilmiş tetraploid

bitkide çiçek tozu canlılığının %66,03 ve çimlenme oranının ise %10,62 olduğu belirtilmiştir. Aynı çeşidin orizalin uygulamasında ise üretilen tetraploid bitkinin çiçek tozu canlılık oranı %95,68 olarak belirlenirken,

diploid kontrol grubunda hesaplanan çiçek tozu canlılık oranı %97,83 olarak tespit edilmiştir. Tetraploid bitkilerin çiçek tozu çimlenme oranı (%28,47), diploid olan bitkilerin çimlenme oranına (%91,53) göre daha düşük bulunmuştur.

Çizelge 5 Faselis F₁ çeşidinde rejenerasyon ortamında orizalin uygulaması sonucu elde edilen değerler
Table 5 Values obtained after application of oryzalin in the regeneration medium in Faselis F₁

OD	ROBS	US	EBSABS	STBO	EBSTBS	TBS
28,8	5	12	0,50 ^a	87,50	0,44	0,00
		24	0,58 ^a	87,50	0,52	0,00
		36	0,44 ^{abc}	75,00	0,29	0,50
	7	12	0,48 ^{ab}	100,00	0,48	0,00
		24	0,46 ^{ab}	100,00	0,46	0,00
		36	0,00 ^d	0,00	0,00	0,00
43,2	5	12	0,42 ^{abc}	100,00	0,42	0,00
		24	0,17 ^{cd}	50,00	0,17	0,00
		36	0,35 ^{abc}	100,00	0,35	0,38
	7	12	0,23 ^{bcd}	50,00	0,23	0,00
		24	0,21 ^{bcd}	75,00	0,21	0,25
		36	0,48 ^{ab}	0,00	0,40	0,00
LSD değeri (%5)			0,13	Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.
Orizalin Dozu (µM) × Rejenerasyon Ortamında Bekleme Süresi (gün)						
28,8×5			0,51	83,33	0,42	0,17
28,8×7			0,31	66,67	0,31	0,00
43,2×5			0,31	83,33	0,31	0,29
43,2×7			0,31	41,67	0,28	0,08
LSD değeri (%5)			Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.
Rejenerasyon Ortamında Bekleme Süresi (gün) × Uygulama Süresi (saat)						
5×12			0,46	93,75 ^a	0,43	0,00
5×24			0,38	68,75 ^a	0,34	0,25
5×36			0,40	87,50 ^a	0,32	0,44
7×12			0,35	75,00 ^a	0,35	0,00
7×24			0,33	87,50 ^a	0,33	0,13
7×36			0,24	0,00 ^b	0,20	0,00
LSD değeri (%5)			Ö.D.	9,70	Ö.D.	Ö.D.
Orizalin Dozu (µM) × Uygulama Süresi (saat)						
28,8×12			0,49 ^a	93,75	0,46 ^{ab}	0,00
28,8×24			0,52 ^a	93,75	0,49 ^a	0,00
28,8×36			0,22 ^{bc}	37,50	0,15 ^d	0,25
43,2×12			0,32 ^{ab}	75,00	0,32 ^c	0,00
43,2×24			0,19 ^c	62,50	0,19 ^d	0,38
43,2×36			0,42 ^{ab}	50,00	0,38 ^{bc}	0,19
LSD değeri (%5)			0,03	Ö.D.	0,03	Ö.D.
Orizalin Dozu (µM)						
28,8			0,41	75,00	0,36	0,08
43,2			0,31	62,50	0,30	0,19
LSD değeri (%5)			Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.	Ö.D.
Rejenerasyon Ortamında Bekleme Süresi (gün)						
5			0,41	83,33 ^a	0,36	0,23 ^a
7			0,31	54,17 ^b	0,30	0,04 ^b
LSD değeri (%5)			Ö.D.	16,07	Ö.D.	0,09
Uygulama Süresi (saat)						
12			0,41	84,38 ^a	0,39	0,00
24			0,35	78,13 ^a	0,34	0,19
36			0,32	43,75 ^b	0,26	0,22
LSD değeri (%5)			Ö.D.	19,68	Ö.D.	Ö.D.

OD: Orizalin Dozu (mM), ROBS: Rejenerasyon Ortamında Bekleme Süresi (gün), US: Uygulama Süresi (Saat), EBSABS: Eksplant Başına Saksıya Aktarılan Bitki Sayısı (adet), STBO: Saksıda Tutan Bitki Oranı (%), EBSTBS: Eksplant Başına Saksıda Tutan Bitki Sayısı (adet), TBS: Tetraploid Bitki Sayısı (adet/eksplant), Varyans analizi önemli bulunan uygulamaların ortalamaları arasındaki farklılıklar Duncan testiyle P≤0,05'e göre belirlenmiştir, ÖD: Önemli Değil, LSD: Least Significant Difference

Çizelge 6 Faselis F₁ çeşidinde rejenerasyon ortamında kolhisin ve orizalin uygulaması sonucu elde edilen tetraploid bitkilerin çiçek tozu canlılığı ve çimlenme değerleri

Table 6 Pollen viability and germination of tetraploid plants obtained after application of colchicine and oryzalin in regeneration medium of Faselis F₁ cultivar

Genotip	Kırmızı Boyanan Çiçek Tozu Oranı (%)	Pembe ve Kırmızı Boyanan Çiçek Tozu Oranı (%)	Çiçek Tozu Çimlenme Oranı (%)
Kolhisin			
FR-col:1/II 1.b 1.k	40,28	88,15	38,10
FR-col:4/II	54,42	81,57	15,32
FR-col:8/II 1.b 2.k	70,16	89,52	26,21
Ortalama	54,95	86,41	26,54
Faselis (Kontrol)	52,28	97,83	91,53
Orizalin			
FR-ori:8/IV 1.b 1.k	71,35	95,68	28,47
Faselis (Kontrol)	52,28	97,83	91,53

Genotipler 4 tekrerde toplam 200 adet çiçek tozu incelenerek değerlendirilmiştir.

Sonuç

Karnaz F1 çeşidinin eksplantlarına 3,75 mM kolhisin dozunun uygulaması sonucu 2,5 mM'a göre daha yüksek tetraploid bitki oluşumu sağlanmıştır. Orizalin denemesinde ise en yüksek tetraploid bitki oluşumu, eksplantların 7 gün rejenerasyon ortamında bekletilmesinden sonra 43,2 µM orizalin konsantrasyonunun 24 saat uygulamasından elde edilmiştir. Bu çeşidin rejenerasyon çalışmalarında orizalin uygulaması ile oluşturulan tetraploid bitki sayısı 22 adet iken, kolhisin uygulaması ile elde edilen tetraploid bitki sayısının 17 adet olduğu gözlemlenmiştir.

Faselis F1 çeşidinin rejenerasyon ortamında 7 gün bekletilen yaprak eksplantları 2,5 mM kolhisin konsantrasyonunda 8 ve 32 saat inkübe edildiğinde, diğer uygulamalara göre daha yüksek tetraploid bitki oluşmuştur. Orizalin denemesinde, eksplantların 5 gün rejenerasyon ortamında bekletilmesi sonucu daha yüksek tetraploid bitki üretilmiştir. Faselis F₁ çeşidinde rejenerasyon ortamında orizalin uygulanan yaprak eksplantlarından, kolhisin uygulamasına kıyasla daha yüksek sayıda tetraploid bitki elde edilmiştir (sırasıyla 7 ve 5 adet).

Kolhisin ve orizalin uygulamasından elde edilen tetraploid bitkilerde çiçek tozu canlılığı sırasıyla Karnaz F1 çeşidinde %76,99 ve %81,19, çimlenme %19,14 ve %17,98 olmuştur. Faselis F1 çeşidinde ise bu oranlar sırasıyla %86,41 ve %95,68, çimlenme %26,54 ve %28,47 olarak gerçekleşmiştir.

Çalışmamızın, tetraploid bitki üretim konusunda yapılan diğer çalışmalarla birlikte, literatürlere katkı sağlayabileceği düşünülmektedir. Daha sonraki proje ve çalışmalarda, bu çalışmadan elde edilen tetraploid bitkilerde kendileme yapılarak, saf hatlar elde edilmesi sağlanabilir.

Kaynaklar

Al Hakimi A, Monneveux P, Nachit MM. 1998. Direct and indirect selection for drought tolerance in alien tetraploid wheat x durum wheat crosses. *Euphytica*, 100: 287-294. DOI: https://doi.org/10.1007/978-94-011-4896-2_49.

- Asensio IC, Prohens J, Gisbert C. 2014. Vigor for *in vitro* culture traits in *S. melongena* x *S. aethiopicum* hybrids with potential as rootstocks for eggplant. *Sci. World J.*, ID 702071:1-8. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/702071>.
- Bletsos F, Thanassouloupoulos C, Roupakias D. 2003. Effect of grafting on growth, yield and *Verticillium* wilt of eggplant. *HortScience*, 38: 183-186.
- Chavez R, Brown CR, Iwanaga M. 1988. Application of interspecific sesquiploidy to introgression of PLRV resistance from non-tuber-bearing *Solanum tuberosum* to cultivated potato germplasm. *Theor. Appl. Genet.*, 76: 497-500. DOI: 10.1007/BF00260898.
- Collonnier C, Fock I, Kashyap V, Rotino GL, Daunay MC, Lian Y, Mariska IK, Rajam MV, Servaes A, Ducreux G, Sihachakr D. 2001. Applications of biotechnology in eggplant. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 65: 91-107. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1010674425536>.
- Collonnier C, Fock I, Mariska I, Servaes A, Vedel F, Siljak-Yakovlev S, Souvannavong V, Sihachakr D. 2003. GISH confirmation of somatic hybrids between *Solanum melongena* and *S. torvum*: assessment of resistance to both fungal and bacterial wilts. *Plant Physiol. Biochem.*, 41: 459-470. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(03\)00054-8](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(03)00054-8).
- Çağlar G, Bağcı S. 2004. Bazı *Cucumis* türleri arasındaki melezlemelerde embriyo kurtarma yoluyla *in vitro* hibrit bitki rejenerasyonu. *Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 17(2): 175-182.
- Çürük S, Dayan A, Tekeli FÖ. 2014a. İnterspesifik melez patlıcan bitkilerinde *in vitro* rejenerasyon. 10. Sebze Tarım Sempozyumu. Tekirdağ, 2-4/09/2014. ss: 302-309.
- Çürük S, Doksöz S, Külahlıoğlu İ. 2014b. Diploid ve tetraploid interspesifik hibrit patlıcan (*Solanum melongena* x *Solanum torvum*) genotiplerinde aşımın çiçek tozu verimliliği ve bitki morfolojisi üzerine etkisi. Kesin sonuç raporu. Proje No:1120751 (TÜBİTAK-TOVAG).
- Daunay MC. 2008. Eggplant. In: Prohens J, Nuez F (Eds). *Handbook of crop breeding vegetables II: Fabaceae, Liliaceae, Umbelliferae and Solanaceae*. New York, USA: Springer. pp:163-220. eBook ISBN: 978-0-387-74110-9.
- Daunay MC, Hazra P. 2012. Eggplant. In: Peter KV, Hazra P (Eds.). *Handbook of Vegetables*. Houston, TX, USA: Studium Press. Pp: 257-322.
- Dhooghe E, Van Laere K, Eeckhaut T, Leus L, Van Huylenbroeck J. 2011. Mitotic chromosome doubling of plant tissues *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 104: 359-373. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-010-9786-5>.

- FAO 2018. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Erişim Adresi: <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/download/Q/QC/E>. Erişim: [5/4/2018].
- Gousset C, Collonnier C, Mulya K, Mariska I, Rotino GL, Besse P, Servaes A, Sihachakr D. 2005. *Solanum torvum*, as a useful source of resistance against bacterial and fungal diseases for improvement of eggplant (*S. melongena* L.). *Plant Sci.*, 168: 319-327. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2004.07.034>.
- Hanudin H, Hanafiah Goas MA. 1992. Screening of eggplant accessions for resistance to bacterial wilt. In: Hartman GL, Hayward AC (Eds.). *Bacterial Wilt*. Taiwan: ACIAR Proceedings, 45: 191-192. ISBN:1-86320-087-8.
- Jansky S. 2006. Overcoming hybridization barriers in potato. *Plant Breeding*, 125: 1-12. DOI: [10.1111/j.1439-0523.2006.01178.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.2006.01178.x).
- Kabaş A, Ari E, Zengin S, İlbi H, Aysan Y, Oğuz A. 2016. Development of resistant tomato population with bacterial canker resistance genes from interspecific hybrids by the support of embryo rescue. *Derim*, 33(1): 27-46. DOI: [10.16882/derim.2016.07605](https://doi.org/10.16882/derim.2016.07605).
- Kashyap V, Kumar SV, Collonier C, Fusari F, Hacıour R, Rotino GL, Sihachakr D, Rajam MV. 2003. Biotechnology of eggplant. *Sci. Hort.*, 97: 1-25. [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(02\)00140-1](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(02)00140-1).
- Khan MMR, Isshiki S. 2008. Development of a male sterile eggplant by utilizing the cytoplasm of *Solanum virginianum* and a biparental transmission of chloroplast DNA in backcrossing. *Scientia Horticulturae*, 117: 316-320. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2008.05.006>.
- Kulkarni M, Borse T. 2010. Induced polyploidy with gigas expression for root traits in *Capsicum annum* (L.). *Plant Breeding*, 129(4): 461-464. DOI: [10.1111/j.1439-0523.2009.01696.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.2009.01696.x).
- Kumchai J, Wei YC, Lee CY, Chen FC, Chin SW. 2013. Production of interspecific hybrids between commercial cultivars of the eggplant (*Solanum melongena* L.) and its wild relative *S. torvum*. *Genet. Mol. Res.*, 12 (1): 755-764. DOI: [10.4238/2013](https://doi.org/10.4238/2013).
- Leon JR, Reyes-Valdes MH, Mendoza-Rodriguez DV, Ramirez-Godina F, Robledo-Torres V, Gomez-Martinez M, Hernandez-Guzman G. 2015. Meiotic analysis of four cross-pollinated generations in a synthetic autotetraploid population of husk tomato (*Physalis ixocarpa*). *Journal of Experimental Botany*, 84(1): 101-106.
- Mears JA. 1980. Chemistry of polyploids: a summary with comments on Parthenium (Asteraceae-Ambrosiinae). In: Lewis WH (ed.) *Polyploidy: biological relevance*. New York: Plenum Press, 13: 77-102. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4613-3069-1_5.
- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>.
- Osborn TC, Pires, JC, Birchler JA, Auger DL, Chen ZJ, Lee HS, Comai L, Madlung A, Doerge RW, Colot V, Martienssen RA. 2003. Understanding mechanisms of novel gene expression in polyploids. *Trends Genet.*, 19: 141-147. DOI: [10.1016/S0168-9525\(03\)00015-5](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(03)00015-5).
- Plazas M, Vilanova S, Gramazio P, Rodriguez-Burruezo A, Fita A, Herraiz FJ, Ranil R, Fonseka R, Niran L, Fonseka H. 2016. Interspecific hybridization between eggplant and wild relatives from different gene pools. *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, 141: 34-41.
- Ramanna MS, Hermesen JGTH. 1981. Structural hybridity in the series *Etuberosa* of the genus *Solanum* and its bearing on crossability. *Euphytica*, 30: 15-31. DOI: [10.1007/BF00033655](https://doi.org/10.1007/BF00033655).
- Riddle NC, Kato A, Birchler JA. 2006. Genetic variation for the response to ploidy change in *Zea mays* L. *Theor. Appl. Genet.*, 114:101-111. DOI: [10.1007/s00122-006-0414-z](https://doi.org/10.1007/s00122-006-0414-z).
- Sakhanokho HF, Islam-Faridi MN. 2014. Spontaneous autotetraploidy and its impact on morphological traits and pollen viability in *Solanum aethiopicum*. *HortScience*, 49(8): 997-1002.
- Singh AK, Singh M, Singh AK, Singh R, Kumar S, Kallo G. 2006. Genetic diversity within the genus *Solanum* (*Solanaceae*) as revealed by RAPD markers. *Curr. Sci.*, 90 (5): 711-716.
- Song P, Kang W, Ellen BP. 1997. Chromosome doubling of *Allium fistulosum* x *A. cepa* interspecific F₁ hybrids through colchicine treatment of regenerating callus. *Euphytica*, 93: 257-262.
- Stanys V, Weckman A, Staniene G, Duchovskis P. 2006. *In vitro* induction of polyploidy in japanese quince (*Chaenomeles japonica*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 84: 263-268. DOI: [10.1007/s11240-005-9029-3](https://doi.org/10.1007/s11240-005-9029-3).
- Tal M. 1980. Physiology of polyploids. In: Lewis WH (ed.) *Polyploidy: biological relevance*. New York: Plenum Press. 13: 61-76. PMID: 550845.
- Tuna M. 2014. Flow sitometri ve tarımsal araştırmalarda kullanımı. II. Flow Sitometri ve Tarımsal Araştırmalarda Kullanımı Eđitim Programı Notları, Tekirdağ, 16-17 Ocak 2014.
- Xiong YC, Li FM, Zhang T. 2006. Performance of wheat crops with different chromosome ploidy: root-sourced signals, drought tolerance, and yield performance. *Planta*, 224: 710-718. DOI: [10.1007/s00425-006-0252-x](https://doi.org/10.1007/s00425-006-0252-x).
- Xu C, Huang Z, Liao T, Li Y, Kang X. 2016. *In vitro* tetraploid plants regeneration from leaf explants of multiple genotypes in *Populus*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 125: 1-9. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-015-0922-0>.