



**KİMYASAL MUTAGEN UYGULAMALARININ
BUĞDAYDA BAZI *İN VİTRO* KARAKTERLER VE
KURAKLIĞA TOLERANS ÜZERİNE ETKİLERİ**

Arash HOSSEIN POUR

**Doktora Tezi
Tarla Bitkileri Anabilim Dalı
Tahıllar ve Yemeklik Baklagiller Bilim Dalı
Prof. Dr. Metin TOSUN
2016
Her hakkı saklıdır**

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

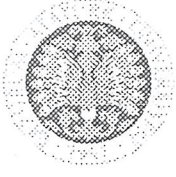
KİMYASAL MUTAGEN UYGULAMALARININ BUĞDAYDA BAZI
İN VİTRO KARAKTERLER VE KURAKLIĞA TOLERANS
ÜZERİNE ETKİLERİ

Arash HOSSEIN POUR

TARLA BİTKİLERİ ANABİLİM DALI
Tahıllar ve Yemelik Baklagiller Bilim Dalı

ERZURUM
2016

Her hakkı saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

**KİMYASAL MUTAGEN UYGULAMALARININ BUĞDAYDA BAZI *İN VİTRO*
KARAKTERLER VE KURAKLIĞA TOLERANS ÜZERİNE ETKİLERİ**

Prof. Dr. Metin TOSUN danışmanlığında, Arash HOSSEIN POUR tarafından hazırlanan bu çalışma 09 /02/2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Tarla Bitkileri Anabilim Dalı Tahıllar ve Yemeklik Baklagiller Bilim Dalı'nda Doktora tezi olarak ~~oybirliği/oy çokluğu~~ (5/0) ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof.Dr. Metin TOSUN

İmza

Üye : Prof.Dr. Kamil HALILOĞLU

İmza

Üye : Prof.Dr. Ertan YILDIRIM

İmza

Üye : Prof.Dr. Bülent UZUN

İmza

Üye : Prof.Dr. Murat OLGUN

İmza

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu 18 / 02 / 2016 tarih ve 8/ 59 nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Saltuk/Buğrahan CEYHUN
Enstitü Müdürü

Bu tezde yer alan “Mutagen Uygulamaları” bölümü Tübitak (Proje No: TOVAG 113O940) tarafından, diğer bölümler ise Atatürk Üniversitesi BAP (Proje No: 2013/143) tarafından desteklenmiştir.

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirilerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

Not: Bu doktora tezine ait bu onay sayfası ilk düzenlendiğinde sehven yüksek lisans tezi olarak düzenlendiğinden dolayı öğrencinin 16.05.2023 tarihli dilekçesine istinaden 29.05.2023 tarihinde yeniden düzenlenmiştir.

ÖZET

Doktora Tezi

KİMYASAL MUTAGEN UYGULAMALARININ BUĞDAYDA BAZI *İN VİTRO* KARAKTERLER VE KURAKLIĞA TOLERANS ÜZERİNE ETKİLERİ

Arash HOSSEIN POUR

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Tarla Bitkileri Anabilim Dalı
Tahıllar ve Yemeklik Baklagiller Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Metin TOSUN

Son yıllarda *in vitro* mutagenesis olarak adlandırılan, mutagenik uygulamaların *in vitro* tekniklerle kombinasyonunu kapsayan çalışmalar yapılmaya başlanmıştır. İki farklı uygulama halinde yürütülmüş olan bu çalışma, kimyasal mutasyonlardan EMS ve sodyum azitin buğdayın Kırık çeşidinde *in vitro* ve *in vivo* şartlarda etkilerini ve ıslah amaçlı çalışmalarda uygulanabilecek optimum konsantrasyonu belirlemek ve kuraklığa toleranslı ekmeklik buğday hatları geliştirmek amacıyla yapılmıştır.

Olgun embriyo kültürüne etil metansülfonatın farklı süre ve konsantrasyonlarda uygulanması bir çok karakteri olumlu yönde etkilemiştir. Etil metansülfonatın uygulama süresi ve konsantrasyonu arttıkça genel olarak kallus oluşum oranı azalmıştır. Ancak rejenerasyon etkinliği (RE) ve bitki sayısı (BS) bakımından uygulama süresine göre ortalamalar dikkate alındığında, en yüksek RE ve BS 6 saatlik uygulamadan elde edilmiş, 4 saatlik uygulaması ise son sırada yer almıştır. Diğer taraftan, ortalamalar esas alınarak konsantrasyonlara göre değerlendirme yapıldığında, RE ve BE sırasıyla %0.4 ve %0.3'lük konsantrasyonlarda elde edildiği ve kontrol uygulamasının her iki karakter bakımında son sırada yer aldığı görülmüştür. LD₅₀ değeri hem rejenerasyon etkinliği hem de bitki sayısı için EMS'nin %0.1'lik konsantrasyonunun 8 saat süre ile uygulandığı muameleden elde edilmiştir.

Sodyum azit uygulaması kallus oluşumunu, RE ve BS azaltmış, bu etki özellikle yüksek konsantrasyonlarda ve uzun uygulama sürelerinde daha belirgin olmuştur. BS açısından LD₅₀ değeri, 2 mM'lık konsantrasyon ve 3 saat uygulamadan, RE açısından 4 mM'lık konsantrasyon ve 1 saat süre uygulanmasından elde edilmiştir.

Kallusa etil metansülfonat farklı sürelerde uygulandığında, ortalamalar esas alınarak en yüksek RE ve BS 6 saatlik uygulamadan, en düşük ise 4 saatlik uygulamadan elde edilmiştir. Diğer taraftan, ortalamalar esas alınarak konsantrasyonlara göre değerlendirme yapıldığında, en yüksek RE ve BS kontrol grubunda en düşük ise 80 mM'lık konsantrasyonda olduğu görülmüştür. Kallusa etil metansülfonatın uygulanması durumunda LD₅₀ kriterine göre BS esas alındığında optimum konsantrasyonun ve uygulama süresinin 50 mM'lık konsantrasyonun 8 saat süre ile uygulanması olduğu tespit edilmiştir.

Kallusa sodyum azitin uygulama süresi RE ve BS çok önemli derecede etkilemiş, en yüksek rejenerasyon RE ve BS, 1 saatlik uygulamadan elde edilmiştir. Sodyum azitin uygulama süresi uzadıkça ve konsantrasyonu arttıkça her iki karakterde düşüşler ortaya çıkmış ve 4 saatlik uygulamada tüm konsantrasyonlarda herhangi bir rejenerasyon gerçekleşmemiştir. Sodyum azitin kallusa uygulanması durumunda LD₅₀ değerine göre optimum konsantrasyonun ve uygulama süresinin hem RE hem de BS için 1 mM'lık konsantrasyonunun 1 saat süre ile uygulandığı muamele olduğu belirlenmiştir.

Bu çalışmada farklı süre ve konsantrasyonlarda uygulanan EMS ve NaN₃; çimlenme, çim ve fide ile ilgili bir çok karakteri sırasıyla olumlu ve olumsuz yönde etkilemiştir. Bu nedenle her iki kimyasal mutagen'de araştırmada uygulanan süre ve konsantrasyonlara göre LD₅₀ değeri belirlenememiştir.

M₂ tohumları -10 bar'lık PEG 6000 ortamında çimlendirmeye alınmış, böylece erken dönemde (çimlenme dönemi) kurağa toleranslılık yönünden test edilmiş ve seleksiyon yapılmıştır. Çimlenen tohum sayısı sodyum azit popülasyonunda (710 adet), EMS popülasyonuna (52 adet) göre daha fazla olmuştur.

2016, 229 sayfa

Anahtar Kelimeler: Embriyo kültürü, etil metansülfonatın, kuraklık, mutasyon, sodyum azit.

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

EFFECTS OF CHEMICAL MUTAGENESIS ON *IN VITRO* PARAMETERS AND DROUGHT TOLERANCE OF WHEAT

Arash HOSSEIN POUR

Ataturk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Field Crops
Department of Cereals and Pulse Crops

Supervisor: Prof. Dr. Metin TOSUN

In vitro mutagenesis studies involving the mutagenic application with combination of *in vitro* techniques has begun recently. This study was carried out in wheat (Kırık cultivar) with two different chemical mutagen, ethyl methanesulfonate (EMS) and sodium azide, under *in vitro* and *in vivo* conditions in order to determine the optimal concentration to apply and develop the drought-tolerant bread wheat lines.

The effect of mutagen EMS in mature embryo culture had significant effect on the most of the traits. Increasing the concentration and duration of ethyl methanesulfonate, the average amount of callus formation were generally decreased. Whereas effects of the average regeneration efficiency (RE) and number of plants (NP) was taken into account based on different duration, the highest RE and NP were obtained from 6 h treatment, the lowest RE and NP were seen in 4 h treatment. Whereas, the highest average of RE and NP were obtained %0.4 and %0.3 concentration, while control application produced the lowest RE and NP. LD₅₀ value was observed in 8 hours treatment + %0.1 concentration for RE and NP parameters.

Treatment of sodium azide mutagen decreased callus formation, RE and NP, particularly this effect was evident at the higher concentrations and longer application duration. LD₅₀ value was 3 h treatment + 2 mM concentration in NP and 1 h treatment + 4 mM concentration in RE.

Based on average the RE and NP traits at different duration and concentration of Ethyl methanesulfonate (EMS) mutagenesis of mature seed-derived calli, resulted the highest RE and NP from 6 h treatment and 80 mM, the lowest RE and NP was observed in 4 h and control treatment. LD₅₀ value was 8 h treatment + 50 mM concentration both in NP and RE.

Based on average the RE and NP traits at different duration and concentration of sodium azide mutagenesis of mature seed-derived calli, resulted the highest RE and NP from 1 h treatment. Four hours treatment produced no plant. LD₅₀ value was 1 h treatment + 1 mM concentration both in NP and RE.

In this study, application of different durations and concentrations of EMS and NaN₃ affected to the germination, seedling and plantlets related parameters positively and negatively, respectively. Therefore, the LD₅₀ values of duration and concentration of applied both chemical mutagen was not determined.

M₂ seeds were kept in -10 bar PEG 6000 osmotic potential medium for germination to test the early stage drought (germination stage). Based on their germination performance, 710 seedlings from sodium azide and 52 seedlings from EMS study were selected.

2016, 229 pages

Keywords: Drought, embryo culture, ethyl methanesulfonate, mutation, sodium azide.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın, planlanıp yürütülmesinde bilgi birikimi ve engin tecrübelerini benimle paylaşan, her konuda çalışma azmi ve cesareti veren, tez çalışmamın her konusunda ilgi ve yardımlarını esirgemeyen, sosyal hayatımda her zaman desteğini ve değerli vaktini sabırla ayıran değerli hocam Sayın Prof. Dr. Metin TOSUN'a teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Tez çalışmamın başlangıcından, bitişine kadar her türlü desteği sunan, anlayış gösteren, yardımlarını esirgemeyen, bilgisini ve sosyal hayatımda her zaman desteğini ve değerli vaktini sabırla ayıran Sayın Prof. Dr. Kamil HALİLOĞLU'na teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Tez çalışmalarım süresince yardımlarını esirgemeyen Sayın Yrd. Doç. Dr Murat AYDIN'a, Doktora öğrencisi Sayın Farrokh LAFZİ, Gholamreza JANNATİ, Ali NADERİ, Hassn ATHARİ ve Sayın Arş. Gör Selçuk KODAZ ve Güller ÖZKANA'a,

Hayatım boyunca güzel namına yaptığım işlerin tamamına tüm güçleriyle maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen değerli annem Pari HOSSEIN POUR, **rahmetli babam Kamel HOSSEIN POUR**, ağabeylerim ve kız kardeşlerime ve her zaman ve her konuda beni yalnız bırakmayan sevgili eşim Kimya SEYYEDCHERAGHI'a ve ailesine teşekkür ederim.

Arash HOSSEIN POUR

Ocak, 2016

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	5
3. MATERYAL ve YÖNTEMLER	30
3.1. Bitki Materyali	30
3.2. Kallus Kültürü Ortamlarında Kullanılan Kimyasallar	30
3.2.1. Temel besi ortamı	30
3.3. Bitki Rejenerasyonu Ortamlarında Kullanılan Kimyasallar	35
3.4. Kullanılan Kimyasal Mutagenler Ve Konsantrasyonları	35
3.5. Kullanılan Yöntemler	35
3.5.1.a. Birinci yöntemin (<i>in vitro</i> mutagenesis) uygulanışı	36
3.5.1.b. Kallus ve bitki rejenerasyon ortamlarının hazırlanması	37
3.5.1.c. <i>İn vitro</i> mutagen uygulama	38
3.5.1.d. İncelenen karakterler	43
3.5.2. İkinci yöntemin uygulanışı	46
3.5.2.a. Kontrollü koşullarda yapılan işlemler ve incelenen konular	48
3.5.2.b. Tarla koşullarında yapılan çalışmalar	55
4. ARAŞTIRMA BULGULAR	61
4.1. Birinci Yöntemde Elde Edilen Bulgular	61
4.1.1. Olgun tohumlara mutagen uygulaması	61
4.1.1.a. Olgun embriyo kültürüne etil metansülfonatın (EMS) etkileri	61
4.1.1.b. Olgun embriyo kültürüne sodyum azitin (NaN ₃) etkileri	86
4.1.2. Kalluslara mutagen uygulamaları	110
4.1.2.a. Kallusa etil metansülfonatın (EMS) etkileri	110

4.1.2.b. Kallusa sodyum azitin (NaN_3) etkileri	129
4.2. İkinci Yöntemde Elde Edilen Bulgular	147
4.2.1. Kontrollü koşullarda yapılan çalışmalar.....	147
4.2.1.a. Etil metansülfonatın (EMS) uygulaması	147
4.2.1.b. Sodyum azit (NaN_3) uygulaması	171
4.2.2. M_2 Kuşağında Kurağa Toleranslı Genotiplerin Seçimi.....	199
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	201
5.1. Tartışma.....	201
5.2. Sonuç ve Öneriler.....	213
KAYNAKLAR	216
ÖZGEÇMİŞ	230

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

%	Yüzde
°C	Santigrat Derece
μM	Mikromolar
cm	Santimetre
da	Dekar
g	Gram
ha	Hektar
kg	Kilogram
kPa	Kilo paskal
L	Litre
m	Metre
M	Molar
m ²	Metrekare
Mbp	Mega baz çifti
mg	Miligram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
mol	Mol
N	Normal

Kısaltmalar

2,4-D	2,4-Diklorofenoksi asetik asit
ABA	Absisik asit
BAP	6-Benzil amino pürin
BS	Bitki sayısı
Ca	Kalsiyum
CEKO	Cevap veren embriyogenik kalus oluşum oranı
ÇG	Çimlenme gücü
ÇGİ	Çimlenme gücü indeksi
ÇH	Çimlenme hızı
ÇHİ	Çimlenme hızı indeksi
ÇHK	Çimlenme hızı katsayısı
ÇO	Çimlenme oranı
ÇU	Çim uzunluğu
Dikamba	3,6-Diklorobenzoik asit
EKO	Embriyogenik kalus oluşum oranı

EKSCE	Embriyogenik kallus sayısına göre cevap veren somatik embriyo sayısı
EKSCEK	Embriyogenik kallus sayısına göre cevap veren embriyogenik kallus oranı
EMS	Ethyl methane sulphonate
ESCEK	Eksplant sayısına göre cevap veren embriyogenik kallus oranı
ESCSE	Eksplant sayısına göre cevap veren somatik embriyo sayısı
ESEKO	Eksplant sayısına göre embriyogenik kallus oluşum oranı
FAO	Food And Agriculture Organisation
Fe	Demir
HKO	Hata kareler ortalaması
IAA	İndol-3-asetik asit
K	Potasyum
KBO	Kallus besi ortamı
KKA	Kök kuru ağırlığı
KO	Kalus oluşum oranı
KOU	Koleoptil uzunluğu
KS	Toplam embriyonal kök sayısı
KSCEK	Kallus sayısına göre cevap veren embriyogenik kallus oranı
KSCSE	Kallus sayısına göre cevap veren somatik embriyo sayısı
KSEKO	Kallus sayısına göre embriyogenik kallus oluşum oranı
KU	Kök uzunluğu
KYA	Kök yaş ağırlığı
MES	2-(N-morpholino) ethansülfonik asit
Mg	Magnezyum
Mn	Mangan
MS	Temel besi ortamı, Murashige and Skoog (1962)
N	Azot
NAA	Naftelan asetik asit
NaN ₃	Sodium azide
OÇZ	Ortalama çimlenme zamanı
P	Fosfor
pH	Asitlik derecesi
Pikloram	4-amino-3,5,6-trikloro pikolinik asit
RE	Rejenerasyon etkinliği
S	Kükürt
SD	Serbestlik derecesi
SKA	Sürgün kuru ağırlığı
SU	Sürgün uzunluğu
SYA	Sürgün yaş ağırlığı
TDZ	1-Fenil-3-(1,2,3-thidiazol-5yl) üre (Thidiazuron)
TÜBİTAK	Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. Sterilizasyon sonrası su emdirilmiş tohumun embriyosunun kesim kısımlarının gösterimi	38
Şekil 3.2. Olgun tohumlara EMS ve sodyum azit mutagenlerinin uygulanışı.....	40
Şekil 3.3. Kallusun 1. haftasına EMS ve sodyum azit mutagenlerinin uygulanışı.	42
Şekil 3.4. EMS ve sodyum azit mutagenleri uygulanmış tohumların çimlendirilmesi. .	49
Şekil 3.5. EMS ve sodyum azit mutagenleri uygulanmış tohumların kasalara ekilmesi ve yetiştirilmesi.	53
Şekil 3.6. EMS ve sodyum azit mutagenlerinin uygulanışından ve bitkilerin olgunluğuna kadar geçen dönemde yapılan bazı işlemler.	57
Şekil 3.7. M ₂ tohumlarında çimlenme döneminde kurağa toleranslı genotiplerin seleksiyonu ve sonrasında yapılan işlemler.....	60
Şekil 4.1. EMS'nin farklı süre ve konsantrasyonlarında meydana gelen kallusların görünüşleri.	62
Şekil 4.2. EMS'nin farklı süre ve konsantrasyonlarında meydana gelen embriyogenik kallusların görünüşleri.	67
Şekil 4.3. EMS'nin farklı süre ve konsantrasyonlarında meydana gelen cevap veren embriyogenik kallusların görünüşleri.	71
Şekil 4.4. EMS'nin farklı süre ve konsantrasyonlarında meydana gelen cevap veren somatik embriyoların (ok işareti ile gösterilmiştir) ve rejenere bitkilerin görünüşleri.	75
Şekil 4.5. Olgun embriyolara farklı süre ve dozlarda EMS uygulamasının rejenerasyon etkinliği üzerine etkileri.	80
Şekil 4.6. EMS'nin bazı süre ve konsantrasyonlarında meydana gelen bitkiciklerin magendada görünüşleri.	81
Şekil 4.7. Rejenere bitkilerin farklı ortamlarda görünüşleri.....	81
Şekil 4.8. Olgun embriyolara farklı süre ve dozlarda EMS uygulamasının bitki sayısı üzerine etkileri.	83
Şekil 4.9. Sodyum azitin farklı süre ve konsantrasyonlarında meydana gelen kallusların görünüşleri.	87

Şekil 4.10. Sodyum azitin farklı süre ve konsantrasyonlarında meydana gelen embriyogenik kallusların görünümümüleri.	92
Şekil 4.11. Sodyum azitin farklı süre ve konsantrasyonlarında meydana gelen cevap veren embriyogenik kallusların görünümüleri.	96
Şekil 4.12. Sodyum azitin farklı süre ve konsantrasyonlarında meydana gelen cevap veren somatik embriyoların (ok işareti ile gösterilmiştir) ve rejenere bitkilerin görünümüleri.	100
Şekil 4.13. Olgun embriyolara farklı süre ve dozlarda sodyum azit uygulamasının rejenerasyon etkinliği üzerine etkileri.	104
Şekil 4.14. Sodyum azitin bazı süre ve konsantrasyonlarında bitkiciklerin magendada görünümüleri.	105
Şekil 4.15. Rejenere bitkilerin farklı ortamlarda görünümüleri.	106
Şekil 4.16. Olgun embriyolara farklı süre ve dozlarda sodyum azit uygulamasının bitki sayısı üzerine etkileri.	107
Şekil 4.17. EMS'nin farklı süre ve konsantrasyonlarında meydana gelen embriyogenik kallusların görünümüleri.	111
Şekil 4.18. EMS'nin farklı süre ve konsantrasyonlarında meydana gelen cevap veren embriyogenik kallusların görünümüleri.	116
Şekil 4.19. EMS'nin farklı süre ve konsantrasyonlarında meydana gelen cevap veren somatik embriyoların (ok işareti ile gösterilmiştir) ve rejenere bitkilerin görünümüleri.	120
Şekil 4.20. Kallusa farklı süre ve dozlarda EMS uygulamasının rejenerasyon etkinliği üzerine etkileri.	123
Şekil 4.21. EMS'nin bazı süre ve konsantrasyonlarında meydana gelen bitkiciklerin magendada görünümüleri.	124
Şekil 4.22. Rejenere bitkilerin farklı ortamlarda görünümüleri.	125
Şekil 4.23. Kallusa farklı süre ve dozlarda EMS uygulamasının bitki sayısı üzerine etkileri.	126
Şekil 4.24. Sodyum azitin farklı süre ve konsantrasyonlarında meydana gelen embriyogenik kallusların görünümümüleri.	130
Şekil 4.25. Sodyum azitin farklı süre ve konsantrasyonlarında meydana gelen cevap veren embriyogenik kallusların görünümüleri.	135

Şekil 4.26. Sodyum azitin farklı süre ve konsantrasyonlarında meydana gelen cevap veren embriyogenik kallusların görünüşleri.....	138
Şekil 4.27. Kallusa farklı süre ve dozlarda sodyum azit uygulamasının bitki sayısı üzerine etkileri.....	141
Şekil 4.28. Sodyum azitin bazı süre ve konsantrasyonlarında meydana gelen bitkiciklerin magendada görünüşleri.	142
Şekil 4.29. Rejenere bitkilerin farklı ortamlarda görünüşleri.....	142
Şekil 4.23. Kallusa farklı süre ve dozlarda sodyum azit uygulamasının bitki sayısı üzerine etkileri.....	144
Şekil 4.31. EMS'nin farklı süre ve konsantrasyonlarında meydana gelen kök ve sürgünlerin görünüşleri.....	154
Şekil 4.32. EMS'nin farklı süre ve konsantrasyonlarda işlem uygulanmış tohumlar içerisinde toprak bulunan kasaların ekilmiş ve bu ortamda gelişen M ₁ fidelerinde görünüşleri.....	164
Şekil 4.33. Sodyum azitin farklı süre ve konsantrasyonlarında meydana gelen kök ve sürgünlerin görünüşleri.	180
Şekil 4.34. Sodyum azitin Farklı süre ve konsantrasyonlarda işlem uygulanmış tohumlar içerisinde toprak bulunan kasaların ekilmiş ve bu ortamda gelişen M ₁ fidelerinde görünüşleri.	191
Şekil 4.35. M ₂ tohumlarında çimlenme döneminde kurağa toleranslı genotiplerin seleksiyonu.....	200
Şekil 4.36. M ₂ tohumlarında çimlenme döneminde kurağa toleranslı genotiplerin seleksiyon sonrasında yapılan işlemler.	200

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. MS kültür ortamında kullanılan kimyasallar ve miktarları.....	31
Çizelge 3.2. MS tuzları ve vitaminlerine ilave olarak kullanılan kimyasallar	34
Çizelge 3.3. Oksin stok solüsyonunun hazırlanışı	34
Çizelge 3.4. Sitokinin stok solüsyonunun hazırlanışı	34
Çizelge 3.5. İki farklı eksplant'da Kullanılan kimyasal mutagenler ve konsantrasyonlar.....	35
Çizelge 3.6. EMS ve NaN ₃ stok solüsyonlarının hazırlanışı.....	35
Çizelge 4.1. Olgun embriyolara farklı süre ve dozlarda EMS uygulamasından sonra <i>in vitro</i> ortamda incelenen bazı karakterlere ait varyans analizi sonuçları.	64
Çizelge 4.2. Olgun embriyolara farklı süre ve dozlarda EMS uygulamasından sonra <i>in vitro</i> ortamda incelenen bazı karakterlere ait veriler.	65
Çizelge 4.3. Olgun embriyolara farklı süre ve dozlarda EMS uygulamasından sonra <i>in vitro</i> ortamda incelenen bazı karakterlere ait korelasyon katsayıları.	85
Çizelge 4.4. Olgun embriyolara farklı süre ve dozlarda sodyum azit uygulamasından sonra <i>in vitro</i> ortamda incelenen bazı karakterlere ait varyans analizi sonuçları.	89
Çizelge 4.5. Olgun embriyolara farklı süre ve dozlarda sodyum azit uygulamasından sonra <i>in vitro</i> ortamda incelenen bazı karakterlere ait veriler.	90
Çizelge 4.6. Olgun embriyolara farklı süre ve dozlarda sodyum azit uygulamasından sonra <i>in vitro</i> ortamda incelenen bazı ait korelasyon katsayıları.	109
Çizelge 4.7. Kallusa farklı süre ve dozlarda EMS uygulamasından sonra <i>in vitro</i> ortamda incelenen bazı karakterlere ait varyans analizi sonuçları.	113
Çizelge 4.8. Kallusa farklı süre ve dozlarda EMS uygulamasından sonra <i>in vitro</i> ortamda incelenen bazı karakterlere ait veriler.	114
Çizelge 4.9. Kallusa farklı süre ve dozlarda EMS uygulamasından sonra <i>in vitro</i> ortamda incelenen bazı karakterlere ait korelasyon katsayıları.....	128

Çizelge 4.10. Kallusa farklı süre ve dozlarda sodyum azit uygulamasından sonra <i>in vitro</i> ortamda incelenen bazı karakterlere ait varyans analizi sonuçları.	132
Çizelge 4.11. Kallusa farklı süre ve dozlarda sodyum azit uygulamasından sonra <i>in vitro</i> ortamda incelenen bazı karakterlere ait veriler.	133
Çizelge 4.12. Kallusa farklı süre ve dozlarda sodyum azit uygulamasından sonra <i>in vitro</i> ortamda incelenen bazı karakterlere ait korelasyon katsayıları.	145
Çizelge 4.13. Tohuma farklı süre ve dozlarda EMS uygulamasından sonra çimlenme ile ilgili bazı karakterlere ait varyans analizi sonuçları.	148
Çizelge 4.14. Tohuma farklı süre ve dozlarda EMS uygulamasından sonra çimlenme ile ilgili bazı karakterlere ait varyans analizi sonuçları ait veriler.....	149
Çizelge 4.15. Tohuma farklı süre ve dozlarda EMS uygulamasından sonra çim ile ilgili bazı karakterlere ait varyans analizi sonuçları.	156
Çizelge 4.16. Tohuma farklı süre ve dozlarda EMS uygulamasından sonra çim ile ilgili bazı karakterlere ait veriler.	157
Çizelge 4.18. Tohuma farklı süre ve dozlarda EMS uygulamasından sonra fide ile ilgili bazı karakterlere ait varyans analizi sonuçları.	166
Çizelge 4.19. Tohuma farklı süre ve dozlarda EMS uygulamasından sonra fide ile ilgili bazı karakterlere ait veriler.	167
Çizelge 4.21. Tohuma farklı süre ve dozlarda sodyum azit uygulamasından sonra çimlenme ile ilgili bazı karakterlere ait varyans analizi sonuçları.	173
Çizelge 4.22. Tohuma farklı süre ve dozlarda sodyum azit uygulamasından sonra çimlenme ile ilgili bazı karakterlere ait veriler.....	174
Çizelge 4.23. Tohuma farklı süre ve dozlarda sodyum azit uygulamasından sonra çim ile ilgili bazı karakterlere ait varyans analizi sonuçları.	182
Çizelge 4.24. Tohuma farklı süre ve dozlarda sodyum azit uygulamasından sonra çim ile ilgili bazı karakterlere ait veriler.	183
Çizelge 4.25. Tohuma farklı süre ve dozlarda sodyum azit uygulamasından sonra fide ile ilgili bazı karakterlere ait varyans analizi sonuçları.....	193
Çizelge 4.26. Tohuma farklı süre ve dozlarda sodyum azit uygulamasından sonra fide ile ilgili bazı karakterlere ait veriler.	194

1. GİRİŞ

Buğday, dünyada ve ülkemizde en önde gelen temel besin maddesi olması durumunu halen korumakta, bunun sonucunda da yaygın olarak yetiştirilmektedir. Erzurum yöresinde üretilen buğdayın çoğu üretici aileler tarafından tüketilmektedir. Üreticiler geleneksel ekmek yapımına uygun, alternatif karakterli ve beyaz taneli oluşu nedeniyle Kırık çeşidini tercih etmektedirler. Buğday üretiminin artırılabilmesi için son yıllarda kıraç ve sulu koşullarda yetiştirilebilecek yüksek verimli ve yöre ekolojisine uyumlu çok sayıda çeşit (Doğu 88, Karasu 90, Palandöken 97, Nenehatun) tescil edilmiş ve çiftçilerin kullanımına sunulmuş olmasına rağmen bu çeşitler kalite özelliklerinin yetersizliğinden dolayı bölge çiftçisi tarafından yeterince ve üretimleri yaygınlaşmamıştır. Bu durum yeni ıslah çeşitlerinin Kırık kadar uygun kalite özelliklerine sahip olmamaları ve tamamı mutlak kışlık olan bu çeşitlerin ekiminin çeşitli nedenlerle zamanında yapılamamasından kaynaklanmaktadır. Kırık'ın halen yöre çiftçileri tarafından en fazla tercih edilen bir çeşit olmasının en önemli nedeni ekmeklik kalitesinin yüksek ve alternatif karakterli olmasıdır. Çeşidin kalite özelliği, verime göre hep ön planda değerlendirilmektedir. Bu özelliklerine karşın, bölgede yetiştirilen diğer tescilli çeşitlere göre düşük verimli, zayıf saplı ve kuraklığa hassas bir çeşit olduğu kaydedilmiştir (Öztürk 2011). Kurağa dayanıklı bir çeşit geliştirmek amacıyla yapılabilecek ıslah çalışmalarından birisi mutasyon ıslahıdır. Eğer arzu edilen mutant tipler elde edilebilirse, melezleme ıslahına göre mutasyon ıslahı ile daha kısa sürede ve daha düşük maliyetle sonuca ulaşılabilecektir.

Dünyada ürün üretimi çevresel stresler tarafından büyük ölçüde sınırlandırılmaktadır. Dünyada ekilebilir alanların yalnızca %10'unun bazı stres formlarından uzak olduğu tahmin edilmektedir. Potansiyel verim ile elde edilen verim arasındaki farklılıktan sorumlu temel faktör çevresel strestir. Bitkisel üretimin yapıldığı alanlarda yaygın sorunlardan biri su yetersizliğidir. Bitkiler büyümeleri için fazla miktarda suya ihtiyaç duyarlar ve kuraklık yalnızca bitkinin büyüklüğünü değil, aynı zamanda çeşitli bitki kısımlarının gelişmesini de kısıtlar. Etki bazen o kadar büyük olur ki verim sıfıra yaklaşır (Blum 1989).

Son yıllarda iklimde meydana gelen değişimler de düşünüldüğünde stabil, yüksek verimli; kurağa, yatmaya, hastalık ve zararlılara dayanıklı ve aynı zamanda kaliteli buğday çeşitlerinin geliştirilmesi ıslah çalışmalarının en önemli hedeflerindedir. Bu nedenle, günümüzde yapılan ıslah çalışmalarında; verim ve kalite unsurları birlikte ele alınmakta, bir yandan birim alandan elde edilen verim miktarlarını artırma olanakları araştırılırken, diğer taraftan da değişik tüketici kesimlerinin isteklerine cevap verebilecek kalite özelliklerinin iyileştirilmesi amaçlanmaktadır (Kaya 2006).

Yeni çeşitlerin geliştirilmesinde bitki ıslahçısının görevi geniş alanların iklim ve toprak koşullarına uygun, verim ve kalitesi üstün çeşitleri bulup çıkarmak ya da eldeki çeşitlerin olumsuz yönlerini iyileştirmektir. Bu amaçla ıslahçılar, doğada mevcut varyasyonlardan ve geliştirdikleri yeni teknik ve yöntemlerden faydalanmaktadırlar. Bu teknik ve yöntemlerden biri olan geleneksel ıslah yöntemleri ile çok sayıda çeşit geliştirilmiş ve tarımın hizmetine sunulmuştur. Ancak, bu yöntemlerle çeşit geliştirmede uzun zamana, fazla emeğe ve kaynağa ihtiyaç duyulmaktadır. Bu nedenle, bitki ıslahçıları daha hızlı ve kolay varyasyon sağlayacak yeni yaklaşımlar üzerinde durmaktadırlar. Bu ıslah yöntemlerinden birisi mutasyon ıslahıdır (Bilgin 2005; Başer vd. 2007). Gill *et al.* (1974) mutagen uygulaması sonrası tek yıllık bitkilerde 4-6 yıl sonra yeni mutant bir çeşidin ortaya konulmasının mümkün olduğunu bildirmişlerdir.

Bitkilerde mutasyon ıslahı ile biyotik ve abiyotik stres faktörlerine dirençli veya toleranslı çeşitler geliştirilebilmektedir. Mutasyon, canlının genetik yapısında meydana gelen kalıcı değişiklikler olup hem üreme hücrelerinde hem de somatik hücrelerde meydana gelebilir. Özellikle vegetatif yolla çoğalan bitkilerde mutant bireylerin elde edilmesinde somatik mutasyonlar oldukça önemlidir. Çünkü somatik hücrelerin mutasyona uğramasıyla buradan gelişen organlar mutant özellik kazanırlar. Bitkilerde çeşitli mutagenlerle somatik mutasyonların teşvik edildiği ve istenilen özelliklerin sağlandığı birçok çalışma yapılmıştır (Griffiths 1996; Franks *et al.* 2002; De Oliveira Collet *et al.* 2005). Bitkilerde istenilen özellikteki mutasyonların kendiliğinden meydana gelme sıklığı çok düşüktür. Bu nedenle, birçok ıslah çalışmasında mutasyon

sıklığını artırmak amacıyla fiziksel veya kimyasal mutagenler kullanılmıştır (Ahloowalia and Maluszynski 2001; Aberathne *et al.* 2004; Saleem *et al.* 2005)

Kurağa dayanıklılık, bitkisel üretimin artırılmasında önemli bir özelliktir. Bu özellik, halkımızın temel besin kaynağı olan ve genellikle kuru tarım alanlarında yetiştirilen buğday için daha da kritik bir öneme sahiptir. Kısıtlı toprak nemi koşullarında verim düzeyini temelde çeşidin kurağa dayanıklılığı belirlemekte olup, yağışların yetersiz olduğu ürün yıllarında ülkemiz buğday ihtiyacının karşılanmasında ciddi sorunlar yaşanmaktadır.

Mutagenesis terimi, doğal olarak ya da mutagenik etmenleri yapay olarak uyarılan farklı mutasyon tiplerini meydana getiren mekanizmalarının ve farklı aşamalarının tamamını kapsamaktadır. Buna göre *in vitro* mutagenesis, *in vitro* yöntemlere kombine edilmiş mutagenesis aktivitelerinin tamamını içermektedir. Yine *in vitro* mutasyon ıslahı, bitki ıslahı amacıyla mutasyonel tekniklerin *in vitro* tekniklere kombine edildiği tüm aktiviteleri kapsamaktadır (Tosun 2015)

In vitro mutagenesis ve somaklonal varyasyon, doku kültürünün iki önemli teknikleridir. Bu teknikler sayesinde, genomun diğer kısımları değişmeksizin genotipin bir veya birkaç özelliği iyileştirilebilmektedir (Predieri 2001). Bu teknikler ile iyileştirmenin yapılabilmesi için etkin bir doku kültürü esasına dayanan rejenerasyon sistemi ve mutagenlerin eşik konsantrasyonları ile ilgili ön bilgilerin olması gerekir (Kumar 2009). Mutagenesiste gama ışınları gibi fiziksel mutagenler veya etil metansülfonat (EMS) gibi kimyasal mutagenler yaygın olarak kullanılmaktadırlar (Jain 2005).

Kırık çeşidinin geçmişte olduğu gibi, gelecekte de yetiştiricilerin gözde ve vazgeçilmez çeşidi olmaya devam edeceğini göstermektedir. Daha önce Öztürk (2011) tarafından yapılan çalışmada, tane verimi esas alındığında Kırık çeşidinin kurağa duyarlı olduğu ve hassas çeşitler arasında yer aldığı belirlenmiştir. Bu çeşide kurağa dayanıklılık kazandırılabilirse önemli verim artışı sağlanabilir.

Yapılacak ıslah çalışması neticesinde Kırık eşidinin kalite özelliklerine sahip, kuraklığa dayanıklı ve yüksek verimli hatların geliştirilmesi amaçlanmıştır. Islah çalışmasının ilk aşamasını kapsayacak olan bu araştırmada, iki farklı kimyasal mutagen uygulanmış ve elde edilen popülasyondan istenilen özelliklere sahip mutantlar seçilmeye çalışılmıştır. Bu alışma sonucunda geliştirilecek hatların, farklı ıslah programlarında gen kaynağı olarak ve/veya yeni bir çeşidin elde edilmesinde ana materyal olarak kullanılabilmeleri hedeflenmektedir.



2. KAYNAK ÖZETLERİ

Kuraklık, toprağın su içeriğinde bitki gelişmesini olumsuz etkileyecek kadar azalmaya neden olan yağışsız dönem olup; zamanı, şiddeti ve süresi değişkenlik gösteren karmaşık bir stres faktörüdür. Mitra (2001) bitkilerin kurağa dayanıklılık mekanizmalarını kuraktan kaçma (hayat devresini kurak dönemin başlangıcından önce tamamlama), kuraktan korunma (su alımını artırmak veya transpirasyonu azaltmak suretiyle dokunun su potansiyelini koruma) ve kurağa tolerans (koruyucu biyokimyasal ve fizyolojik mekanizmalarla su kaybını geciktirme) olmak üzere üç kategoride sınıflandırmıştır. Kuraklığın doğasındaki değişkenlik ve buğdayın kurağa tepki mekanizmalarının genetik kontrolünün henüz tam olarak anlaşılamaması (Deng *et al.* 2005; Caruso *et al.* 2009) kuru tarım koşullarında yüksek verim sağlayabilecek çeşitlerin geliştirilmesini zorlaştırmaktadır (Lopez *et al.* 2001).

Kuraklık bitkisel verimliliği düşüren önemli bir çevre stres faktörüdür (Hassan *et al.* 2004). Kuraklık stresine maruz kalan bitkiler bu koşullarda yaşayabilmek için çeşitli mekanizmalar geliştirmişlerdir. Bu mekanizmalar; yaşam döngüsünü (olgunlaşma süresi) ayarlama, derin kök sistemi oluşturma ve hücre düzeyinde bazı düzenlemelerin gerçekleştirilmesi (örneğin ozmoregülasyon) gibi faktörlerdir (Mohamed *et al.* 2000). Sadece tek bir özellikte değişimin gerçekleşmesi bitkilerin hayatta kalmaları için yeterli olmayabilir. Bazı araştırmacılar kurağa toleransta hücresel düzeyde değişikliklerin önemli olduğunu kaydetmişlerdir (Mohamed *et al.* 2000; Errabii *et al.* 2006).

Kuraklık, bitkisel üretimi dünya çapında ciddi bir şekilde kısıtlayan önemli bir sorun olup, günümüzde küresel iklim değişikliği bu durumu daha da ciddi hale getirmektedir (Pan *et al.* 2003). Bitki gelişimi ve tane verimi üzerine kurak koşulların etkisi, kuraklığın şiddetine ve kuraklığın meydana geldiği dönemde bitkinin gelişme dönemine bağlıdır. Fide çıkışı su eksikliğine duyarlı büyüme dönemlerinden birisidir. Fide tesisinin oranı ve derecesi; verimi ve olgunluk zamanını belirleyen önemli faktörlerdir (Rauf *et al.* 2007). Bu nedenle, iyi bir bitki tesisi için tohum çimlenmesi, gümrahlık ve koleoptil uzunluğu gibi karakterlerin yeterli düzeyde olması gerekir. Yarı kurak

bölgelerde, çimlenme sırasında düşük nem, çimlenmeyi kısıtlayıcı bir faktördür. Bazı araştırmacılar, özellikle tohum kuru topraklarda neme ulaşmak için derin ekildiğinde fide tesisinin başarılması için koleoptil uzunluğunun önemli olduğunu bildirmişlerdir (Dilday *et al.* 1990).

Laboratuvar şartlarında yürütülen kuraklık çalışmalarında yaygın olarak kullanılan polietilen glikol (PEG 6000), moleküler ağırlığı ozmotik potansiyeli etkileyecek kadar küçük, ancak bitki tarafından absorbe edilemeyecek kadar büyüktür, bu nedenle bitki dokularına hızlı bir şekilde penatre etmesi beklenmez (Carpita *et al.* 1979). Fidelerin erken gelişim döneminde kurağa dayanıklılık yönünden yapılacak seleksiyonlarda kuraklığı uyarmak için PEG gibi kimyasallar çimlendirme ortamında sıklıkla kullanılmaktadır. Besin solüsyonu kültürünün ozmotik potansiyelini modifiye etmek için PEG'in kullanılabileceği ve böylece bitkilerde deneysel protokollere uygun nispeten kontrollü bir şekilde su eksikliğinin temin edilebileceği bildirilmiştir (Money 1989; Zhou 1997).

Polietilen glikol (PEG) yüksek moleküler ağırlığa sahip olduğundan dolayı, kuru topraklardakine benzer şekilde su potansiyelini düşüren ve dokuya penatre etmeyen ozmotik etmen olarak bitkilerde kuraklık stresinin uyarılmasında uzun zamandan beri kullanılmaktadır (Larher *et al.* 1993).

Domateste yapılan bir çalışmada, PEG ile uyarılmış su stresinin kallusların büyümesi, ozmotik potansiyeli ve rejenerasyonu üzerine olan etkileri araştırılmıştır. Rejenerasyon süresince *in vitro* koşullarda kuraklık stresinin uyarılması, morfogenez tepkileri üzerine kuraklığın etkilerinin çalışılması için güvenilir bir uygulama olduğu bildirilmiştir (Sakthivelu *et al.* 2008).

Farklı ekmeklik buğday genotiplerinin erken gelişme dönemlerinde kuraklığa dayanıklılık durumlarını belirlemek amacıyla Öztürk (2011) tarafından yapılan bir çalışmada Kırık çeşidinin kuraklığa hassas olduğu belirlenmiştir.

Bir takım etmenler bitkilerde mutasyonları uyarabilme özelliğindedir. Böyle etmenler mutagen adını alırlar. Mutasyon ıslahı yoluyla dünya genelinde geliştirilmiş çeşit sayısı 3218 tane olup, mutant çeşit sayısı bakımından buğday (284 adet); çeltik (814 adet) ve arpadan (309 adet) sonra üçüncü sırada gelmektedir. Dünya genelinde mutasyon ıslahı yoluyla geliştirilmiş çeşit sayısı azımsanamayacak kadar çok olmasına rağmen, ülkemizde mutasyon ıslahı yoluyla geliştirilmiş çeşit sayısı oldukça azdır ve bunlar arasında buğday bulunmamaktadır. 2012 yılı itibariyle ülkemizde tescilli mutant çeşit sayısı 7 adet olup, bunlardan 2 tanesi soya, 2 tanesi tütün, 1 tanesi arpa, 1 tanesi nohut ve 1 tanesi de susam türüne aittir (Tosun 2015).

Bitki ıslahının genetik varyasyonun oluşturulması ve seleksiyon olmak üzere iki temel prensibi bulunmaktadır. Bunlardan her iki süreç bilgiye ve elle çalışmaya dayalıdır. Son yirmi yılda bitki hücre ve doku kültürünün gelişmesiyle birlikte ıslah çalışmalarının bir kısmını tarladan laboratuvar koşullarına aktarmak mümkün olmuştur. Islah çalışmaları için yararlı özellikler bakımından genetik varyasyonun olması gerekir. Arzu edilen varyasyon bulunmadığında fiziksel veya kimyasal mutagenler uygulanarak arzu edilen karakterler yönünden mutasyonlar (genetik varyasyonlar) oluşturulmaya çalışılır (Akgun and Tosun 2004).

Islah edilmesi düşünülen karakterin ilgili türün gen havuzu içerisinde bulunmaması nedeniyle, melezleme ve seleksiyonun yapılamadığı durumlarda, mutasyon ıslahı en uygun yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır. Ayrıca, mutasyon ıslahı, transgenik bitkilerin kullanımı ve yetiştirilmesi gibi sınırlamalara, fikri mülkiyet hakları ve yönetmeliklere tabi değildir (Alston 2004; Dobres 2008). Yapay mutasyon uygulamaları sonucu arzu edilen karakterin bulunma sıklığı oldukça düşüktür, bu yüzden, arzu edilen karakter için çok sayıda bitkinin taranması başarı şansını artıracaktır (Fehr 1993).

Kimyasal mutagenler; mutasyon oluşturmak amacıyla radyasyonun dışında birçok kimyasal madde de kullanılmaktadır. Kimyasal mutagenlerin sayısı çok olmakla birlikte, bitkilerde mutasyonların uyarılmasında yalnızca birkaçı yaygındır. Bunların çoğu alkilleştirici etmenler sınıfına aittir (Tosun 2015).

Mutasyonların uyarılmasında en kritik faktör mutagenin konsantrasyonudur. Genel bir kural olarak, belli bir konsantrasyona kadar mutagenin konsantrasyonu arttıkça, normalde daha fazla mutasyon oluşmakta, ancak yüksek konsantrasyonlar aynı zamanda daha fazla fide hasarına ve ölüme neden olmaktadır (Jenks *et al.* 2007). Yüksek konsantrasyonlarda ortaya çıkan azalma, hücresel düzeyde gerçekleşen fizyolojik veya fiziksel düzensizliklerden kaynaklanmış olabilir.

Buğdayda mutasyonların uyarılmasında sıcaklık önemli bir faktör olup, kimyasal mutagenesiste sıcaklık mutagenin yarılanma ömrü üzerinde etkili olup, EMS'nin yarılanma ömrü için en uygun sıcaklığı 30°C'de 26 saat olduğu kaydedilmiştir (Jenks *et al.* 2007). Sıcaklık mutagenik solosyonunun hidroliz hızını da etkiler. Düşük sıcaklıklarda hidroliz hızı azalır, mutagen daha uzun bir süre sabit kalır (Jenks *et al.* 2007). Mutagenesisin başarısını etkileyen diğer bir deneysel faktör, kimyasal mutagenin pH'sıdır. Örneğin EMS için en etkili pH 7.0'dir (Singh and Kole 2005).

Mutagenik uygulamanın nihai amacı, bitki ıslahçıların, mutantlar arasında ekonomik önemi olan karakterleri seçebilecekleri varyabiliteyi uyarmaktır. Islah amaçları açısından mutagenik uygulamaların düşük fizyolojik etki, buna karşın güçlü genetik etkiler oluşturmaları arzu edilir (Ndou 2012).

Kimyasal mutagenlerin uygulaması basit ve zararlı etkisi daha az olduğu için bazı araştırmacılar tarafından radyasyona tercih edilmektedir. Bununla birlikte, mutasyon oluşturmak amacıyla kullanılan kimyasalların toksik ve kanserojenik oldukları unutulmamalıdır. En yaygın olarak kullanılan kimyasal mutagen alkalleştirici etmen olan etil metansülfonattır (EMS). Kimyasal mutagenlerin etkileri, iyonize edici radyasyonlardan daha az şiddetli olup, daha fazla gen mutasyonu, daha az koromozom mutasyonlar oluşur. Buna göre kimyasal mutagenlerin iyonize edici radyasyona göre daha fazla mikromutasyon oluşturmaları beklenebilir. Ancak, kromozomal anormalliklerin gen mutasyonuna oranı mutagenlere göre büyük değişiklik gösterir (Tosun 2015).

Kimyasal mutagenler daha spesifik ve tahmin edilebilir mutasyonlara sebep olmakta ve ayrıca uygulaması daha kolay olup, özel ve pahalı ekipmanlar gerektirmemektedir (Luan *et al.* 2007).

Mutagenesis mutasyon sıklığını normal oranın üzerine çıkarmak için bir tür biyolojik materyalin fiziksel veya kimyasal mutagene maruz bırakılması şeklinde tanımlanabilir (Kodym and Afza 2003). Işınlamanın kolayca başarılmadığı durumlarda kimyasal mutagenler başarılı bir şekilde uygulanabilir. Ayrıca, fiziksel mutagenlerle karşılaştırıldığında kimyasal mutagenler kromozomal değişimlerden ziyade gen mutasyonlarını artırabilirler (Van Harten 1998; Predieri 2001; Toker *et al.* 2005).

Mutasyon oluşturmak amacıyla fiziksel veya kimyasal mutagenler yalnız veya kombinasyon halinde kullanılabilirler, ancak kombine uygulamalarla geliştirilmiş çeşit sayısı çok azdır. Dünya genelinde 3218 mutant çeşitten 369 tanesi yalnızca kimyasal mutagen uygulamasıyla doğrudan geliştirilmiştir (Sung 1976; Van Harten 1998).

Çeltikte arzu edilen varyasyonları uyarmak için çeşitli kimyasal (EMS ve sodyum azit) ve fiziksel (gamma ışınları, X- ışınları ve hızlı nötronlar) mutagenler yaygın bir şekilde kullanılmıştır. Kimyasal mutagenler temelde nokta mutasyonlarını uyarırlar, bu nedenle yanlış anlamlı ve anlamsız mutasyonların elde edilmesinde ideal kimyasallardır. Buna karşın, iyonize edici radyasyonlar normalde kromozomların yeniden şekillenmelerine ve delesyonlara (kayıplara) neden olurlar (Bhat *et al.* 2007).

Alkilleştirici etmenler, kimyasal mutagenlerin ilk sınıfı olup, İkinci Dünya Savaşı sırasında (Auerbach and Robson 1946) tarafından hardal gazının ve benzer bileşiklerin mutagenik etkilerinin ortaya konulması ile birlikte keşfedilmiştir. Hardal gazı, metil metansülfonat (MMS), etil metansülfonat (EMS) ve nitrözguanidin gibi alkilleştirici etmenlerin DNA üzerine bazı etkileri bulunmaktadır. Bunlardan EMS potansiyel mutagenik etkisi ve kullanım kolaylığı nedeniyle bitkilerde en yaygın kullanılan kimyasal mutagendir. EMS, guanin (G) bazını alkilleştirir ve alkilleşen guanin sitozin (C) yerine timin (T) ile eşlenir, böylece DNA ipliğinde AT ↔ GC geçişleri meydana

gelir (Kenganal *et al.* 2008). EMS tüm genomda öldürücü olmayan çok sayıda nokta mutasyonunu oluşturabildiğinden genomun mutasyona doyurulması için nispeten küçük bir popülasyona (yaklaşık 10.000) uygulama yapılması yeterlidir (Bhat *et al.* 2007). EMS'nin kullanıldığı mutasyon çalışmalarında genomun büyüklüğü, mutasyonların oluşması açısından önemli bir faktör olarak gözükmemektedir. Örneğin, gen başına mutasyon sıklığı *Arabidopsis* ve mısırdaki (genom büyüklüğü *Arabidopsis*'in yaklaşık 20 katı) benzer olmuştur (Henikoff and Comai 2003; Till *et al.* 2003).

Etil metansülfonat, rastgele bölgelerde (Sung 1976) yüksek sıklıkta mutasyonlara (Schy and Plewa 1989) sebep olduğu ve bunlar içerisinde kromozomal anormalliklerin sıklığı düşük olduğu için tercih edilen mutagenlerden biridir. Etil metansülfonat özellikle kallus gibi hızlı bir şekilde bölünen ve çoğalan hücrelere uygulandığında en etkili olmakta, çünkü bu sırada hücreler DNA'larını replike etmekle uğraştıklarından mutasyonların hatalı onarılma ihtimali çok yüksektir (Kilbey and Hunter 1983).

EMS'nin kullanıldığı *in vitro* mutagenesis, bitkilerde varyasyonun oluşturulmasında çok etkili bir yöntemdir (Bhagwat and Duncan 1998; Kodym and Afza 2003; Hofmann *et al.* 2004). Etkili bir selektif etmenle ilişkili etkili rejenerasyon sistemleri, çevresel streslere toleranslı varyantların değerlendirilmesinde *in vitro* seleksiyon yönteminin temel bir parçasıdır (Van den Bulk *et al.* 1990); (Jain 2001); (Predieri 2001); (Dita *et al.* 2006); (Predieri and Di Virgilio 2007).

Diğer bir kimyasal mutagen olan sodyum azit (NaN_3) laboratuvarlarda çeşitli amaçlar için yaygın olarak kullanılan kimyasal bir bileşiktir (Rines 1985). Sodyum azit pozitif sodyum iyonu ve negatif azit iyonunu içeren beyaz kristal tozudur. Metabolik zehir olan sodyum azit hücrelerde belli anahtar enzimleri engeller ve bitkiler için potansiyel bir mutagendir. Sodyum azitin bitki fizyolojisini etkilediği bildirilmiştir (Wen and Liang 1995).

Sodyum azit çok sayıda bitki türünde (*Triticum durum*, *Triticum aestivum*, *Oryza sativa*, *Hordeum vulgare*, *Zea mays*, *Arachis hypogaea*, *Helianthus annuus*, *Saccharum*

officinarum, *Lactuca sativa* ve *Musa* spp.) biyotik ve abiyotik streslere dayanıklı veya toleranslı çeşit geliştirmek veya kaliteyi iyileştirmek amacıyla kullanılmıştır (Okubara *et al.* 1994; Bhagwat and Duncan 1998; Rascio *et al.* 2001; Jeng *et al.* 2003; Molina-Cano *et al.* 2003; Jeng *et al.* 2006; Kiruki *et al.* 2006; Ali *et al.* 2007; Mondal *et al.* 2007; Nakata *et al.* 2008; Skoric *et al.* 2008; Suzuki *et al.* 2008; Venegas-Calcrón *et al.* 2008; He *et al.* 2009; Oliver *et al.* 2009).

Sodyum azit biyokimyasal, fizyolojik, sitolojik ve genel süreçler üzerine olan etkisi nedeniyle çimlenmenin gecikmesine ve büyümenin yavaşlamasına sebep olmaktadır. Bu kimyasal uygulanarak elde edilen mutantlar içerisinde klorofili eksik mutantların yüksek oranda bulunduğu bildirilmiştir. Sodyum azit gen düzeyinde mutasyonlara sebep olabileceği gibi, kromozomal mutasyonlara da neden olabilir (Bahaa El Den 1993; Del Campo and Coletto 1999). Kallus aşamasındaki hücreler aşırı derecede duyarlı olup, hücrede mutasyon oluşturan azidoalanin olarak adlandırılan mutagenik etmen üretirler. Bu kimyasal mutagen bitki hücrelerinde son derece mutagenik etmen olan amino asit analogu L-azidoalanine ($N_3-CH_2-CH(NH_2)-COOH$) metabolize edilir. Bunun oluşumunun O-asetilserin sülfhidrilaz enzimine bağlı olduğu belirlenmiştir (La and Mongold 1987). Buradan, sodyum azitin mutagenitesinin bir çok fiziksel ve fizyolojik parametreye bağlı olduğu sonucuna varılabilir. Bu nedenle söz konusu mutagen tarafından üretilen mutagenite değişkendir. Sodyum azitin mutagenik etkisinin azit bileşiğinin organik metabolitini üretmesiyle ortaya çıktığı kabul edilmektedir (Owais and Kleinhofs 1988).

Mutagen uygulamaları sonucunda oluşturulan mutant popülasyonlar içerisinde istenilen özelliğe sahip olanlar seçilerek doğrudan kullanılabilir veya seçilen genotipler melezleme programında anaç olarak kullanılabilirler (dolaylı kullanım). Mutagenlerle uyarılan gen mutasyonları resesif veya dominant olabilirler, ancak büyük çoğunlukla resesiftir (Poehlman 1994). Örneğin, başak ve sap özellikleri bakımından mutasyonla uyarılmış morfolojik değişikliklerin sıklıkla gözlemlendiği arpada sık başaklı ve sert gövdeli (erektoit tipler) 70 mutasyondan yalnızca iki tanesi başak sıklığı bakımından

dominant olmuştur (Briggs and Knowles 1967). Bu nedenle, mutasyonlar M_1 kuşağında fark edilemez, seleksiyona M_2 kuşağında başlanır.

Kimyasal mutagenlerin avantajları ve dezavantajları şu şekilde sıralanmıştır (Tosun 2015):

Avantajları; (1) Temelde nokta mutasyonlarını oluştururlar. Bu nedenle, mutasyon spektrumu muhtemelen fiziksel mutagenlerden farklıdır. (2) Fiziksel mutagenler göre daha az koromozomal hasar oluştururlar. (3) Yüksek sıklıkta mutasyonlar oluşturabilirler.

Dezavantajları; (1) Çok hücreli bitki dokusuna penetrasyonu genellikle zordur. (2) Uygulama yöntemlerinin standardizasyonu tam olmadığından sonuçların yeniden elde edilebilirliği muhtemelen çok düşüktür. (3) Kimyasal mutagenlerin kanserojenik özellikleri nedeniyle uygulamalar tehlikeli olabilir.

Biyoteknolojinin hızla ilerlemesi, *in vitro* bitki hücre ve doku kültürü tekniklerinin ıslah çalışmalarında kullanımını oldukça yaygınlaştırmıştır. *In vitro* tekniklerin tek başına veya mutagenlerle kombine halde kullanımı, büyük populasyonlar içerisinde istenilen genotipin seçilmesi ve çoğaltılması için bitki ıslahçılarına yeni ve geniş imkanlar sağlar. Vejetatif olarak üretilen bitkilerin ıslah çalışmalarında, *in vitro* tekniklerle beraber mutagenesinin kombinasyonu etkili bir yöntem olup bu durum bitkilerde çeşitliliğin artmasına, istenilen genotipin klasik yöntemlerden daha kısa bir sürede ve küçük bir alanda çoğaltılmasına ve bu aşamayı takiben seleksiyonuna imkan vermektedir (Das *et al.* 2000; Ahloowalia and Maluszynski 2001; Saif-Ur-Rasheed *et al.* 2001; Saleem *et al.* 2005; El-Sayed *et al.* 2007; Lu *et al.* 2007; Szarejko and Forster 2007). *In vitro* mutagenesiste fiziksel (gama ışınları) ve bazı kimyasal mutagenler (EMS ve MMS gibi) yaygın olarak kullanılmaktadır (Jain 2005).

In vitro mutagenesis, çeşidin yalnızca bir veya birkaç özelliğinin değiştirilmesine, buna karşın diğer tüm karakterlerin korunmasına imkan veren bir uygulamadır. Ayrıca, küçük

parçacık steril koşullarda kültüre alındıklarından herhangi bir mutant kaybı olmamaktadır (Ling *et al.* 2008). Mutagenesiste fiziksel (gama ışınları) veya EMS ve MMS gibi kimyasal mutagenler yaygın olarak kullanılmaktadır (Jain 2005). Bitki doku kültüründe fiziksel ve ya kimyasal mutagenlerin nispeten düşük konsantrasyonda uygulanmaları hücre çoğalmasını, çimlenme hızını, hücre büyümesini, enzim aktivitesini, strese dayanıklılığı ve ürün verimini artırmaktadır (Chakravarty and Sen 2001). Bitkilerde mutasyonların uyarılmasında en yararlı kimyasal mutagenler Etil metan sulfonat (EMS), Dietil sulfat (DES), etilenimin (EI), Etilnitros uretan (ENU), metil nitrosoure (MNH) gibi alkilleştirici etmenler sınıfına ait olanlardır. Fiziksel mutagenlerle karşılaştırıldıklarında kimyasal mutagenler daha çok gen mutasyonuna, buna karşın daha az kromozomal mutasyona sebep olurlar (Novak and Micke 1987).

In vitro mutagenesis fenotipik ve genotipik varyasyonların uyarılmasında önemli bir araçtır. Rejenere bitkilerde ortaya çıkan doğal varyasyon somaklonal varyasyon olarak adlandırılır ve bu kallus kokenli bitkiciklerde yaygın bir olaydır.

Bitki doku kültürü, bitkilerin steril koşullarda yapay besi ortamlarında geliştirilmesidir. Doku kültürü tekniklerinden yararlanarak, bitkiden alınan herhangi bir parça (eksplant) ile kısa sürede bitkinin istenen kısımlarının veya tüm bir bitkinin çoğaltımı mümkündür. Doku kültürü koşulları ile elde edilen doku çeşitlerinin başında kallus gelmektedir. Kallus, sürekli bölünmekte olan farklılaşmamış hücre yığını olarak tanımlanmaktadır (Babaoğlu *et al.* 2001).

Doku kültüründe yüksek oranda ve sıklıkla meydana gelen fenotipik varyasyonlara somaklonal varyasyon denmektedir. Bu varyasyonlar, genetik temelli olabileceği gibi epigenetik temelli de olabilmektedirler (Peredo *et al.* 2006). Somaklonal varyasyon, mikroüretimde büyük kayıplara neden olmakla birlikte, yeni varyantların ve çeşitlerin elde edilmesi açısından, günümüz biyoteknolojisinde önemli yer tutmaktadır (Kaeppeler *et al.* 2000). *In vitro* mutagenesis ve somaklonal varyasyon, doku kültürünün iki önemli teknikleridir. Bu teknikler sayesinde, genomun diğer kısımları değişmeksizin genotipin bir veya birkaç özelliği iyileştirilebilmektedir (Predieri 2001). Bu teknikler ile

iyileştirmenin yapılabilmesi için etkin bir doku kültürü esasına dayanan rejenerasyon sistemi ve mutagenlerin eşik konsantrasyonları ile ilgili ön bilgilerin olması gerekir (Kumar 2009).

Kültür ortamındaki hücrelere ve dokulara mutagen uygulaması biyolojik çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Böyle bir uygulamanın şu avantajları olabilir; (1) Bir somatik hücrede mutasyon oluştuğunda küçük bir alanda çok sayıda homojen birey yetiştirilebilir. (2) Özellikle herhangi bir kimyasala karşı (örneğin herbisite dayanıklılık) kültür ortamında etkili bir spesifik seleksiyon yapılabilir. (3) Tarla koşullarında seleksiyon yapılırken, arzu edilen özellikleri seçebilmek ve stabil duruma getirebilmek için birkaç yıl veya bir kaç kuşak seleksiyon yapmak gerekir. Buna karşın, yaygın bir seleksiyon baskısı altında *in vitro* kuşallarında arzu edilen özellikler yönünden seçim daha kısa sürede tamamlanabilir ve ıslah süresi önemli ölçüde kısaltılabilir. (4) Tek haploit bitki seçildiğinde, kromozom sayısı katlanarak tamamen homozigot diploit elde edilir. Bu bitki ıslahında veya genetik çalışmalarda çeşitli amaçlar için kullanılabilir (Tosun 2015).

Somatik embriyogenesis yoluyla *in vitro* rejenerasyon diğer birçok yöntemden daha fazla dikkat çekmekte, çünkü nispeten kısa bir sürede çok sayıda bitki üretilabilmektedir (Hildebrand *et al.* 1991; Kita *et al.* 2007). Somatik embriyogenesis orjinal doku ile iletim demetimi bağlantısı bulunmayan zigotik olmayan hücreden, zigotik embriyoya benzer bipolar yapının uyarıldığı eşeysiz üreme olarak tanımlanır (Zimmerman 1993) (Namasivayam 2007). Somatik embriyogenesis, çok sayıda rejenerant elde edilme avantajına ilaveten, kimeraların düşük sıklıkta oluşması ve somaklonal varyasyonun sınırlı düzeyde gerçekleşmesi nedeniyle bitki rejenerasyon sistemi olacak organogenesisden çok daha caziptir (Ahloowalia 1991; Henry *et al.* 1998; Gaj 2001).

Somatik embriyogenesisin avantajlarından bazıları şu şekilde sıralanabilir. (1) Somatik embriyolar tek bir hücreden kaynaklanırlar, bu nedenle bitki türüne göre değişmek üzere kimera ya en aza indirilir veya tamamen elemine edilir. (2) Somatik embriyo hücre süspansiyonu, doğrudan mutant somatik embriyoların elde edilmesi için idealdir. (3)

Somatik embriyolar çimlenmede zigotik embriyolar gibi davranabilirler. (4) Tek bir somatik embriyodan normal tohum gibi çimlenebilen somatik tohum elde edilebilir. (5) Ağaç türlerinde bitki rejenerasyonu için en uygun yaklaşımdır. Somatik embriyogenesinin bazı dezavantajları ise şunlardır. (1) Süreç genotipe yüksek derecede bağımlıdır, bu nedenle farklı genotipler için kültür ortamının modifikasyonu gerekebilir. (2) Birçok türde somatik embriyoların çimlenme oranı çok düşüktür. (3) Somatik embriyogenik kültürler taze kültür ortamında düzenli bir şekilde alt kültüre alınmazlarsa özelliklerini kaybedebilirler.

In vitro dokulara mutagen uygulaması mutasyon spektrumunu genişletebilen doğal mutasyonların oranını artırır (Jain and Maluszynski 2004). Kimyasal mutagenler kolayca uygulanabilirler. Sağlık üzerine tehlikeli etkileri olsa da radyasyon uygulamasında olduğu gibi ekipmanlar gerekmez. Sürgün uçlarına veya diğer organlara mutagen uygulandığında kimeralar oluşur, bu durumda kimeraları elemine etmek için M₁V₄ kuşağına kadar sürekli vejetatif olarak çoğaltması gerekebilir (Jain 2000; Predieri 2001). Normalde kimeralar, sürgün ucu veya aksilar tomurcuklar gibi çok hücreli yapılara mutagen uygulamasından sonra rejenere edilmiş bitkilerde önemli bir sorundur. Mikroçoğaltım sürgün ucu veya aksilar tomurcuklar kullanılacak mutant bitkilerin çoğaltılmasında ideal bir sistemdir (Ahloowalia 1998).

In vitro mutagenesis özellikle muz, patates ve *Gypsophyla paniculata* L. gibi vejetatif olarak çoğalan bitkilerde ıslah programlarında mutasyon tekniklerinin etkinliğinin artırılmasında oldukça önemlidir (Kulkarni *et al.* 2007; Barakat and El-Sammak 2011). Alkilleştirici etmenler grubunda yer alan EMS tatlı patates, muz, asma, soya, petunya, gül ve krizantem gibi bitkilerde somaklonal varyasyonun oluşturulmasında çok etkili bir mutagendir (Omar *et al.* 1989; Bhagwat and Duncan 1998; Van Harten 1998; Nonomura *et al.* 2001; Predieri 2001; Kodym and Afza 2003; Hofmann *et al.* 2004; Latado *et al.* 2004) (Khawale *et al.* 2007; Luan *et al.* 2007; Berenschot *et al.* 2008).

Bidabadi *et al.* (2012) muzda işlem uygulanmış sürgün ucu kültürlerinin canlılığında, büyümesinde ve rejenerasyon kapasitesinde EMS'nin farklı konsantrasyonlarının aşamalı bir şekilde azalmaya neden olduğunu bildirmişlerdir.

Meyve ıslahında *in vitro* mutagensis ve somaklonal varyasyonunun önemli dokü kültürü teknikleri olduğunu bildiren Kumar *et al.* (2010), kaba limonda (*Citrus jambhiri* Lush.) *in vitro* da mutasyonu teşvik etmek için fiziksel (gama ışınları) ve kimyasal (EMS ve MMS) mutagenleri kullanmışlardır. Denemede kimyasal mutagenler 45 ve 60 günlük kalluslara farklı konsantrasyonlarda (%0.1, 0.2, 0.3 ve 0.4) uygulanmıştır. Araştırmacılar, canlı kallus sayısına ve regenrasyon potansiyeline göre değerlendirdiklerinde en uygun kimyasal mutagen konsantrasyonunun %0.1 olduğunu ve uygulamanın 45 günlük kalluslara yapılması gerektiğini bildirmişlerdir.

Stevia rebaudiana bitkisinde yapılan bir çalışmada (Pande and Khetmalas 2012) sodyum azit ve kolçisin uygulamasının tohum çimlenmesi ve kallus oluşumu üzerine etkileri incelenmiştir. Eksplant olarak kullanılan tohumlar ve yaprak parçaları sodyum azit ve kolçisinin değişen konsantrasyonlarına (%0-0.250) oda sıcaklığında 12 ve 24 saat süreyle maruz bırakılmışlardır. Mutagenlerin konsantrasyonu arttıkça çimlenme oranı azalmıştır. Ayrıca, yaprak eksplantlarının; her iki mutagene maruz bırakılma süresi kallus oluşumunu ve gelişimini etkilemiştir. Araştırmacılar, mutagenlerin konsantrasyonu arttıkça kallus oluşumunun geciktiğini bildirmişlerdir.

Sodyum azitin kültür ortamındaki meristematik hücreler üzerine görülebilen etkisi kallus oluşumunu veya çoğalmasını engellemektir. Bu durum, hücre döngüsünün S fazında DNA replikasyonunu engelleme etkisinden kaynaklanabilir. Ayrıca, uyarılmış bazı mutant biyokimyasallar elektron zinciri gibi solunum zincirlerinin engellenmesine sebep olabilirler (Johnsen *et al.* 2002).

Citrus jambhiri tohumlarına gama radyasyonunun farklı konsantrasyonları ve EMS (%0.2, 0.3 ve 0.4) ve metil metansülfonatın (MMS) (%0.05, 0.1 ve 0.2) farklı konsantrasyonları uygulandıktan sonra tohumlar mutagensiz MS besi ortamında

çimlendirilmiştir. Fideler bu ortamda 45 gün süreyle gelişmeye bırakılmış ve daha sonra epikotiller alınmıştır. Bu epikotiller, içerisinde EMS ve MMS'nin daha önce belirtilen konsantrasyonlarını içeren rejenerasyon ortamında (MS + 0.5 mg/L BAP) 24 °C' de 4 saat süre ile bekletilmişlerdir. Araştırmacılar, rejenerasyon potansiyeline göre hem EMS hem de MMS için en uygun konsantrasyonun %0.2 olduğunu belirlemişlerdir (Sharma *et al.* 2013).

Arora *et al.* (1989) ve Jamil and Khan (2002) buğdayda mutagenesin yüksek konsantrasyonlarında tohumların çimlenme oranının yüksek olduğunu gözlemlemişler. Araştırmacılar, mutagenetik uygulamalara bağlı olarak çimlenme oranındaki azalmanın hücresel içreklerini moleküler düzeyde zarar görmelerinden veya enzim aktivitesinin değişmesinden kaynaklanabileceğini ifade etmişlerdir.

Yer fıstığında somatik embriyogenesis ve bitki rejenerasyonu üzerine mutagenlerin etkilerini belirlemek amacıyla yapılan bir çalışmada Muthusamy *et al.* (2007) hipokotil eksplantlarından elde edilmiş embriyogenik kalluslara gama ışınları, EMS ve sodyum azit mutagenleri uygulanmış, denemede embriyonik kallusların yaş ağırlığının ortalama somatik embriyo sayısının ve rejenerasyon kapasitesinin mutagenlerin düşük konsantrasyonunda daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Yine, pamukta ovüller kallusların büyüme hızının mutagenin düşük konsantrasyonunda arttığı bildirilmiştir (Muthusamy 2001). Aynı şekilde Palanivel (1998), yer fıstığında gama ışını, EMS ve sodyum azitin düşük konsantrasyonu/konsantrasyonlarında kallus büyüme hızının, çoklu sürgün oluşumunun, somatik embriyo oluşumunun ve çimlenmenin arttığını belirlemişlerdir. Mutagen uygulanmış eksplantlar doku kültürüne alındıklarında her ekplanttan rejenere olan sürgün sayısının düşük konsantrasyonlarda arttığı, buna karşın konsantrasyondaki artışla birlikte orantılı olarak azaldığı tespit edilmiştir (Swanson *et al.* 1989). Benzer gözlemler, *Gerbera* (Laneri *et al.* 1989), *Asparagus* (Delbreil and Jullien 1994), yer fıstığı (Venkatachalam *et al.* 1999), kasava (Lee *et al.* 1998; Joseph *et al.* 1999), gül (İbrahim *et al.* 1998), mango (Manzanilla-Ramirez *et al.* 2001), *Gladiolus* (Kasumi *et al.* 2001), tatlı patates (Lee *et al.* 2002), lotus (Arunyanart and Soontronyatara 2002) ve çeltik (Lee *et al.* 2003) gibi birçok türde de belirlenmiştir.

Yem bezelyesinde gelişme ve verimle ilgili bazı parametreler üzerine sodyum azitin mutagenik etkilerini belirlemek amacıyla yapılan bir denemede, düşük konsantrasyonlarda (%0.016 ve 0.031) vejetatif gelişme ve verim parametrelerinde önemli değişiklikler meydana geldiği tespit edilmiştir. Buna karşın yüksek konsantrasyonların (%0.125 ve 0.250) kötü etkiler oluşturduğu belirlenmiştir. Kontrolle karşılaştırıldığında düşük konsantrasyonlarda çimlenme oranında önemli bir azalma olduğu, yüksek konsantrasyonlarda ise herhangi bir çimlenme gerçekleşmediği bildirilmiştir. Sodyum azitin %0.031'lik konsantrasyonu sürgün uzunluğunda bazı genotiplerde artışa, bazılarında ise azalmaya sebep olmuştur. Yine, düşük konsantrasyonlar yaprak alanında önemli bir artışa neden olmuş, ancak klorofil içeriğinde herhangi bir değişiklik oluşturmamıştır. Diğer taraftan, tüm genotiplerde konsantrasyon arttıkça bitki başına bakla sayısı artmıştır (Mshembula *et al.* 2012).

Krizantemde mutagen olarak EMS kullanılmak suretiyle *in vitro* mutagenesis yoluyla tuza toleranslı mutant elde edilmiştir. Mutant varyete tuza toleransındaki artış kontrol bitkilere göre süperoksit dismutaz, askorbat peroksidaz ve dehidro askorbat redüktaz enzimlerinin aktivitelerindeki artıştan, buna karşın zar hasarında azalmadan kaynaklandığı bildirilmiştir (Hossain *et al.* 2006).

Qin *et al.* (2011) tarafından yenedünyada (*Eriobotrya japonica*) bitkisinde yapılan bir çalışmada, anter kökenli embriyolar kullanılmak suretiyle *in vitro* mutagenesiste EMS'nin etkileri araştırılmıştır. Denemede EMS uygulamasının anter kökenli embriyoların canlılığında ve konformasyonunda değişikliklere sebep olduğu belirlenmiştir. EMS'nin konsantrasyonuna (%0.1-0.9) ve uygulanma süresine (0.5, 1 ve 2 saat) bağlı olarak tüm EMS uygulamaları canlılıkta azalmaya sebep olmuş ve ölüm oranı %50'nin üzerinde gerçekleşmiştir. Maksimum canlılık oranı (%46.2) EMS'nin % 0.3'lük konsantrasyonunda ve 0.5 saatlik uygulama süresinde; minimum canlılık oranı (%2) ise EMS'nin %0.7'lik konsantrasyonundan ve 2 saatlik uygulama süresinde elde edilmiştir.

Fasulyede EMS ve N-nitröz-N'-etil üre (ENU) mutagenlerinin kallus gelişimi üzerine etkilerini araştırmak amacıyla yapılan bir çalışmada (Svetleva 2005) 7 günlük steril bitkilerden elde edilen yaprak petiol eksplantlarından gelişen kalluslar kullanılmıştır. Her iki mutagen eksplantlara 2.5×10^{-2} ve 6.2×10^{-3} M konsantrasyonlarda 15, 30, 60 ve 90 dakika süreyle uygulanmıştır. Uygulama süresi kallus gelişimini etkilemiş ve her iki mutagen için 30 dakikalık uygulamanın yapıldığı ortamda gelişen kalluslar en yüksek ağırlıkta olmuştur. Buna karşın, 90 dakikalık uygulama kalluslarının kahverengileşmesine ve gelişmenin engellenmesine sebep olmuştur. Araştırmacılar, genel olarak ENU'nun EMS'den daha güçlü etki oluşturduğunu ve kallus gelişimi üzerine alt kültür sayısının mutagenik uygulamadan daha yüksek etkiye sahip olduğunu kaydetmişlerdir.

Bezelyede (*Pisum sativum* L.) mutasyon ıslahı ve *in vitro* mutagenesis konusunda yapılan çalışmada tohumlara, fiziksel mutagen olarak gama radyasyonunun 6 ile 14 kr konsantrasyonları, kimyasal mutagen olarak ise sodyum azitin 0.001 ve 0.003 M olmak üzere iki farklı konsantrasyonu uygulanmıştır. Mutagen uygulanmış tohumlar, sürgün rejenerasyonu için iki farklı sitokinin (10 uM TDZ ve 50 uM BAP) içeren MS besi ortamlarında kültüre alınmışlar ve gelişen sürgünler 2.5 uM NAA içeren köklendirme ortamına aktarılmışlardır. Köklenen bitkicikler daha sonra iklim odasındaki saksılara alınmış ve çevre koşullarına alıştırılmıştır. Araştırma sonucunda, sodyum azit uygulamasının başlangıçta tohumların çimlenmesini gama ışınlarına göre olumsuz etkilediği, ancak bu uygulamada sürgün ve kök oluşumunun daha iyi gerçekleştiği tespit edilmiştir. Mutagenlerin konsantrasyon oranları arttıkça bu özelliklerin olumsuz yönde etkilendikleri saptanmış, özellikle yüksek konsantrasyonların düşük konsantrasyonlara ve kontrole göre oldukça önemli hasarlara yol açtığı kaydedilmiştir (Divanlı 2003).

Mısırdaki 18-599 nolu kendilenmiş homozigot hattına ait olgun embriyolardan elde edilen embriyogenik kalluslara gama ışını ve sodyum azit mutagenleri uygulanmış ve tuza toleranslı mutantları seçmek için %1.0'lık NaCl içeren ozmotik ortam kullanılmıştır. Denemede 200 Gy gama ışını + 1 mmol/L sodyum azit kombinasyonunun mutasyon

oluşturmak için en etkili olduğu belirlenmiştir. Tuza toleranslı mutant hat (18-599 M) anaçlarına göre kurağa çok daha toleranslı olmuştur (He *et al.* 2009).

Van *et al.* (2008) tarafından soyada yapılan bir çalışmada olgunlaşmamış embriyolara farklı konsantrasyonlarda (0.0, 0.2, 0.4 ve 0.8 mM) EMS uygulanmış ve bitkiler rejenere edilmeye çalışılmıştır. Araştırmacılar EMS'nin tüm konsantrasyonlarında embriyo oluşumu ve rejerasyonun kontrole göre daha yüksek olduğunu belirlemişlerdir. Aynı şekilde Sharma *et al.* (2013), *Citrus jambhiri*'de farklı konsantrasyonlarda gama ışını uygulanmış tohumlardan elde ettikleri eksplantlara *in vitro* ortamda etil metansülfonat (EMS; 0.2, 0.3 ve %0.4) ve metil metansülfonatin (MMS; 0.05, 0.1 ve %0.2) farklı konsantrasyonlarını uygulamışlar. Araştırmacılar, rejenerasyonun, EMS'nin tüm konsantrasyonlarında kontrole göre daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Pius *et al.* (1994) EMS'nin bir çok stres faktöründen biri olduğunu ve *in vitro* ortamda bitki rejenerasyonu üzerine uyarıcı etkiye sahip olduğunu bildirmişlerdir. Touraev *et al.* (1997) mikrospor kültüründe stres uygulamasının embriyogenesinin başlamasını uyardığını kaydetmişlerdir. Aynı şekilde (Gaj 2002), EMS'nin benzer stres koşullarının uygulanabileceğini ifade etmiştir. Bu nedenle, somatik embriyogenesiste EMS uygulaması kontrolden daha etkili olabilir.

Soyada olgun tohumda ve hücre süspansiyon kültürlerinde mutasyonları uyarmak amacıyla EMS kullanılmıştır (Sung 1976; Wilcox *et al.* 1984; Fujii and Tano 1986). Eksplantlara kimyasal mutagen uygulaması ve bunların somatik embriyogenesis ile kombine edilmesi mutagenesis için ilgi çekici bir *in vitro* teknik olabilir (Deane *et al.* 1995; Ahloowalia 1998; Gaj 2002). Van *et al.* (2008) soyada EMS uygulamasından sonra somatik embriyogenesiste artış olduğunu gözlemlemişlerdir. Kimyasal mutagenesis ve somatik embriyogenesinin kombinasyonu mutanların elde edilmesi, mutasyonların uyarılmasında somatik embriyo kültürün kullanımı konusunda genetikçilere ve bitki ıslahçılara bilgi temin edebilir. Ayrıca bu yöntem, bitkilerin performansının iyileştirmek ve bitkinin genom yapısı hakkında bilgimizi artırmak için de kullanılabilir.

Bhagwat and Duncan (1998) muzda *in vitro*'da geliştirilen sürgün uçlarına farklı konsantrasyonlarda EMS, sodyum azit ve dietil sülfat uygulamışlar ve mutagenler tarafından uyarılan varyasyon miktarının uygulama süreleri arasında önemli bir farklılık göstermediğini belirlemişlerdir.

In vitro'da sodyum azit uygulamasında, 1 saat + 1 mM ve 2 saat + 2 mM uygulamalarında kontrole göre daha yüksek bitki sayısı elde edilmiştir. Castillo *et al.* (2001) tarafından arpada yapılan bir çalışmada, ikisi model çeşit (*Igri* ve *Cobra*) biri ise tepkisi düşük çeşit (*Volga*) olmak üzere üç çeşit kullanılmış ve bu genotiplerde anterlere ve izole edilmiş mikrosporlara 10^{-3} , 10^{-4} ve 10^{-5} M konsantrasyonlarında sodyum azit uygulanmıştır. Araştırmacılar, M_2 kuşağında 616 adet katlanmış haploit elde etmişler, bunlardan 63 tanesinin arzu edilen morfolojik ve gelişimsel özelliklere sahip olduklarını belirlemişlerdir. Sodyum azitin 10^{-4} M'lık konsantrasyonunun anter başına bölünen mikrospor sayısını uyarıcı etkiye sahip olduğunu kaydeden araştırmacılar, kontrolde 26.6 olan bölünen mikrospor sayısının olduğunu, 10^{-4} M'lık sodyum azit konsantrasyonunda bu rakamın 30.5'e yükseldiğini bildirmişlerdir. Ayrıca, 10^{-3} M'lık konsantrasyonun bitki rejenerasyonunu önemli ölçüde artırdığı (kontrolde %8.6, 10^{-3} M'lık konsantrasyonda %18.2) tespit edilmiştir. Bununla birlikte, 10^{-4} M'lık sodyum azit konsantrasyonunun rejenerasyon oranını önemli ölçüde etkilemediği (%10.6) belirlenmiştir.

Buğdayda tohum çimlenmesi üzerine EMS uygulamasının etkisini belirlemek amacıyla (Bahar and Akkaya 2009) tarafından yapılan bir denemede 3 farklı EMS (0.1, 0.2, and 0.3%) konsantrasyonu uygulanmıştır. Bu uygulamaların tohum çimlenmesi, koleoptil oluşumu, ilk yaprak oluşumu, kök uzunluğu, koleoptil uzunluğu, fide boyu, fide büyüme oranı, ilk yaprak uzunluğu, kök ve sürgün yaş ve kuru ağırlıkları üzerine olan etkileri incelenmiştir. Araştırmacılar, EMS uygulamasının, değerlendirilen tüm karakterler üzerine etkili olduğunu ve EMS konsantrasyonları arasındaki farklılığın istatistiksel olarak önemli olduğunu kaydetmişlerdir. Denemede, EMS'nin konsantrasyonu arttıkça incelenen tüm özelliklerin azaldığını tespit edilmiştir.

Makarnalık buğdayda (*Triticum durum*) yapılan bir çalışmada (Spano *et al.* 2003), bitki başına başak sayısının anaçlarda ve mutantlarda yaklaşık aynı olduğu belirlenmiştir. Denemede 1000-tane ağırlığının kontrole göre daha fazla, buna karşın embriyo ağırlığının daha düşük olduğu saptanmıştır. Ayrıca, mutantlardan dört tanesinde tanenin azot içeriğinin anaç materyale göre daha düşük olduğu belirlenmiştir.

Sakin (1998) tarafından makarnalık buğday (*Triticum durum* Desf.) Gediz-75 ve Sofu çeşitlerinde yapılan bir çalışmada gama ışını ve EMS'nin M_1 ve M_2 bitkileri üzerindeki etkileri belirlenmiştir. Araştırmacı, EMS'yi %0.1, %0.2, %0.3 ve %0.4'lük konsantrasyonlar halinde uygulamıştır. Araştırmada sonuçlarına göre; iki makarnalık buğday çeşidinde, M_1 ve M_2 bitkilerinde incelenen karakterler üzerinde mutagenlerin farklı etkiler meydana getirdiği ve bu etkilerin çeşitlere göre değiştiği belirlenmiştir. Araştırmacı, gama ışını ve EMS uygulamasının, M_1 bitkilerinde incelenen özellikler üzerinde olumsuz etkiler meydana getirdiğini ve bu etkilerin, konsantrasyon arttıkça daha da belirgin bir şekilde ortaya çıktığını kaydetmiştir. Diğer taraftan, M_2 bitkilerinde belirlenen mutasyon spektrumu ve mutasyon sıklığının çeşitlere ve mutagenlere göre farklılık gösterdiği ifade edilmiştir. Araştırmacı, en uygun EMS konsantrasyonunun Gediz-75 için %0.4, Sofu çeşidi için ise %0.3 olduğunu belirlemiştir.

Şenay ve Çiftçi (2005b) tarafından makarnalık buğdayda (*Triticum durum* Desf.) yapılan bir çalışmada farklı gama ışını (50-150-250 Gy) ve EMS konsantrasyonları (%0.2 ve 0.4) ayrı ayrı ve birlikte kullanılmıştır. Araştırmada kontrol ve M_1 bitkilerinde gama ışını ve EMS'nin tek ve birlikte uygulanmasının iklim odasında yetiştirilen fidelerde çıkış oranını etkilemediği, ancak çıkışta gecikmelere neden olduğu belirlenmiştir. Araştırmacılar inceledikleri özellikler yönünden tek ve birleşik uygulamalarda artan mutagen konsantrasyonlarına bağlı olarak önemli düzeyde azalmalar meydana geldiğini ve birleşik uygulamaların iki mutagenin toplam etkisinden daha etkili olduğunu bildirmişlerdir (Şenay and Çiftçi 2005a). Yine, aynı araştırmacılar inceledikleri özellikler yönünden tek ve birleşik uygulamalarda artan mutagen konsantrasyonlarına bağlı olarak M_1 bitkilerinde önemli düzeyde azalmalar meydana geldiğini kaydetmişlerdir. Yine makarnalık buğdayda (Çiftçi and Şenay 2005)

tarafından yapılan diğ er bir çalışmada M₁ bitkileri incelenmiş, bu kuşakta çıkış oranının kontrole göre %0.96-4.83 oranında daha az olduğu tespit edilmiş ve çeşitli klorofil mutasyonu tipleri gözlenmiştir.

Arıraman *et al.* (2014) tarafından yapılan bir çalışmada *Cajanus cajan*'dan tohum çimlenmesi, fide gelişimi ve fide canlılığı üzerine gama radyasyonunun farklı konsantrasyonlarının ve EMS'nin farklı konsantrasyonlarının (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, ve 50 mM) etkileri araştırılmıştır. EMS'nin konsantrasyonu arttıkça kontrole göre çimlenme oranı azalmış ve çimlenme oranına göre LD₅₀ (letal doz) değeri belirlenmiştir. Araştırıcılar EMS için LD₅₀ değerinin 25 mM'lık konsantrasyonda gözlemlediğini bildirmişlerdir. Fide boyu, fide hasarı, fide canlılık indeksi ve 30. günde yaşayan fide sayısının EMS'nin konsantrasyonu arttıkça aşamalı bir şekilde azalmıştır.

Jatropha curcas'ta yapılan bir çalışmada (Dhakshanamoorthy *et al.* 2010) kuru tohumlara gama ışınları ve EMS (%1, 2, 3, 4) uygulanmış ve çimlenme oranı, kök uzunluğu, sürgün uzunluğu, fide uzunluğu, bitki boyu ve diğer bazı karakterler yönünden değerlendirmeler yapılmıştır. Araştırıcı, EMS'nin %1'lik konsantrasyonunun tohumların çimlenme oranını artırdığını, buna karşın %4'l k konsantrasyonunun azaltığını bildirmiş ve ayrıca yüksek konsantrasyonun (%4) incelenen tüm karakterler için engelleyici etki gösterdiğini kaydetmiştir.

İki tütün genotipinde mutagen konsantrasyonunda ki artışla birlikte çimlenme oranında aşamalı bir azalma gözlemlenmiş ve EMS'nin %0.5'lik konsantrasyonunda ölüm oranı %50'den daha fazla olmuştur (Amarnath and Prasad 1998). *Arabidopsis*'e EMS uygulandıktan sonra oluşan mutantlar kontrol (yabani tip) bitkilere göre kloros lfiron herbisitine 300 kat daha toleranslı olmuşlardır (Haughn and Somerville 1986).

Dhakshanamoorthy *et al.* (2010), *Jatropha curcas*'ta kuru tohumlara farklı konsantrasyonlarda gama ışını ve farklı konsantrasyonlarda (%1, 2, 3 ve 4) EMS uygulamışlar. Denemede tohum çimlenme oranı; kök uzunluğu, sürgün uzunluğu, fide boyu ve güç indeksi ile gelişme ve verim karakterleri, bitki boyu; çiçeklenmeye kadar

olan gün sayısı ve daha birçok karakter incelenmiştir. Araştırmacılar, %1'lik EMS uygulamasının ise engelleyici etki gösterdiğini tespit etmişlerdir.

Kaba limonda EMS'nin konsantrasyonu arttıkça tohumların çimlenme oranının azaldığı, kontrolde %62.2 olan çimlenme oranının %0.2, %0.3, ve %0.4'lük EMS konsantrasyonlarında sırasıyla %62.9, %60.1 ve %58.7 olduğu tespit edilmiştir. Yine, tütünde EMS'nin konsantrasyonu arttıkça çimlenme oranının aşamalı olarak azaldığı ve %0.5'lik konsantrasyonda ölüm oranının %50'nin üzerinde olduğu belirlenmiştir (Sharma *et al.* 2013). Aynı şekilde, (Kumar and Mishra 2004), *Abelmoschus esculentus*'ta EMS'nin konsantrasyonu arttıkça çimlenme oranının genellikle azaldığını bildirmişlerdir.

Bhosale *et al.* (2013) *Vigna mungo* tohumlarını gama ışını (10-50 kr) ve EMS'nin (%0.1-0.5) farklı konsantrasyonlarına maruz bırakılmışlar ve M₁ kuşağında tohum çimlenmesi, fide hasarı, polen kısırlığı, olgunlukta yaşayan bitki oranı ve ölüm oranını artırmışlar. Araştırmacılar, mutagenlerin konsantrasyonu arttıkça tohum çimlenmesi ve olgunlukta yaşayan bitki oranının azaldığını; fide hasarı, polen kısırlığı ve letalitenin arttığını tespit etmişlerdir.

Çemen tohumlarına gama ışınları, EMS ve sodyum azit uygulandıktan sonra tohum çimlenmesi, fide boyu, bitki canlılığı ve polen fertilitesi gibi karakterler incelenmiştir. Denemede mutagenlerin konsantrasyonu/konsantrasyonları arttıkça fide boyu ve polen fertilitesinin azaldığı tespit edilmiştir. Her üç mutagenin en düşük konsantrasyonları daha az biyolojik hasar oluşturmuş, dolayısıyla arzu edilen mutantların elde edilmesi için düşük konsantrasyonların daha uygun olduğu ifade edilmiştir (Bashir *et al.* 2013). Mutagenik uygulamalar sonucunda tohum çimlenmesindeki azalma moleküler düzeyde hücre içeriklerinin zarar görmesinden veya enzim aktivitesinin değişmesinden kaynaklanabilir (Khan and Goyal 2009; Roychowdhury and Tah 2011).

Sodyum azidin tohum çimlenmesi ve bitki canlılığı üzerine etkisi, *Nigella*, *Plantago* ve *Trigonella* bitkilerinde de belirlenmiştir (Prabha *et al.* 2010). Bu bitkilerde en düşük

çimlenme oranı sodyum azitin 4.5 mM'lık konsantrasyonunda ve 8 saatlik uygulama süresinde gerçekleşmiştir.

Mutasyon oluşturmak amacıyla tohumlara yapılan uygulamalarda yaygın olarak kullanılan sodyum azidin arpada morfolojik ve fizyolojik karakterlerde oldukça geniş bir varyasyona sebep olduğu kaydedilmiştir (Kleinhofs *et al.* 1978a).

Dianthus'ta M₁ kuşağında tohumun çimlenmesi ve bazı agro-metrik karakterler üzerine kimyasal mutagenlerin etkisini belirlemek amacıyla yapılan bir çalışmada (Roychowdhury and Tah 2011) EMS, sodyum azit ve kolçisinin üç farklı konsantrasyonu (%0.1, 0.4 ve 0.7) kullanılmıştır. Deneme de, EMS ve sodyum azitin konsantrasyonu arttıkça çimlenme oranı ve canlılığın azaldığı ve en yüksek ölüm oranının EMS'nin %0.7'lik konsantrasyonunda gerçekleştiği belirlenmiştir. Yine, mutagenik konsantrasyon arttıkça polen kısırlığının arttığı ve en yüksek polen kısırlığının (%61.1) kolçisinin %0.7'lik konsantrasyonunda meydana geldiği kaydedilmiştir.

Mutagenlik uygulamalar sonucunda ortaya çıkan tohum çimlenmesindeki azalma, tohum çimlenmesi için gerekli fizyolojik ve biyolojik süreçlerin (enzim aktivitesi de dahil) gecikmesine veya engellenmesine ve mitotik süreçlerin engellenmesine bağlı olabilir (Mensah *et al.* 2007). Sodyum azitin çimlenme üzerine engelleyici etkisi, oksidatif fosforilasyonu engelleyen sitokrom oksidazın güçlü inhibitörleri olan azit anyonlarından kaynaklanabilir (Kleinhofs and Sander 1975). Ayrıca bu, proton pompasının potansiyel inhibitörü olup, mitokondriyel zar potansiyelini değiştirir (Zhang 2000). Bu etkiler birlikte ATP'nin biyosentezini engelleyebilirler, böylece elverişli ATP miktarı azalır ve bu durum çimlenme hızının yavaşlamasına ve çimlenme oranının azalmasına sebep olabilir. Cheng and Gao (1988) arpa tohumlarına sodyum azit uygulamışlar ve çimlenme oranının önemli derecede azaldığının tespit etmişlerdir.

Macrotyloma uniflorum'da tohum çimlenmesi, bitki canlılığı ve bazı kantitatif karakterler üzerine mutagenlerin etkilerini belirlemek amacıyla yapılan bir çalışmada

(Sadashiv *et al.* 2012) tohumlara gama radyasyonu (100-400 Gy) ve EMS'nin (%0.2-0.5) farklı konsantrasyonu/konsantrasyonları ile bunların kombinasyonları uygulanmıştır. Denemede mutagenlerin konsantrasyonu/konsantrasyonları arttıkça tohum çimlenmesi ve bitki canlılığının aşamalı bir şekilde azaldığı belirlenmiştir. En yüksek çimlenme oranı (%86.2) gama ışınının 100 Gy konsantrasyonunda EMS'nin %0.2'lik konsantrasyonunda ve bunların 100 Gy + % 0.2'lik kombinasyonunda gerçekleşmiştir. Canlılık oranında en önemli düşüş, her iki mutagenin yüksek konsantrasyonlarında ortaya çıkmıştır. Tüm mutagenik uygulamalar M₁ kuşağında bitki boyunda, bitki başına birincil dal sayısında, ilk çiçeklenme içim gerekli gün sayısında, bakla uzunluğunda, bakla başına tohum sayısında ve bitki başına tohum veriminde azalmaya sebep olmuştur.

EMS'nin konsantrasyonu arttıkça çimlenme oranının azaldığı farklı baklagillerde yapılan çalışmalarda belirlenmiştir (Auti 2005; Barshile 2006; Senapati *et al.* 2008; Giriya and Dhanavel 2009).

Ndou (2012) etil metansülfonatin güçlü bir mutagen olduğunu, konsantrasyonu arttıkça ve uygulama süresi uzadıkça büyümeyi şiddetli bir şekilde engellediğini bildirmiştir. Bu bağlamda, M₁ bitkilerinde çeşitli mutagenlerin biyolojik etkilerinin belirlenmesinde fide boyu iyi bir ölçüt olarak yaygın bir şekilde kullanılmıştır (Ahloowalia and Maluszynski 2001). Sadashiv *et al.* (2012), mutagenik uygulamalar sonrasında gerçekleşen tohum çimlenmesindeki azalmaların; genetik, sitolojik ve metabolik süreçlerde ortaya çıkan değişikliklerin etkisine bağlı olabileceğini bildirmiştir. Tohum çimlenmesindeki düşüş, temelde mutagenlerin tohumların metabolik aktivitelerine müdahale etmelerinden kaynaklanabilir (Sjodin 1962). Sinha and Godward (1972), tohum çimlenme oranında ve canlılıktaki azalmanın sebebi fizyolojik düzeydeki bozuklukların kromozomal hasarla olmasından kaynaklanabileceğini ifade etmişlerdir.

Çimlenme süresince görev alan enzimlerin oluşumundaki düzensizlikler, özellikle kimyasal mutagenik uygulamaların sebep olduğu fizyolojik etkilerden biri olabilir (Kulkarni 2011).

Mutagen uygulamalarından sonra tohumların çimlenme oranında gözlemlenen düşüşler nokta mutasyonlarına veya genetik materyaldeki diğer hasarlara bağlı olabilir. Böyle hasarlar solunum oranında ve enerji üretiminde azalmaya ve nihayetinde tohum çimlenmesinde düşüşe sebep olabilirler (Sadashiv *et al.* 2012).

Mutasyon çalışmaları *Capsicum* bitkisinde (biber bitkisinde), EMS mutagenesisin varyasyonda artışını bir çok özellikte örneğin yaprak genişliği, çiçeklenme zamanı, meyve zamanı ve bitki boyu gözlenmiştir. Böyle bir varyasyon arzu edilen karakterlerin ıslahı için önemli olabilir (Jabeen and Mirza 2002).

Buğdayda tane rengi, gövde pasına dayanıklılık ve erkencilik gibi birçok bitki ve tohum karakterini etkileyen tarımsal ve morfolojik olarak önemli birçok mutant belirlenmiştir (Chopra 2005). Yulafta yeni nişasta mutantlarının izolasyonu ve karakterizasyonu başarılmıştır (Verhoeven *et al.* 2004).

Buğdayda EMS uygulanmış tohumların çimlenmesi konsantrasyon oranı arttıkça azalmıştır. Tohum çimlenmesinin nispi olarak azalması veya uyarılması tohumun meristematik dokusuna 24 mutagenin etkisine bağlı olmuş olabilir (Ahloowalia and Maluszynski 2001).

Yüksek konsantrasyonda/konsantrasyonlarda tohum çimlenmesindeki azalma, hücresel düzeyde ortaya çıkan düzensizliklerden (fizyolojik ya da fiziksel düzeyde) kaynaklanmış olabilir (Ndou 2012). Nitekim çavdarda (Akgun and Tosun 2004), çamda (Thapa 2004) ve nohutta (Khan *et al.* 2005; Toker *et al.* 2005) gama radyasyonunun konsantrasyonu arttıkça çimlenme oranının azaldığı belirlenmiştir.

Çimlenme için geçen gün sayısı, çimlenme oranı ve fide boyu gibi karakterler mutant bitkiler arasındaki biyolojik etkileri belirlemek için ölçüt olarak kullanılabilir (Singh *et al.* 2000). Örneğin mutasyon uyarma programlarında en uygun EMS konsantrasyonunu belirlemek için %50 çıkış için gerekli gün sayısı, çimlenme oranı ve fide boyu gibi karakterlerden yararlanabileceği bildirilmiştir (Ndou 2012). Mutagen konsantrasyonu

arttıkça tohum çimlenme oranı azalmaktadır. Singh and Kole (2005) çimlenmede ciddi azalmanın etkili bir mutagenesisin göstergesi olduğunu ifade etmişlerdir. Aynı şekilde (Khan *et al.* 2004), mutagenik uygulamaların tohum çimlenmesinde azalmayı beraberinde getirdiğini kaydetmişlerdir.

Adamu *et al.* (2002), mutagen konsantrasyonu arttıkça fide çıkışının geciktiğini ve tohum çimlenmesinin azaldığını bildirmişlerdir. Fide çıkışı süresinin ve hızının genetik yapı, tohum dormansisi, tohum gücü, ekim derinliği, toprağın direnci ve havalanma durumu, sıcaklık ve su temini gibi faktörlerin interaksyonu tarafından kontrol edildiği kaydedilmiştir.

Mutasyonların uyarılmasında mutagen konsantrasyonu en kritik faktördür. Genel bir kural olarak, örneğin EMS konsantrasyonunda artış, normalde daha fazla mutasyon sıklığına sebep olur, ancak bunlar aynı zamanda daha fazla fide hasarına ve ölüme neden olurlar (Jenks *et al.* 2007).

Arpada çimlenme kapasitesi, fide boyu, fide canlılığı ve bitki başına verim üzerine EMS'nin çok etkili bir mutagen olduğu gözlenmiştir (Adamu and Aliyu 2007). Yine Arpada yapılan bir çalışmada (Kleinhofs *et al.* 1978b), EMS'nin %0.5'lik konsantrasyonu mutasyonları artırmış, çimlenme oranını ise azaltmıştır. Konsantrasyon arttıkça fizyolojik hasarlar artmış ve nihayetinde hücre ölümlerine sebep olmuştur. Ndou (2012) tarafından yapılan bir çalışmada kullanılan tüm çeşitlerde EMS konsantrasyonu arttıkça buğdayda fide boyunun azaldığı belirlenmiştir.

Padavai and Dhanavel (2004) ve Ndou (2012) tarafından yapılan çalışmalarda tüm çeşitlerde tohum çimlenme oranında kontrole göre kayda değer bir azalma olduğu tespit edilmiştir. Yine, EMS'nin yüksek konsantrasyonları tohum çimlenmesini ve fide boyunu azaltmış ve ayrıca fidenin çıkışı için gerekli gün sayısını artırmıştır (Ndou 2012). Aynı şekilde, *Abelmoschus esculentus*'da EMS ve gama radyasyonun konsantrasyonu/konsantrasyonu arttıkça tohum çimlenmesinin azaldığı tespit edilmiştir

(Kumar and Mishra 2004). Genel olarak, çimlenme oranında azalmalar mutagen konsantrasyonu/konsantrasyonundaki artışla ilişkili olmuştur (Singh and Kole 2005).

Mutagen konsantrasyonu arttıkça büyümedeki azalma farklı araştırmacılar tarafından farklı şekillerde açıklanmıştır. Büyümedeki azalma şu sebeplerden birine veya birkaçına atfedilebilir: büyümeyi engelleyicilerin bozulmasında artış, büyümeyi teşvik edicilerde artış, mutagen konsantrasyonunun belli bir düzeyinde tohumların metabolik durumlarında ani bir artış veya kromozomal anomalilerin oluşması (Wang and Yu 1991; Solanki and Sharma 1999; Sharma 2002; Kumar and Selvaraj 2003; Solanki and Phogat 2005). Mutagenlerin yüksek konsantrasyonlarında çimlenmedeki azalma, hücresel düzeyde kromozomal anormallikleri veya hem fiziksel hem de fizyolojik faktörlerin kombine etkilerini kapsayan bozukluklara bağlı olabilir (Ahloowalia *et al.* 2004). Çimlenme sürecinde görev alan enzimlerin oluşumunda bozukluk, özellikle EMS gibi kimyasal mutagenlerin sebep oldukları fizyolojik etkilerden biri olabilir (Ndou 2012). EMS'nin konsantrasyonu attıkça tohumların dışındaki su potansiyeli düşer ve daha negatif hale gelir, böylece tohumlar yeterli miktarda suyu alamazlar ve ya çimlenemezler veya çimlenme yavaşlar (Ndou 2012).

3. MATERYAL ve YÖNTEMLER

3.1. Bitki Materyali

Araştırmada materyal olarak Doğu Anadolu Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nden temin edilen ekmeklik buğdayın (*Triticum aestivum* L.) Kırık çeşidine ait tohumlar kullanılmıştır. Kırık, uzun ince saplı bir bitki olup, vejetatif devre ile generatif devrenin başlarında bayrak yaprağı ayasının sap ile dar bir açı meydana getiren morfolojik karaktere sahiptir. Başak uzunluğu ortalama 9 cm civarında, kılçıksız, kavuz rengi kırmızımsı ve tüylüdür. Tane iri, dolgun ve beyazdır. Kardeşlenme kapasitesi düşüktür. Ayrıca Kırık, olgun embriyo kültürüne oldukça iyi cevap veren bir ekmeklik buğday çeşididir (Aydın *et al.* 2011).

3.2. Kallus Kültürü Ortamlarında Kullanılan Kimyasallar

3.2.1. Temel besi ortamı

Kallus oluşumu ve somatik embriyogenesis çalışmalarında Murashige and Skoog (1962) tuzları kullanılmıştır. MS ortamının içerdiği kimyasallar ve miktarları Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. MS kültür ortamında kullanılan kimyasallar ve miktarları

KİMYASAL BİLEŞİMİ	Miktarı (mg/l)
İnorganikler	
Makro elementler	
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
CaCl ₂	332.2
MgSO ₄	180.7
KH ₂ PO ₄	170
Mikro elementler	
Na ₂ EDTA	37.26
Fe ₂ (SO ₄).7H ₂ O	27.8
MnSO ₄ .H ₂ O	16.9
KI	0.83
H ₃ BO ₃	6.2
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025
Organikler	
Glisin	2
Myo-inositol	100
Nikotonik asit	0.5
Pridoksin-HCl	0.5
Tiamin-HCl	0.1

MS makro (20X), mikro (100X) elementler ile demir şelelat (100X) ve vitaminler (100X) için stok solüsyon hazırlanmıştır.

1. MS makro elementler için stok solüsyonunun hazırlanışı

MS makro elementler (20X) için stok solüsyonunun hazırlanışında aşağıdaki işlemler sırasıyla izlenmiştir.

a) Çizelge 3.1’de verilen, bir litrede bulunması gereken makro element miktarlarının 20’şer katı hassas bir terazi ile tartılmıştır.

b) 2 litrelik bir erlenmayer kabına yaklaşık olarak 700 ml saf su konulmuş içerisine manyetik balık atılarak manyetik karıştırıcı üzerine konulmuştur. Tartılan makro elementler tek tek eridikçe ilave edilmiş ve oda sıcaklığında tamamen erimesi

sağlanmıştır. İlave edilen makro elementler su içerisinde iyice çözüldükten sonra, karışımın hacmi saf su ile bir litreye tamamlanmış ve amber şişeye doldurulmuştur. Üzerine stoğun adı, konsantrasyonu, hazırlayan kişinin adı, hazırlanma tarihi ve bir litre standart MS için alınması gereken hacmi yazılmış ve buzdolabında (4°C) muhafaza edilmiştir.

2. MS mikro elementler için stok solüsyonunun hazırlanışı

MS mikro elementler (100X) için stok solüsyonunun hazırlanışında aşağıdaki işlemler sırasıyla izlenmiştir.

a) Çizelge 3.1’de mikro elementler başlığında belirtilen $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ve $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ haricindeki diğer bileşiklerin 100’er katı hassas bir terazi ile tartılmıştır.

b) 2 litrelik bir erlenmayer kabına yaklaşık olarak 700 ml saf su konulmuş içerisine balık atılarak manyetik karıştırıcı üzerine konulmuştur. Tartılan mikro elementler tek tek eridikçe ilave edilmiş ve oda sıcaklığında tamamen erimesi sağlanmıştır. İlave edilen mikro elementler su içerisinde iyice çözüldükten sonra, karışımın hacmi saf su ile bir litreye tamamlanmış ve amber şişeye doldurulmuştur. Üzerine stoğun adı, konsantrasyonu, hazırlayan kişinin adı, hazırlanma tarihi ve bir litre standart MS için alınması gereken hacmi yazılmış ve buzdolabında (4°C) muhafaza edilmiştir.

3. MS demir şelat stok solüsyonunun hazırlanışı

MS demir şelat (100X) stok solüsyonunun hazırlanışında aşağıdaki işlemler sırasıyla izlenmiştir.

a) Çizelge 3.1’de mikro elementler başlığında belirtilen $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ve $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ miktarlarının 100 katı hassas terazide tartılmıştır.

b) Yarım litrelik cam erlenmayer içerisinde 300 ml saf su konulmuş içerisinde balık atılarak manyetik karıştırıcı üzerine oturtulmuş, ısıtıcı ve karıştırıcı açılmıştır. Tartılan 3.726 gram $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ ilave edilmiş ve tamamen erimesi sağlanmıştır. Erime işlemi tamamlanır tamamlanmaz ısıtıcı kapatılmış karıştırma işlemi devam ederken hacim oda sıcaklığındaki saf su ile 400 ml'ye tamamlanmıştır.

c) Farklı cam bir erlenmayere 300 ml saf su konulmuş içerisinde balık atılarak manyetik karıştırıcı üzerine oturtulmuş, ısıtıcı ve karıştırıcı açılmıştır. Tartılan 2.78 gram $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ilave edilmiş ve tamamen erimesi sağlanmıştır. Erime işlemi tamamlanır tamamlanmaz ısıtıcı kapatılmış karıştırma işlemi devam ederken hacim oda sıcaklığındaki saf su ile 400 ml'ye tamamlanmıştır.

d) Bu iki ayrı çözelti birleştirilerek toplam hacim oda sıcaklığındaki saf su ile 1 litreye tamamlanmıştır. Bu birleştirme işleminden sonra açık sarı rengi alan stok amber şişeye doldurulmuştur. Üzerine stoğun adı, konsantrasyonu, hazırlayan kişinin adı, hazırlanma tarihi ve bir litre standart MS için alınması gereken hacmi yazılmış ve buzdolabında (4°C) muhafaza edilmiştir.

4. MS vitamin stok solüsyonlarının hazırlanışı

MS vitamin stok (100X) solüsyonunun hazırlanışında aşağıdaki işlemler sırasıyla izlenmiştir.

a) Çizelge 3.1'de organikler başlığında belirtilen bileşiklerin 100 katı tartılmıştır.

b) Hacmi 1000 ml olan bir erlenmayere 700 ml saf su konulmuş içerisinde balık atılarak manyetik karıştırıcı üzerine konulmuştur. Tartılan vitaminler tek tek eridikçe ilave edilmiş ve oda sıcaklığında tamamen erimesi sağlanmıştır. İlave edilen vitaminler su içerisinde iyice çözüldükten sonra, karışımın hacmi saf su ile 1000 ml'ye tamamlanmış ve amber şişeye doldurulmuştur. Üzerine vitamin stoğunun adı, konsantrasyonu,

hazırlayan kişinin adı, hazırlanma tarihi ve bir litre standart MS için alınması gereken hacmi yazılmış ve buzdolabında (4°C) muhafaza edilmiştir.

5. MS tuzları ve vitaminlerine ilave olarak kullanılan kimyasallar ve bu kimyasalların stok solüsyonlarının hazırlanışı

MS tuzları ve vitaminlerine ilave olarak çalışmada kullanılan kimyasallar ve miktarları Çizelge 3.2 verilmiştir. Çalışmada kullanılan oksin hormonlarının stok solüsyonlarının hazırlanışı Çizelge 3.3’de ve sitokininin stok solüsyonlarının hazırlanışı Çizelge 3.4’da verilmiştir.

Çizelge 3.2. MS tuzları ve vitaminlerine ilave olarak kullanılan kimyasallar

Kullanılan Kimyasallar	Miktarı
Askorbik Asit	100 mg/l
MES hidrate	1.95 g/l
Pyhtagel	2 g/l
Sakkaroz	20 g/l

Çizelge 3.3. Oksin stok solüsyonunun hazırlanışı

Oksin Tipi	Çözücü	Seyreltici	Saklama koşulu	Çalışma konsantrasyonu
Dikamba	Su/etil alkol	Su	+4 °C	1 mg/ml
IAA	Etil alkol	Su	-20 °C	1 mg/ml

Çizelge 3.4. Sitokininin stok solüsyonunun hazırlanışı

Sitokinin Tipi	Çözücü	Seyreltici	Saklama koşulu	Çalışma konsantrasyonu
TDZ	Dimetil Sülfoksit	Su	+4 °C	1 mg/ml

3.3. Bitki Rejenerasyonu Ortamlarında Kullanılan Kimyasallar

Bitki rejenerasyon çalışmalarında Murashige ve Skoog (1962) tuzları ve MS ortamına 0.5 mg/l TDZ ilave edilmiştir.

3.4. Kullanılan Kimyasal Mutagenler Ve Konsantrasyonları

Kimyasal mutagen olarak etil metansülfonat (EMS) ve sodyum azit (NaN_3) kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan kimyasal mutagenler ve konsantrasyonları Çizelge 3.5’de, EMS ve NaN_3 stok solüsyonlarının hazırlanışı Çizelge 3.6’da verilmiştir.

Çizelge 3.5. İki farklı eksplant’da kullanılan kimyasal mutagenler ve konsantrasyonlar

Kullanılan Kimyasallar	Eksplant	Konsantrasyonlar
Etil metansülfonat (EMS)	Tohom	%0.1, %0.2, %03 ve %04
	Kallus	10 mM, 30 mM, 50mM ve 80 mM
Sodyum azit (NaN_3)	Tohom	1mM, 2mM, 3mM ve 4mM
	Kallus	1mM, 2mM, 3mM ve 4mM

Çizelge 3.6. EMS ve NaN_3 stok solüsyonlarının hazırlanışı

Mutagen Tipi	Çözücü	Seyreltici	Saklama koşulu	pH	Çalışma konsantrasyonu
EMS	Su	0.5 M sodyum fosfat	+4 °C	7.2	%0.1 ve/veya 1mM
NaN_3	Su	0.5 M sodyum fosfat	+4 °C	3.2	%0.1 ve/veya 1mM

3.5. Kullanılan Yöntemler

Bu çalışmada iki farklı yöntem kullanılmıştır. Birinci yöntem, *in vitro* mutagenesis olup, bu yöntemde mutagenler tüm tohum ve kallusa olmak üzere iki şekilde uygulanmıştır. İkinci yöntemde ise mutagenler tüm tohum uygulanmış ve yapılan uygulamaların etkisi hem kontrollü koşullarda hem de tarla koşullarında değerlendirilmiştir. Her iki yöntem için ayrıntılı açıklamalar aşağıda verilmiştir.

3.5.1.a. Birinci yöntemin (*in vitro* mutagenesis) uygulanişı

Bu çalışmanın yürütülmesi sırasında aşağıda belirtilen işlemler uygulanmıştır.

1). Sterilizasyon yöntemleri

a) Çalışma ortamının ve kullanılan aletlerin sterilizasyonu

Steril çalışma alanında kullanılan yüzeyler (steril kabin içi) kullanımdan en az 10–15 dakika önce %70’lik etil alkolle silinmiş ve UV lambası açılmıştır. Kültüre alma işlemi başlamadan önce UV lambası kapatılmıştır. Kullanılan aletler (bisturi, pens vb.) kullanımdan önce etil alkol içine batırıldıktan sonra alev lambasında alevle yüzey sterilizasyonuna tabi tutulmuştur. Eksplantların kesimi alüminyum folyo içine sarılarak otoklav edilmiş 10 x15 cm boyutlarındaki kurutma kağıtları üzerinde yapılmıştır.

b) Tohumların yüzey sterilizasyonu

Tohumlar musluk suyunda yıkandıktan sonra %70’lik etil alkolde 5 dakika karıştırılarak steril kabin içersinde 3 defa steril saf suyla çalkalanıp daha sonra %1’lik sodyumhipokloritte (%20’lik ticari çamaşır suyu) 35 dakika karıştırılmış ve 3 kez steril saf su ile durulanmıştır.

c) Besi ortamının ve diğer bileşenlerinin sterilizasyonu

Besi ortamları 105 kPa basınçta 121°C’de 20 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir. Sıcakta bozulan vitaminler, bitki büyüme düzenleyicileri ve memeli cinsiyet hormonlarını sterilize etmek için 0,22 µm poroziteli selüloz nitrat filtreler (milipor) kullanılmıştır.

d) Sterilizasyonda kullanılan solüsyonların hazırlanışı

%70'lik Etil alkolün hazırlanışı: %96'lık etil alkolden 700 ml alınarak hacim saf su ile 960 ml'ye tamamlanmıştır.

%1'lik Sodyum hipoklorit solusyonunun hazırlanışı: %5 NaOCl (sodyum hipoklorit) içeren ticari ACE marka çamaşır suyundan 200 ml alınarak hacim saf su ile 1000 ml'ye tamamlanmış, amber renkli şişeye doldurulmuş ve oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

3.5.1.b. Kallus ve bitki rejenerasyon ortamlarının hazırlanması

Aşağıdaki işlemler sırasıyla uygulanmıştır.

1. 1 litrelik behere 600 ml bidistile su konulmuş ve manyetik karıştırıcı ile karıştırılmaya başlanmıştır.
2. MS makro element stok solüsyonundan (20X) 50 ml, mikro element stok solüsyonundan ve demir şelattan (100X) 10'ar ml eklenmiştir.
3. Bunun üzerine 20 g sakaroz ve 1.95 g MES tartılıp eklenmiş ve eriyinceye kadar karıştırılmıştır. Hacim 950 ml tamamlanmış ve 1N NaOH gerektiğinde de 0.1 N HCl çözeltisinden faydalanılarak pH=5.8'e ayarlanmıştır.
4. Son hacim saf su ile 985 ml tamamlanmıştır.
5. İçerisinde 2 g jel yapıcı madde (Phytigel) bulunan karışım erlen içerisine aktarılmış ve ağzı alüminyum folyo ile kaplandıktan sonra sterilizasyon işlemi için otoklavda 20 dakika boyunca 105 kPa basınçta 121°C'de tabi tutulmuştur.

6. Isı ile bozulabilen vitamin ve hormonlar otoklavdan sonra ilave edilmiştir. Bunun için 50 ml beher içersine MS vitamin stok solüsyonundan (10X) 10 ml, askorbik asit (50 mg/l) solüsyonundan 1 ml ilave edilmiş ve son hacim saf su yardımı ile 15 ml'ye ayarlanmıştır.

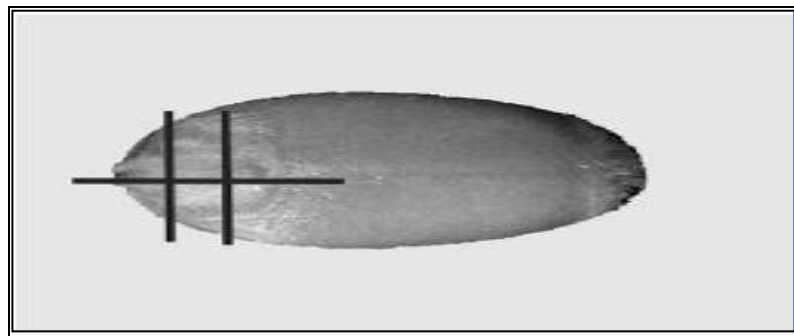
7. Otoklavlanan besi yerinin sıcaklığı 40-45°C'ye düşünce 0.22 µm porotizeteli selüloz nitrat filtrelerden geçirilerek steril edilen vitamin ve hormonlar besiyerine ilave edilmiştir.

3.5.1.c. *In vitro* mutagen uygulama

Kimyasal mutagenler olgun tohumlara ve olgun embriyo kaynaklı kalluslara olmak üzere iki farklı şekilde uygulanmıştır.

Araştırmada endosperm destekli olgun embriyo kültürü için aşağıda belirtilen kültür aşamaları uygulanmıştır (Aydın *et al.* 2011).

a. Yüzey sterilizasyonu yapılmış tohumların olgun embriyolar tohum üzerinden ayrılmadan 6 parçaya bölünmüştür (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Sterilizasyon sonrası su emdirilmiş tohumun embriyosunun kesim kısımlarının gösterimi .

b. Kallus oluşumu için MS (Murashige and Skoog 1962) ortamına ilave olarak 12 mg/l dikamba (3,6-Dikolorobenzoik asit), 0.5 mg/l IAA (İndol-3-asetik asit), 20 g/l sakkaroz, 2 g/l phytagel ve 1.95 g/l MES [(2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid)] içeren kallus oluşum ortamında karanlıkta $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ de 30 gün süreyle tutulmuştur.

c. Meydana gelen kalluslar bitki rejenrasyonu için hormunsuz MS ortamında iki hafta süreyle tutulmuşlardır. Bu işlemin ardından kalluslar MS ortamına ilave olarak 0.5 mg/l TDZ, 2 mg/l phytagel ve 20 g/l sakkaroz içeren rejenerasyon ortamında $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ ’ de 16:8 saat ışık : karanlık fotoperyotta 30 gün süreyle bekletilmişlerdir. Aydınlatma kaynağı olarak floresan lambası kullanılmış ve ışık yoğunluğu $62 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ olarak ayarlanmıştır.

d. Rejenerasyon sonunda meydana gelen bitkiler yaklaşık 10-12 cm oluncaya kadar MS tuzlarına ve vitaminlerine ilave olarak 20 g/l sakkaroz ve 2 g/l phtagel içeren meganta kutularında büyütülmüştür.

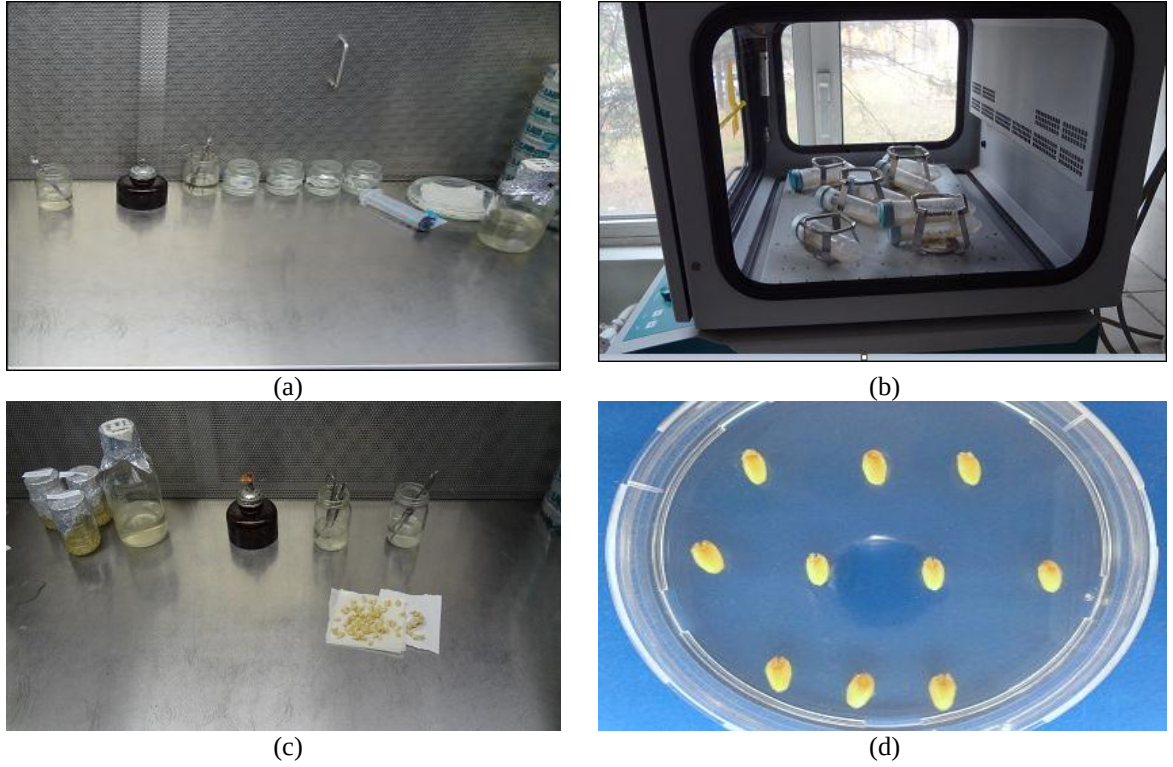
e. Rejenere olan bitkiler 10-12 cm büyüklüğe ulaştığında aklimize edilerek saksılara aktarılmış ve kontrollü şartlarda ($25\pm 1^{\circ}\text{C}$ de 16:8 saat aydınlık : karanlık fotoperyotta) gelişmeye bırakılmışlardır. Hasat olgunluğuna gelen her bitkiden tohumlar (M_2 tohumları) ayrı ayrı hasat edilerek depolanmıştır.

1. Olgun tohumlara mutagen uygulaması

a. EMS (etil metansülfonat) uygulaması

Yüzey sterilizasyondan sonra olgun tohumlar 24 saat süreyle suda bekletilmiş ve akabinde %0 (kontrol), %0.1, %0.2, %0.3, %0.4’lük (v/v) EMS (filtre ile sterilize edilmiş) solüsyonunda 2, 4, 6 ve 8 saat sürelerle muamele edilmiştir. Her konsantrasyon için 100 tohum kullanılmıştır. Bu işlemin ardından tohumlar steril distile su ile 3 kez durulanmış ve olgun embriyoları 6 parçaya bölünen tohumlar kallus oluşumu için kallus ortamına alınmışlardır. Daha sonra 30. gün sonunda meydana gelen kalluslardan bitki

rejenerasyonu için daha önce belirtilen aşamalar (3, 4 ve 5 kültür aşamaları) gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Olgun tohumlara EMS ve sodyum azit mutagenlerinin uygulanışı.

(a) Olgun tohumlara mutagenik ortama aktarılması. (b) Uygulama yapılan örneklerin çalkalayıcıda karıştırılması. (c) Olgun tohumlara yarı güçte hazırlanmış kallus başlangıç ortamında yıkanması. (d) Olgun tohumları kallus besisi ortamına aktarılması.

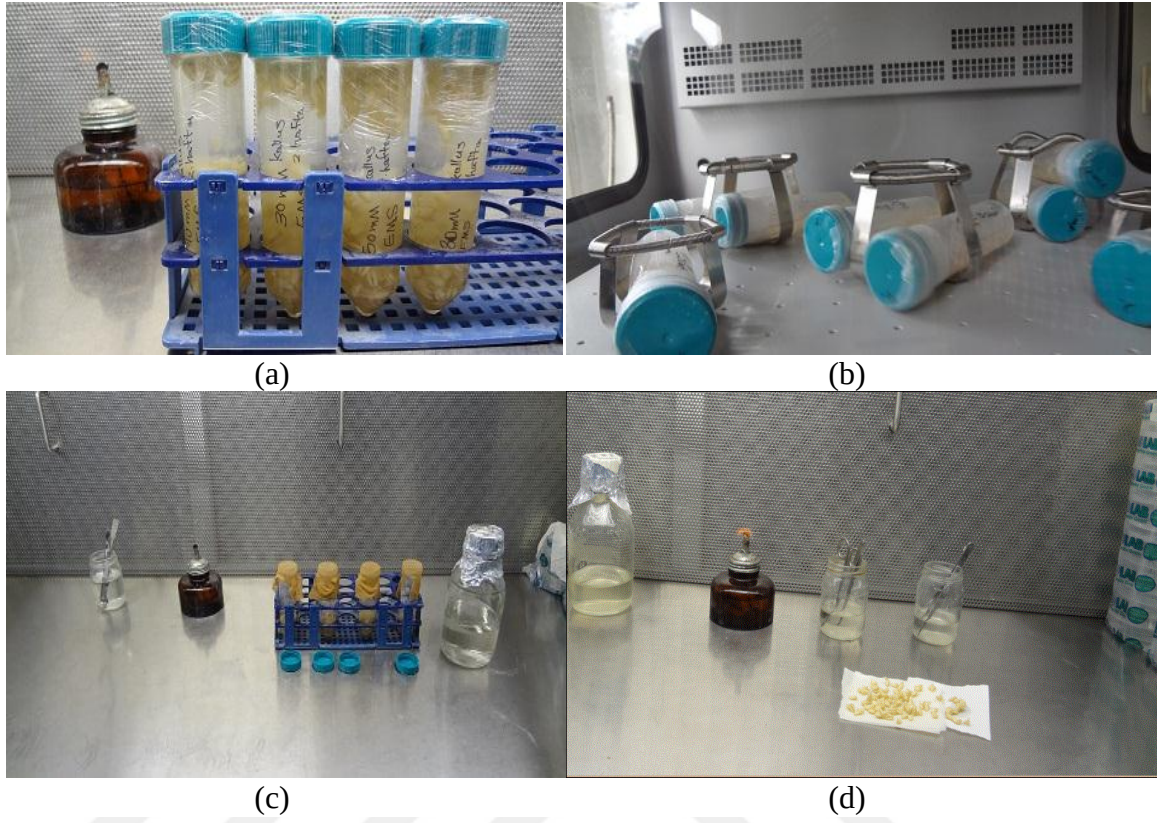
b. Sodyum azit (NaN_3) uygulaması

Yüzey sterilizasyondan sonra olgun embriyolar 24 saat süreyle suda bekletilmiş ve akabinde 0 (kontrol), 1, 2, 3, 4 mM'lik NaN_3 (filtre ile sterilize edilmiş) solüsyonunda 1, 2, 3 ve 4 saat sürelerle muamele edilmiştir. Her konsantrasyon için 100 tohum kullanılmıştır. Bu işlemin ardından tohumlar steril distile su ile 3 kez durulanmış ve olgun embriyoları 6 parçaya bölünen tohumlar kallus oluşumu için kallus ortamına alınmışlardır. Daha sonra 30. Gün sonunda meydana gelen kalluslardan bitki rejenerasyonu için daha önce belirtilen aşamalar (3, 4 ve 5 kültür aşamaları) gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.2).

2. Kalluslara mutagen uygulaması

a. EMS uygulaması

Kültüre alınan olgun embriyolar birinci hafta sonunda oluşan endosperm destekli kalluslara 0, 10, 30, 50 ve 80 mM olmak üzere beş farklı EMS (sulandırılmış sodyum fosfat tamponunda 0.5 M, pH'sı 7) konsantrasyonu uygulanmıştır. Her konsantrasyon için 100 kallus kullanılmıştır. Endosperm destekli kalluslar, içerisinde 10 ml filtre ile sterilize edilmiş, yukarıda belirtilen konsantrasyonlarda EMS [yarı güçte hazırlanmış KBO (kallus başlangıç ortamı)] içeren steril test tüplerine alınmıştır. İçerisinde kalluslar ve mutagenik solüsyon bulunan tüpler, her 20 dakikada bir kez ters çevrilmiş ve bu işleme 2, 4, 6 ve 8 saat süreyle devam edilmiştir. Daha sonra kalluslar 3 kez ½ güçte KBO ile durulanmış ve steril filtre kağıdı üzerinde 5 dakika boyunca havada kurutulmuş ve bu işlemin ardından KBO besi ortamı ihtiva eden petri kutularına transfer edilmiştir (Şekil 3.3). Kallus kültür süresi 30 güne tamamlanmıştır. Meydana gelen kalluslardan bitki rejenerasyonu için daha önce belirtilen aşamalar (3, 4 ve 5. kültür aşamaları) gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Kallusun 1. haftasına EMS ve sodyum azit mutagenlerinin uygulanişı.

(a) Endosperm destekli kallusların mutagenik ortama aktarılması. (b) Uygulama yapılan örneklerin çalkalayıcıda karıştırılması. (c) Kallusların yarı güçte hazırlanmış kallus başlangıç ortamında yıkanması. (d) Endosperm destekli kallusların steril filtre kağıdı üzerinde 5 dakika boyunca havada kurutulması.

b. Sodyum azit uygulaması

Kültüre alınan olgun embriyolar birinci hafta sonunda oluşan endosperm destekli kalluslara 0, 1, 2, 3 ve 4 mM (sulandırılmış sodyum fosfat tamponunda 0.5 M, pH 3.2) olmak üzere beş farklı sodyum azit konsantrasyonu uygulamıştır. Her konsantrasyon için 100 kallus kullanılmıştır. Endosperm destekli kalluslar, içerisinde 10 ml filtre ile sterilize edilmiş, yukarıda belirtilen konsantrasyonlarda NaN_3 [yarı güçte hazırlanmış KBO (kallus başlangıç ortamı)] içeren steril test tüplerine alınmıştır. İçerisinde kalluslar ve mutagenik solüsyon bulunan tüpler, her 20 dakikada bir kez ters çevrilmiş ve bu işleme 1, 2, 3 ve 4 saat süreyle devam edilmiştir. Daha sonra kalluslar 3 kez ½ güçte KBO ile durulanmış ve steril filtre kağıdı üzerinde 5 dakika boyunca havada kurutulmuş ve bu işlemin ardından KBO besi ortamı ihtiva eden petri kutularına transfer edilmiştir.

Kallus kültür süresi 30 güne tamamlanmıştır. Meydana gelen kalluslardan bitki rejenerasyonu için daha önce belirtilen aşamalar (3, 4 ve 5. kültür aşamaları) gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.3).

3.5.1.d. İncelenen karakterler

Hem olgun tohumlara hemde kalluslara kimyasal mutagenlerin uygulandığı *in vitro* mutagenesis çalışmalarında aşağıda verilen karakterler incelenmiştir.

1) Kallus oluşum (KO) oranı (%): Kallus oluşum oranı yalnızca olgun tohumlara mutagen uygulanmasında incelenmiştir. Kallus oluşum oranı aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır (Aydın 2010).

Kallus oluşum oranı (%) = (oluşan kallus sayısı / kültüre alınan eksplant sayısı) x 100

2) Embriyogenik kallus oluşum oranı (%) Embriyogenik kallus, sert dokulu, dağılabilir özellikte, sıkı (pütürlü) yapılı ve embriyo oluşturma kapasitesine sahip kalluslardır. Eksplant ve kallus sayısına göre hesaplanmıştır (Aydın 2010).

a. Eksplant sayısına göre embriyogenik kallus oluşum (ESEKO) oranı (%): ESEKO oranı aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

ESEKO oranı (%) = (embriyogenik kallus sayısı / eksplant sayısı) x 100

b. Kallus sayısına göre embriyogenik kallus oluşum (KSEKO) oranı (%): KSEKO oranı aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

KSEKO oranı (%) = (embriyogenik kallus sayısı / kallus sayısı) x 100

3) Cevap veren embriyogenik kallus oranı (%): Eksplant sayısına, eksplantlardan meydana gelen kallus sayısına ve meydana gelen embriyogenik kallus sayısına göre aşağıdaki belirtildiği şekilde hesaplanmıştır (Aydın 2010).

a. Eksplant sayısına göre cevap veren embriyogenik kallus (ESCEK) oranı (%): ESCEK oranı aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\text{ESCEK oranı (\%)} = (\text{cevap veren embriyogenik kallus sayısı}^* / \text{eksplant sayısı}) \times 100$$

b. Kallus sayısına göre cevap veren embriyogenik kallus (KSCEK) oranı (%): KSCEK oranı aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\text{KSCEK oranı (\%)} = (\text{cevap veren embriyogenik kallus sayısı}^* / \text{kallus sayısı}) \times 100$$

c. Embriyogenik kallus sayısına göre cevap veren embriyogenik kallus (EKSCEK) oranı (%): EKSCEK oranı aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır (Aydın 2010).

$$\text{EKSCEK oranı (\%)} = (\text{cevap veren embriyogenik kallus sayısı}^* / \text{embriyogenik kallus sayısı}) \times 100$$

4) Cevap veren somatik embriyo sayısı (adet): Eksplant sayısına, eksplantlardan meydana gelen kallus sayısına ve embriyogenik kallus sayısına göre aşağıdaki belirtildiği şekilde hesaplanmıştır.

a. Eksplant sayısına göre cevap veren somatik embriyo (ESCSE) sayısı aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\text{ESCSE} = (\text{cevap veren somatik embriyo sayısı}^* / \text{eksplant sayısı})$$

b. Kallus sayısına göre cevap veren somatik embriyo (KSCSE) sayısı aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\text{KSCSE} = (\text{cevap veren somatik embriyo sayısı}^* / \text{kallus sayısı})$$

c. Embriyogenik kallus sayısına göre cevap veren somatik embriyo (EKSCE) sayısı aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\text{EKSCE} = (\text{cevap veren somatik embriyo sayısı}^* / \text{embriyogenik kallus sayısı})$$

5) Rejenerasyon etkinliği (adet): Aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır (Aydın 2010).

$$\text{RE} = (\text{rejenere bitki sayısı} / \text{cevap veren embriyogenik kallus sayısı}^*)$$

6) Bitki Sayısı (BS): Elde edilen toplam bitki sayısıdır.

*Kök ve sürgüne sahip bitkicik meydana getiren embriyogenik kallus veya somatik embriyo sayısı.

7) Optimum konsantrasyonun (LD₅₀) tespit edilmesi: Kimyasal mutagenlerin optimum konsantrasyonunun ve uygulama süresinin belirlenmesinde LD₅₀ (letal konsantrasyon) kriteri esas alınmıştır. *In vitro* çalışmalarda rejenerasyon etkinliği ve elde edilen bitki sayısı çok önemli karakterler olup, doku kültürünün başarısı bunlara göre değerlendirilmektedir. Bu nedenle burada LD₅₀ değeri bu iki karaktere göre ayrı ayrı belirlenmiştir.

8) *İn viro* mutagen çalışmalarına ait verilerin istatistiksel analizi

a. Tohuma (Kallus öncesi) mutagen uygulaması: Bu araştırma kapsamında tohuma uygulanan iki farklı mutagenin (EMS ve NaN_3), kallus oluşumuna, embriyogenik kallus oluşumuna, cevap veren embriyogenik kallus oranına, cevap veren somatik embriyo sayısı, rejenerasyon etkinliği ve bitki sayısına olan etkileri ayrı ayrı araştırılmıştır. Her iki kimyasal için doku kültürü çalışmaları her biri 10 eksplant içeren petrilere on tekrarlamalı olarak 4 (Süre) x 5 (Konsantrasyon) faktöriyel düzende tam şansa bağlı deneme planına göre varyans analizine (ANOVA) tabi tutulmuştur. Uygulamalar arasındaki farklar %5 önem seviyesinde Duncan çoklu karşılaştırma testi ile belirlenemiştir. İncelenen karakterler arasındaki ilişkiler Pearson korelasyon katsayısı ile ifade edilmiştir. İstatistik analizler SAS (2002), Windows 8.0 ve SPSS 22 bilgisayar programı kullanılarak yapılmıştır.

b. Kalluslara mutagen uygulaması: Bir haftalık kalluslara uygulanan iki farklı mutagenin (EMS ve NaN_3), embriyogenik kallus oluşumuna, cevap veren embriyogenik kallus oranına, cevap veren somatik embriyo sayısı, rejenerasyon etkinliğine ve bitki sayısına olan etkileri ayrı ayrı araştırılmıştır. Her iki kimyasal için doku kültürü çalışmaları her biri 10 eksplant içeren petrilere on tekrarlamalı olarak 4 (Süre) x 5 (Konsantrasyon) faktöriyel düzende tam şansa bağlı deneme planına göre varyans analizine (ANOVA) tabi tutulmuştur. Uygulamalar arasındaki farklar %5 önem seviyesinde Duncan çoklu karşılaştırma testi ile belirlenemiştir. İncelenen karakterler arasındaki ilişkiler Pearson korelasyon katsayısı ile ifade edilmiştir. İstatistik analizler SAS (2002), Windows 8.0 ve SPSS 22 bilgisayar programı kullanılarak yapılmıştır.

3.5.2. İkinci yöntemin uygulanışı

İkinci yöntemde kimyasal mutagenler tüm tohumlara uygulanmış ve araştırmalar (1) kontrollü koşullarda ve (2) tarla koşullarında olmak üzere iki farklı ortamda yürütülmüştür.

1. Tohumlara mutagenlerin uygulanışı

a. Etil metansülfonat (EMS) uygulaması

Yapılan bu aşama için uygun etil metansülfonat (EMS) konsantrasyonu ve uygulama süresinin belirlenmesi için tohumlar musluk suyunda yıkandıktan sonra %70'lik etil elkolde (EtOH) 3 dakika karıştırılarak steril kabin içerisinde steril saf suyla 3 kez yıkanmış ve birkaç damla Tween 20 (Sigma) içeren %20'lik sodyum hipokloritte 25 dakika karıştırılarak yüzey sterilizasyonu yapılmıştır. Yüzey sterilizasyonu yapılan tohumlar, steril saf su ile yıkandıktan sonra 6 saat havalandırılmış su içerisinde bekletilmiştir. Tohumlar su aldıktan sonra 5 farklı EMS konsantrasyonunda [0 (kontrol), %0.1, %0.2, %0.3 ve %0.4'lük], 4 farklı süreyle, [kontrol (10 dk), 3 saat, 6 saat ve 9 saat] uygulanmıştır. Buna göre $5 \times 4 = 20$ uygulama oluşmuştur. Her bir uygulama için 100 tohum kullanılmış ve bu tohumlar 50 ml'lik ependorf tüplerine konulmuşlardır. Her bir uygulama konsantrasyonuna ait çözeltiden her bir tüpe 30 ml konulmuş ve tohumlar bu solüsyon içerisinde belirtilen sürelerle göre bekletilmişlerdir. Uygulamanın ardından tohumlar 4 saat süre ile musluk suyunda yıkanarak mutagenin uzaklaştırılması sağlanmıştır.

Yukarıda belirtilen işlem toplam 4000 tohuma uygulanmış ve bunlardan 2000 tanesi (20 kombinasyon $\times$ 100 tohum = 2000 tohum) çimlenme ve çimle ilgili karakterlerin, geri kalan 2000 tanesi ise çıkış ve bazı fide özelliklerinin belirlenmesinde kullanılmıştır.

b. Sodyum azit (NaN_3) Uygulaması

Yapılan bu aşama için uygun sodyum azit (NaN_3) konsantrasyonu ve uygulama süresinin belirlenmesi için saf tohumluktan tohumlar sayılmış ve bu tohumlar musluk suyunda yıkandıktan sonra %70'lik etil elkolde (EtOH) 3 dakika karıştırılarak steril kabin içerisinde steril saf suyla 3 kez yıkanmış ve birkaç damla Tween 20 (Sigma) içeren %20'lik sodyum hipokloritte 25 dakika karıştırılarak yüzey sterilizasyonu yapılmıştır. Yüzey sterilizasyonu yapılan tohumlar, steril saf su ile yıkandıktan sonra 6

saat havalandırılmış su içerisinde bekletilmiştir. Tohumlara sodyum azit, 5 farklı konsantrasyonda [0 (kontrol), 0.5 mM, 1 mM, 1.5 mM ve 2 mM'lık], 4 farklı süreyle [kontrol (10 dk), 1 saat, 2 saat ve 3 saat] uygulanmıştır. Buna göre $5 \times 4 = 20$ kombinasyon/uygulama oluşmuştur. Her bir kombinasyon için 100 tohum kullanılmış ve bu tohumlar 50 ml'lik ependorf tüplerine konulmuşlardır. Her bir uygulama konsantrasyonuna ait çözeltiden her bir tüpe 30 ml konulmuş ve tohumlar bu solüsyon içerisinde belirtilen sürelerle göre bekletilmişlerdir. Uygulamanın ardından tohumlar 20 dakika süre ile musluk suyuyla yıkılarak mutagenin uzaklaştırılması sağlanmıştır.

Yukarıda belirtilen işlem toplam 4000 tohuma uygulanmış ve bunlardan 2000 tanesi (20 kombinasyon x 100 tohum = 2000 tohum) çimlenme ve çimle ilgili karakterlerin, geri kalan 2000 tanesi ise çıkış ve bazı fide özelliklerinin belirlenmesinde kullanılmıştır.

3.5.2.a. Kontrollü koşullarda yapılan işlemler ve incelenen konular

1. Çimlenme ile ilgili karakterler

Kimyasal mutagen uygulanmış tohumlarda çimlenme ve çimle ilgili bazı karakterleri tespit etmek amacıyla 2000 tohum 100'er adetlik gruplara ayrılmış ve dört tekerrülü olarak çimlendirme denemesine alınmıştır. Tohumlar petri kutularında kağıt arasında çimlendirme dolabında çimlendirmeye alınmıştır. Her bir petri kutusuna 14 ml saf su konulmuştur. Çimlendirme süresince sıcaklık 25 °C'ye ayarlanmış ve 16 saat ışık, 8 saat karanlık periyot uygulaması yapılmıştır (Anonim 2009).

Tohumlar çimlendirme ortamına konulduktan sonra 14 gün süreyle her gün sayım yapılmak suretiyle çimlenme ile ilgili veriler (kök uzunluğu 1mm ve üzerinde olanlar çimlenmiş olarak kabul edilmiştir) elde edilmiştir (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. EMS ve sodyum azit mutagenleri uygulanmış tohumların çimlendirilmesi.

(a) Çimlendirme ortamına yeni alınmış tohumlar. (b) Çimlendirme ortamına konulduktan sonra 14. günde çimlenme durumu.

a. Çimlenme hızı (ÇH): Çimlenme hızı aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır. Burada ($n_1, \dots, n_4$) 4. güne kadar günlük çimlenen tohum sayısını; $t_1, \dots, t_4$ ise çimlenmenin gerçekleştiği gün sayısını ifade etmektedir (Elkoca 1997).

$$\text{Çimlenme hızı} = n_1/t_1 + n_2/t_2 + \dots + n_n/t_n$$

b. Çimlenme gücü (ÇG): Çimlenme gücü aşağıdaki formül kullanılarak belirlenmiştir. Burada ($n_1, \dots, n_8$) 8. güne kadar günlük çimlenen tohum sayısını; $t_1, \dots, t_8$ ise çimlenmenin gerçekleştiği gün sayısını göstermektedir.

$$\text{Çimlenme gücü} = n_1/t_1 + n_2/t_2 + \dots + n_n/t_n$$

c. Çimlenme oranı (%) (ÇO): Tohumlar çimlenme ortamına konulduktan sonra her gün aynı saatte çimlenenler sayılmıştır. Kökçük 1-2 mm'ye ulaştığında tohum çimlenmiş olarak kabul edilmiş ve ortamdan uzaklaştırılmıştır (Elkoca 1997). Çimlenme tamamlandığında, çimlenme oranı aşağıdaki eşitlik aracılığı ile hesaplanmıştır.

$$\text{Çimlenme oranı (\%)} = (\text{Çimlenen toplam tohum sayısı} / \text{toplam tohum sayısı}) \times 100$$

d. Çimlenme hızı katsayısı (CHK): Çimlenme hızı katsayısı aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır (Maguire 1962). Formülde T_i , denemenin başladığı günden itibaren gün sayısı, N_i ise gün başına çimlenen tohum sayısı.

$$CHK = \sum N_i / \sum N_i T_i \times 100$$

e. Ortalama çimlenme zamanı (OÇZ): Ortalama çimlenme zamanı aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır (Kaya *et al.* 2006). Formüldeki f , sayım günündeki çimlenen tohum sayısını; x , sayım yapılan gün sayısını göstermektedir.

$$OÇZ (\text{gün}) = \sum (fx) / \sum f$$

f. Çimlenme hızı indeksi (ÇHİ): Aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$ÇHİ = (N_i) / (T_i)$$

Formülde T_i , denemenin başladığı günden itibaren gün sayısı, N_i ise gün başına çimlenen tohum sayısı (Maguire 1962).

g. Çim gücü indeksi (ÇGİ): Çimlenme gücü indeksi aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır (Abdul-Baki and Anderson 1970).

$$ÇGİ = (\text{ortalama sürgün uzunluğu} + \text{ortalama kök uzunluğu}) \times \text{toplam çimlenme yüzdesi}$$

h. Çimlenme ile ilgili karakterlere ait verilerinin istatistiksel analizi

Bu parametreler üzerine uygulama konsantrasyonunun ve süresinin etkisi 4x5 faktöriyel düzende tam şansa bağlı deneme planına göre 4 tekerrürlü olarak varyans analizine tabi tutulmuştur. Bu parametrelere ait ortalamalar arasındaki farklar %5 önem seviyesinde Duncan çoklu karşılaştırma testi ile belirlenmiştir. Konsantrasyon x süre uygulamasına

ait interaksiyon etkisi basit ana etki ile süreler içinde konsantrasyonlar karşılaştırılarak açıklanmıştır.

2. Çim ile ilgili karakterler

Tohumlar çimlendirme ortamına konulduktan sonra 14 gün sonra her petri kutusundan 10'ar adet çim şansa bağlı olarak alınmış, bunlarda aşağıda verilen karakterler ölçülmüş ve ortalamaları alınarak hesaplanmıştır.

a. Toplam embriyonal kök sayısı: Her bir fidede oluşan embriyonal köklerin tamamı sayılarak ve ortalaması alınarak belirlenmiştir.

b. Kök uzunluğu (cm) (KU): İncelenen her bir fidede en uzun kökün uzunluğu milimetrik cetvel ile ölçülmüş ve ortalaması alınmıştır.

c. Sürgün uzunluğu (cm) (SU): Sürgünün tohumdan ilk çıktığı yerden yaprak ucuna kadar olan uzunluk milimetrik cetvelle ölçülmüş ve ortalamaları alınarak hesaplanmıştır.

d. Koleoptil uzunluğu (cm) (KOU): Tohum ile yaprağın çıktığı çim kını ucu arasındaki kısım milimetrik cetvelle ölçülerek tespit edilmiştir.

e. Çim uzunluğu (cm) (ÇU): Kök ucu ile yaprak ucu arasındaki mesafe milimetrik cetvelle ölçülerek tespit edilmiştir.

f. Kök yaş ağırlığı (g) (KYA): On fidenin tamamından ayrılan embriyonal köklerin yaş ağırlığı hassas terazide tartılmış ve elde edilen değer ona bölünmek suretiyle tespit edilmiştir.

g. Kök kuru ağırlığı (g) (KKA): Yaş ağırlığı belirlenen kökler 72°C’de 72 saat kurutulduktan sonra hassas terazide tartılarak kök kuru ağırlığı belirlenmiştir.

h. Sürgün yaş ağırlığı (g) (SYA): Her bir tekerrürde örneklenen on fidenin tamamında önce sürgünler ayrılmış, daha sonra hassas terazide tartılmış ve elde edilen değer 10’a bölünerek her bir fidenin sürgün yaş ağırlığı belirlenmiştir.

i. Sürgün kuru ağırlığı (g) (SKA): Yaş ağırlığı belirlenen sürgünler 72°C’de 72 saat kurutulduktan sonra hassas terazide tartılarak sürgün kuru ağırlığı belirlenmiştir. Daha sonra elde edilen değer 10’a bölünerek her bir sürgünün kuru ağırlığı tespit edilmiştir.

g. Çim ile ilgili karakterlere ait verilerin istatistiksel analizi

Bu parametreler üzerine uygulama konsantrasyonunun ve süresinin etkisi 4x5 faktöriyel düzende tam şansa bağlı deneme planına göre 4 tekerrürlü olarak varyans analizine tabi tutulmuştur. Bu parametrelere ait ortalamalar arasındaki farklar %5 önem seviyesinde Duncan çoklu karşılaştırma testi ile belirlenmiştir. Konsantrasyon x süre uygulamasına ait interaksiyon etkisi basit ana etki ile süreler içinde konsantrasyonlar karşılaştırılarak açıklanmıştır.

3. Fide ile ilgili karakterler

Daha önce belirtilen işlem uygulanmış tohumlar kullanılmıştır. 20 kombinasyonun her biri için toplam 100 tohum 25’er adetlik dört gruba ayrılmış ve her bir grup bir sıraya ekilmiştir. Böylece, deneme dört tekerrürlü olarak yürütülmüştür. Serada yapılan çalışmalarda içerisinde torf bulunan 100×100×30 cm boyutlarında ahşap kasalar kullanılmıştır. M₁ fidelerinde ekimden itibaren 28. günde aşağıda verilen karakterler incelenmiştir (Şekil 3.5).



(a)



(b)



(c)



(d)

Şekil 3.5. EMS ve sodyum azit mutagenleri uygulanmış tohumların kasalara ekilmesi ve yetiştirilmesi.

(a) Ekim için ortamın hazırlanması. (b) Tohumların ekilmesi. (c) Ekimden hemen sonraki görüntüsü. (d) Ekimden 28 gün sonraki görüntüsü.

a. Çıkış oranı (%) (ÇO): Kasalara ekim yapılan tohumlardan çıkış yapanlar ekimden 8 gün sonra sayılmaya başlanmış ve bu işlem çıkış tamamlanıncaya kadar devam etmiştir. Elde edilen veriler ekimi yapılan toplam tohum sayısına oranlararak çıkış oranı (%) belirlenmiştir (Sakin 1998).

b. İlk yaprak ayası uzunluğu (cm) (İYU): Çıkıştan sonra ilk gelişmesini tamamlayan fidelerde 28. günde ilk yaprağın ayasının tabanından ucuna kadar olan uzunluk milimetrik cetvelle ölçülerek belirlenmiştir (Sakin 1998).

c. Kök uzunluğu (cm) (KU): İlk yaprak uzunluğunun ölçüldüğü gün, aynı fidelerin kökleri suyla yıkanarak topraktan temizlenmiş ve kök boğazından itibaren en uzun kökün ucuna kadar olan mesafe ölçülerek belirlenmiştir (Sakin 1998).

d. Sürgün uzunluğu (cm) (SU): Sürgünün tohumdan ilk çıktığı yerden yaprak ucuna kadar olan uzunluk milimetrik cetvelle ölçülmüş ve ortalamaları alınarak hesaplanmıştır (Sakin 1998).

e. Fide boyu (cm) (FB): İlk yaprak uzunluğu ölçülen bitkilerde aynı gün fide boyu, toprak yüzeyinden fidenin ucuna kadar olan uzunluk ölçülerek tespit edilmiş (Sakin 1998).

f. Fide ile ilgili karakterlere ait verilerin istatistiksel analizi

Bu parametreler üzerine uygulama konsantrasyonunun ve süresinin etkisi 4x5 faktöriyel düzende tam şansa bağlı deneme planına göre 4 tekerrürlü olarak varyans analizine tabi tutulmuştur. Bu parametrelere ait ortalamalar arasındaki farklar %5 önem seviyesinde Duncan çoklu karşılaştırma testi ile belirlenmiştir. Konsantrasyon x süre uygulamasına ait interaksiyon etkisi basit ana etki ile süreler içinde konsantrasyonlar karşılaştırılarak açıklanmıştır.

4. Optimum dozunun (LD₅₀) tespit edilmesi:

Kimyasal mutagenlerin optimum konsantrasyonunun ve uygulama süresinin belirlenmesinde LD₅₀ (letal dozun) kriteri esas alınmıştır. Tahıllarda LD₅₀ değerinin belirlenmesinde M₁ kuşağında çimlenme oranı, çıkış oranı ve fide boyu gibi karakterlerden yararlanılabilmektedir (Tosun 2015). Bu nedenle, burada söz konusu karakterler yönünden LD₅₀ değeri incelenmiştir.

3.5.2.b. Tarla koşullarında yapılan çalışmalar

1. Tohumlara kimyasal mutagen uygulamaları

a. Etil metansülfonat (EMS) uygulaması

EMS uygulamasında (Spano *et al.* 2003) ve FAO/IAEA (2012) tarafından belirtilen yöntemler izlenmiştir. Öncelikle saf tohumluktan 10.000 adet tohum sayılmış ve EMS uygulamadan önce ön ıslatmaya alınmıştır. Bu amaçla tohumlar musluk suyunda bir kap içerisinde oda sıcaklığında (22-24°C) 4 saat süreyle bekletilmişlerdir. Bu sırada 1000 ml'lik %0.3'lük EMS solüsyonunu hazırlamak için EMS'den 3 ml alınmış ve üzeri distile su ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır. Böylece hazırlanan solüsyonun pH'sı 0.5 M sodyum fosfat tamponunda 7'ye ayarlanmıştır. Ön ıslatmadan alınan tohumlar EMS'nin %0.3'lük solüsyonunda 6 saat süreyle oda sıcaklığında bekletilmişlerdir. Bu sürenin sonunda, mutageni uzaklaştırılmak için tohumlar akan musluk suyunda 4 saat süre ile yıkanmıştır. Yıkama işleminin ardından tohumlar kurutma kağıdının üzerine tek tabaka halinde olacak şekilde yayılarak oda sıcaklığında yaklaşık 24 saat süre ile kurutulmuş ve ardından ekilmiştir.

b. Sodyum azit uygulaması

Sodyum azit (NaN_3) uygulamasında Li *et al.* (2008) ve FAO/IAEA (2012) tarafından belirtilen yöntemler izlenmiştir. Öncelikle saf tohumluktan 10.000 adet tohum sayılmış ve mutagen uygulamadan önce ön ıslatmaya alınmıştır. Bu amaçla tohumlar musluk suyunda bir kap içerisinde oda sıcaklığında (22-24°C) 24 saat süreyle bekletilmişlerdir. Bu sırada 1 mM'lık sodyum azit solüsyonunu hazırlamak için sodyum azitten 0.065 mg tartılmış ve üzeri distile su ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır. Böylece hazırlanan solüsyonun pH'sı 0.5 M sodyum fosfat tamponunda 3.2'ye ayarlanmıştır. Ön ıslatmadan alınan tohumlar sodyum azitin 1 mM'lık solüsyonunda 2 saat süreyle oda sıcaklığında bekletilmişlerdir. Bu sürenin sonunda, mutageni uzaklaştırılmak için tohumlar akan musluk suyunda 20 dakika süre ile yıkanmıştır. Yıkama işleminin ardından tohumlar

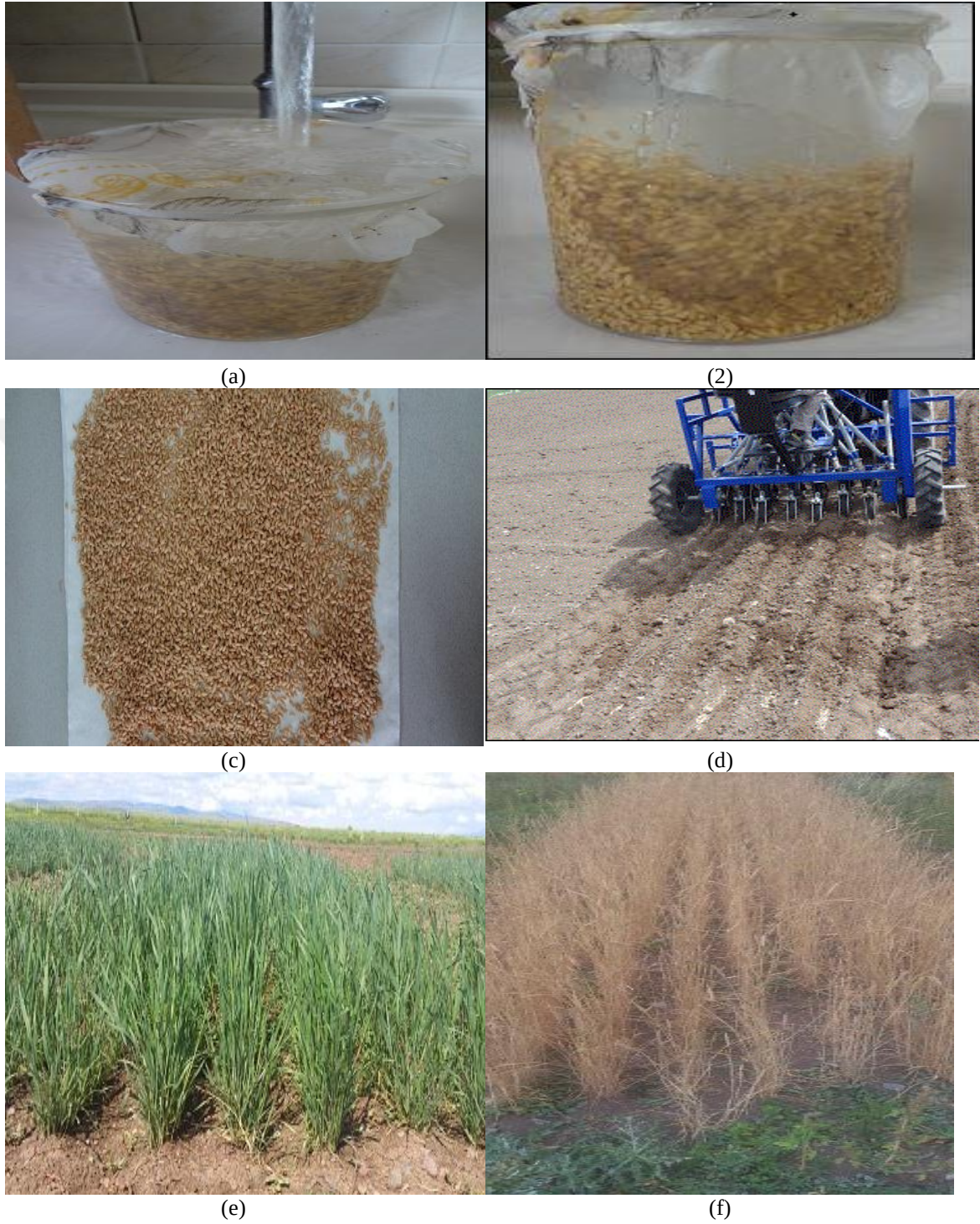
kurutma kağıdının üzerine tek tabaka halinde olacak şekilde yayılarak oda sıcaklığında yaklaşık 24 saat süre ile kurutulmuş ve ardından ekilmiştir.

2. Mutantların yetiştirilmesi ve incelenen konular

a. M₁ kuşağında yapılan işlemler

- Tohumların ekimi

Deneme, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Araştırma ve Yayım Merkezi Müdürlüğünün 4 nolu deneme alanında 2013 yılında yürütülmüştür. Tarla çalışmalarında iki ayrı kimyasal mutagen tipi için iki farklı parsel kullanılmıştır. Mutasyonlar genellikle ana sapta ve birinci kardeşte bulunacakları için ekim sıklığı kardeşlenmeyi en aza indirecek şekilde yapılmıştır. Bu nedenle, araştırmanın ilk yılında kardeşlenmeyi en aza indirmek için 575 tohum/m² hesabıyla ekim yapılmıştır. Daha önce belirtildiği şekilde mutagen uygulanmış M₁ tohumları 15 Nisan tarihinde ekilmiştir. Denemede her mutagenli grup 10 m uzunluğunda 1 m genişliğinde (5 sıra × 20 cm sıra arası) olmak üzere 10 m²'lik parsellere ekim yapılmıştır (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. EMS ve sodyum azit mutagenlerinin uygulanışından ve bitkilerin olgunluğuna kadar geçen dönemde yapılan bazı işlemler.

(a) Tohumların ön ıslatmaya alınması. (b) Tohumların mutagen solüsyonunda bekletilmesi. (c) Mutagen uygulamasından sonra yıkanmış tohumların kurutulması. (d) Tohumların tarlaya ekimi. (e) Ekimden sonra 60'ıncı günde M_1 bitkilerinin görünüşleri. (f) Olgunlaşmış M_1 bitkilerinin görünüşleri.

- Bakım, hasat ve harman

İşlem uygulanmış tohumlarda çimlenme oranı ve çimlenen tohumlardan gelişen M_1 bitkilerinde gümrahlık azalacağı için bakım işlemleri düzenli bir şekilde yapılmıştır. Bu amaçla, dekara 6 kg N ve 5 kg P_2O_5 olacak şekilde gübreleme yapılmıştır. Fosforun tamamı ile azotun yarısı ekimle birlikte, azotun diğer yarısı ise sapa kalkma döneminde sıra aralarına elle serpmeye şeklinde uygulanmıştır (Akkaya 1993). Yabancı ot mücadelesi gerektiğinde elle yolunarak yapılmıştır.

Bitkiler hasat olgunluğuna geldiklerinde toplu olarak hasat ve harman edilmiş ve böylece elde edilen M_2 tohumları uygun koşullarda depolanmıştır.

b. M_2 kuşağında yapılan işlemler

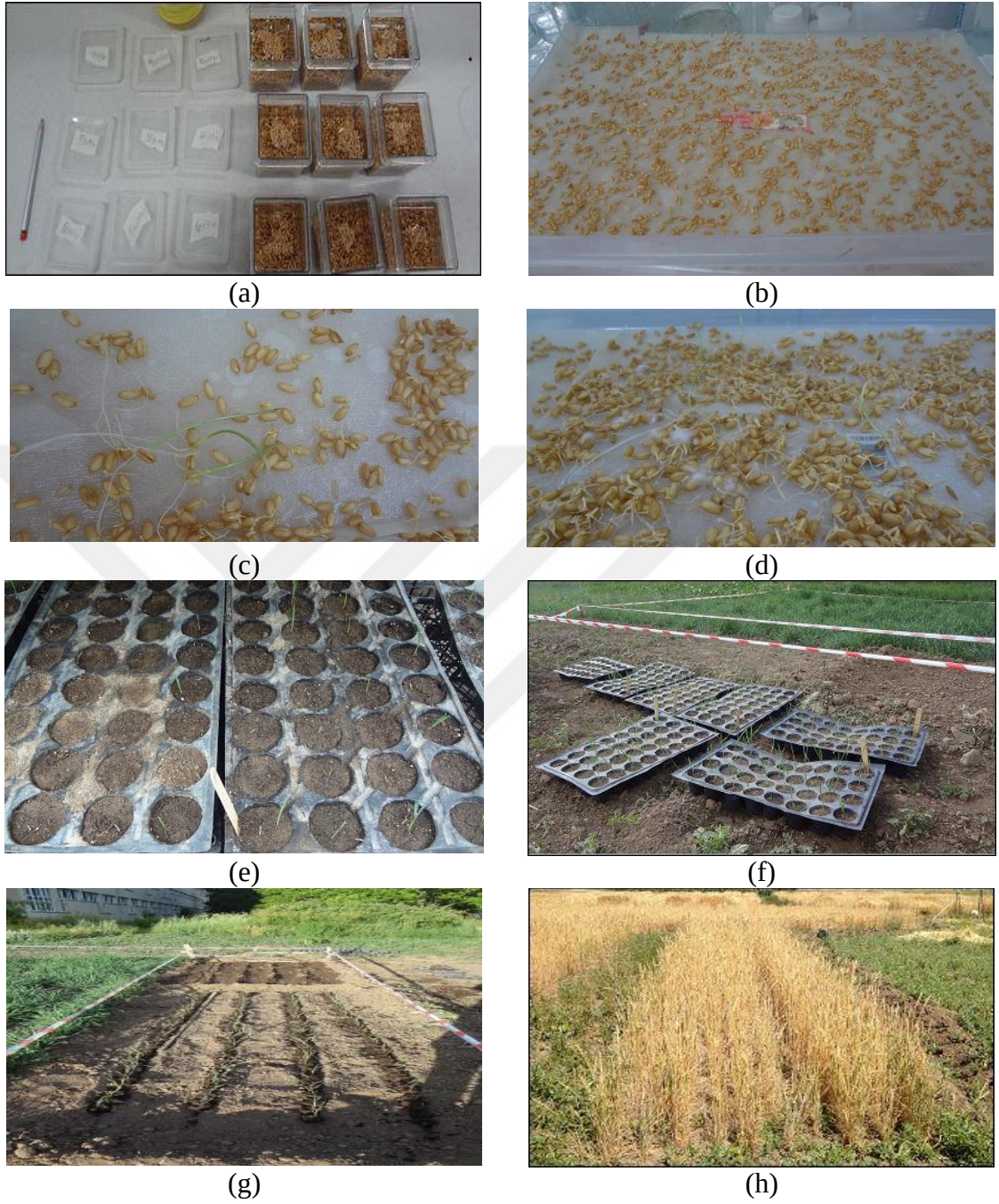
- Seleksiyon için kullanılan kuraklık konsantrasyonunun belirlenmesi

Kurağa toleranslıkta kritik aşamalardan birisi çimlenme dönemidir. Bu dönemde M_2 kuşağına ait tohumlarda kuraklığa toleranslı mutantları seçebilmek için PEG 6000 ile oluşturulmuş stresten yararlanılmıştır. Öncelikle kuraklığa toleranslıkta etkili bir seleksiyon yapabilmek için en uygun PEG 6000 konsantrasyonu belirlenmiştir. Bu amaçla herhangi bir mutagen uygulanmamış tohumlar PEG 6000 ile oluşturulmuş 11 farklı ozmotik potansiyele [0 (saf su), -1, -2, -3, -4, -5, -6, -7, -8, -9 ve -10 bar] sahip petri kutuları içerisinde iki çimlenme kağıdı (1 numaralı watman kağıdı) arasında çimlendirmeye alınmak suretiyle bir ön deneme yapılmıştır. PEG'in farklı konsantrasyonlarında oluşturulan ozmotik potansiyeller Michel and Kaufmann (1973)'a göre hesaplanmıştır. Her petri kutusuna 100 adet tohum ve bunların üzerine farklı ozmotik potansiyele sahip çözeltiden 10 ml konulmuştur. Tohumlar $25^{\circ}C$ ve 16 saat Işık : 8 saat karanlık şartlarda 14 gün süreyle çimlendirilmeye alınmıştır. Bu sürenin sonunda her konsantrasyon için çimlenme oranları ayrı ayrı belirlenmiştir. Buna göre çimlenme oranları, 0 (%100), -1 (%99), -2 (%98), -3 (%96), -4 (%90), -5 (%87), -6 (%83), -7 (%20), -8 (%13), -9 (%2), -10 bar'da ise herhangi bir çimlenme olmamıştır.

Buradan elde edilen veriler esas alınarak -10 bar'lık konsantrasyonda etkili bir seleksiyon gerçekleştirilebileceği sonucuna varılmış ve çimlenme döneminde kurağa toleranslı olanları seçebilmek için bu ozmotik potansiyel kullanılmıştır.

- Kurağa toleranslı genotiplerin seçimi

Mutasyonlar genellikle resesif oldukları için açılımlar M_2 kuşakta ortaya çıkacak, bu nedenle seleksiyona M_2 kuşağında başlanmıştır. Bu aşmada, daha önce hasat edilen M_2 tohumları -10 bar'lık PEG 6000 ortamında çimlendirmeye alınmış böylece erken dönemde (çimlenme dönemi) kurağa toleranslılık yönünden test edilmiş ve dolayısıyla seleksiyon yapılmıştır. M_2 tohumları musluk suyunda yıkandıktan sonra %70'lik etil elkolde (EtOH) 3 dakika karıştırılarak steril kabin içerisinde 3 defa steril saf suyla yıkanmıştır ve birkaç damla Tween 20 (Sigma) içeren % 20'lik sodyum hipokloritte 25 dakika karıştırılarak suretiyle yüzey sterilizasyonu yapılmıştır. Bu amaçla $50 \times 40 \times 10$ cm³ boyutlarında 10 adet plastik kap kullanılmıştır. Herbir kapta 2.000 adet M_2 tohumu olacak şekilde toplam 20.000 adet M_2 tohumu nemlendirilmiş kurutma kağıtları arasında çimlendirmeye alınmıştır. Nemlendirme işlemi -10 bar'lık PEG 6000 solüsyonu ile yapılmıştır. Tohumlar bu ortamda 15 gün süre ile bekletilmiş, bu sırada gerektikçe -10 bar'lık solüsyon ile nemlendirme işlemine devam edilmiştir. Bu süre sonunda çimlenen tohumlar önce içerisinde toprak bulunan plastik viyollere aktarılmış ve bu ortamda 1 ay süre ile tutulmuştur. Bu sürenin ardından bitkiler tarlaya şaşırtılmış ve bunlardan M_3 tohumları ayrı ayrı hasat edilmiş ve depolanmıştır. Yukarıda açıklanan uygulama hem EMS hemde sodyum azit için ayrı ayrı yapılmıştır (Şekil 3-7).



Şekil 3.7. M_2 tohumlarında çimlenme döneminde kurağa toleranslı genotiplerin seleksiyonu ve sonrasında yapılan işlemler.

(a) M_2 tohumlarının sterilizasyon amacıyla %70'lik etil elkolde bekletilmesi. (b) Tohumların PEG 6000 ortamında kağıt üzerinde çimlendirilmesi. (c) EMS uygulanmış tohumların PEG 6000 ortamında 15. günde çimlenme durumu. (d) Sodyum azit uygulanmış tohumların PEG 6000 ortamında 15. günde çimlenme durumu. (e) Çimlenmiş tohumların viyollere ekimi. (f) Viyollerde gelişen fidelerin tarlaya şaşırtılması. (g) Tarladaki bitkilerin ekimden sonra 30'uncu günde M_2 bitkilerinin görünüşleri. (h) Tarladaki bitkilerin hasat öncesi görünüşleri.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

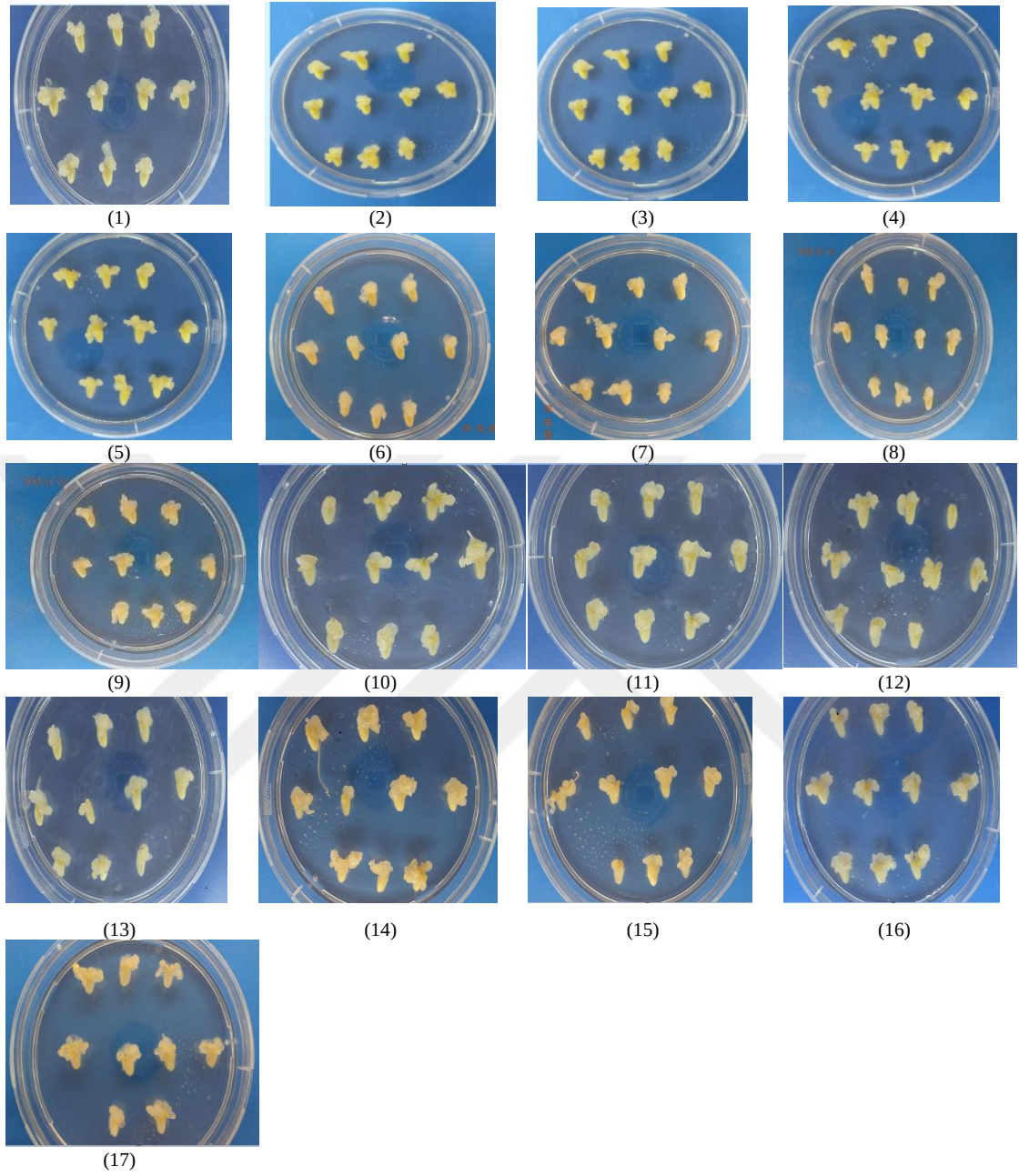
4.1. Birinci Yöntemde Elde Edilen Bulgular

4.1.1. Olgun tohumlara mutagen uygulaması

4.1.1.a. Olgun embriyo kültürüne etil metansülfonatın (EMS) etkileri

1) Kallus oluşum (KO) oranı

Eksplantlar ortama konulduktan yaklaşık 3-4 gün sonra kalluslar oluşmaya başlamıştır. Mutagen uygulama süresinin kısa ve konsantrasyonların düşük olduğu uygulamalarda kalluslar morfolojik olarak büyük ve sıkı yapılı iken, uygulama süresi ve konsantrasyonu arttıkça daha sulu olmuşlar ve az miktarda da olsa küçülmeler meydana gelmiştir. 2 saatlik uygulama süresinde EMS'nin tüm konsantrasyonlarında kallus oluşumunda morfolojik olarak önemli bir farklılık gözlenmemiştir. Örneğin, %0.1'lik konsantrasyonda kalluslar büyük ve sıkı iken, diğer tüm konsantrasyonlarda hafif sulu ve sıkı yapıda olmuşlardır. 4, 6 ve 8 saatlik uygulama sürelerinde %0.1, %0.2, %0.3 ve %0.4'lük konsantrasyonlarda kallus yapısında gözlemlenen farklılıklar, 2 saatlik uygulamada belirtildiği şekilde olmuştur (Şekil 4.1). Kalluslar 30 gün boyunca bu ortamda tutularak gelişmeleri sağlanmıştır.



Şekil 4.1. EMS'nin farklı süre ve konsantrasyonlarında meydana gelen kallusların görünümleri.

(1) kontrol, (2) 2 saat + %0.1, (3) 2 saat + %0.2, (4) 2 saat + %0.3, (5) 2 saat + %0.4, (6) 4 saat + %0.1, (7) 4 saat + %0.2, (8) 4 saat + %0.3, (9) 4 saat + %0.4, (10) 6 saat + %0.1, (11) 6 saat + %0.2, (12) 6 saat + %0.3, (13) 6 saat + %0.4, (14) 8 saat + %0.1, (15) 8 saat + %0.2, (16) 8 saat + %0.3 ve (17) 8 saat + %0.4 konsantrasyonlarda kallusların görünümleri.

KO oranı üzerine EMS'nin uygulama süresinin etkisi çok önemli ($P<0.01$) iken, konsantrasyonun önemli bir etkisi olmamış ve yine süre $\times$ konsantrasyon interaksyonu da önemsiz olmuştur (Çizelge 4.1).

Uygulama süresi uzadıkça genel olarak KO oranı azalmıştır. Nitekim ortalamalar esas alınarak değerlendirildiğinde en yüksek KO oranı (%100) 2 saatlik uygulama süresinden, en düşük (%0.94.75) ise 6 saatlik uygulama süresinden elde edilmiştir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2'de görüleceği gibi uygulama konsantrasyonu arttıkça kallus oluşum oranı azalmıştır. Ortalamalar esas alınarak değerlendirildiğinde, en yüksek KO oranının (%99) kontrolden (%0.0), en düşük ise (%96.50) %0.3'lük konsantrasyonda gerçekleştiği görülmektedir (Çizelge 4.2).



Çizelge 4.1. Olgun embriyolara farklı süre ve dozlarda EMS uygulamasından sonra *in vitro* ortamda incelenen bazı karakterlere ait varyans analizi sonuçları.

Varyasyon Kaynağı	Kareler ortalaması											
	SD	KO	ESEKO	KSEKO	ESCEK	KSCEK	EKSCEK	ESCSE	KSCSE	EKSCE	RE	BS
Süre (saat)	3	172.50**	2816.00**	3704.24**	3349.33**	4219.43**	8177.98**	96.57**	82.77**	361.55**	1.66**	21.13**
Konsantrasyon (%)	4	39.25	3498.25**	2768.41**	8915.75**	7869.83**	1604.89**	31.82**	27.64**	12.66	4.36**	65.64**
Süre × Konsantrasyon	12	24.58	488.92**	587.13**	414.75**	511.74**	591.37**	11.06**	10.05**	39.28**	3.21**	36.19**
Hata	180	23.50	98.56	98.14	137.56	145.52	91.08	3.09	3.30	6.92	0.18	2.25
Toplam	200											

*, p<0.05; **: p<0.01 düzeyinde önemlidir.

Çizelge 4.2. Olgun embriyolara farklı süre ve dozlarda EMS uygulamasından sonra *in vitro* ortamda incelenen bazı karakterlere ait veriler.

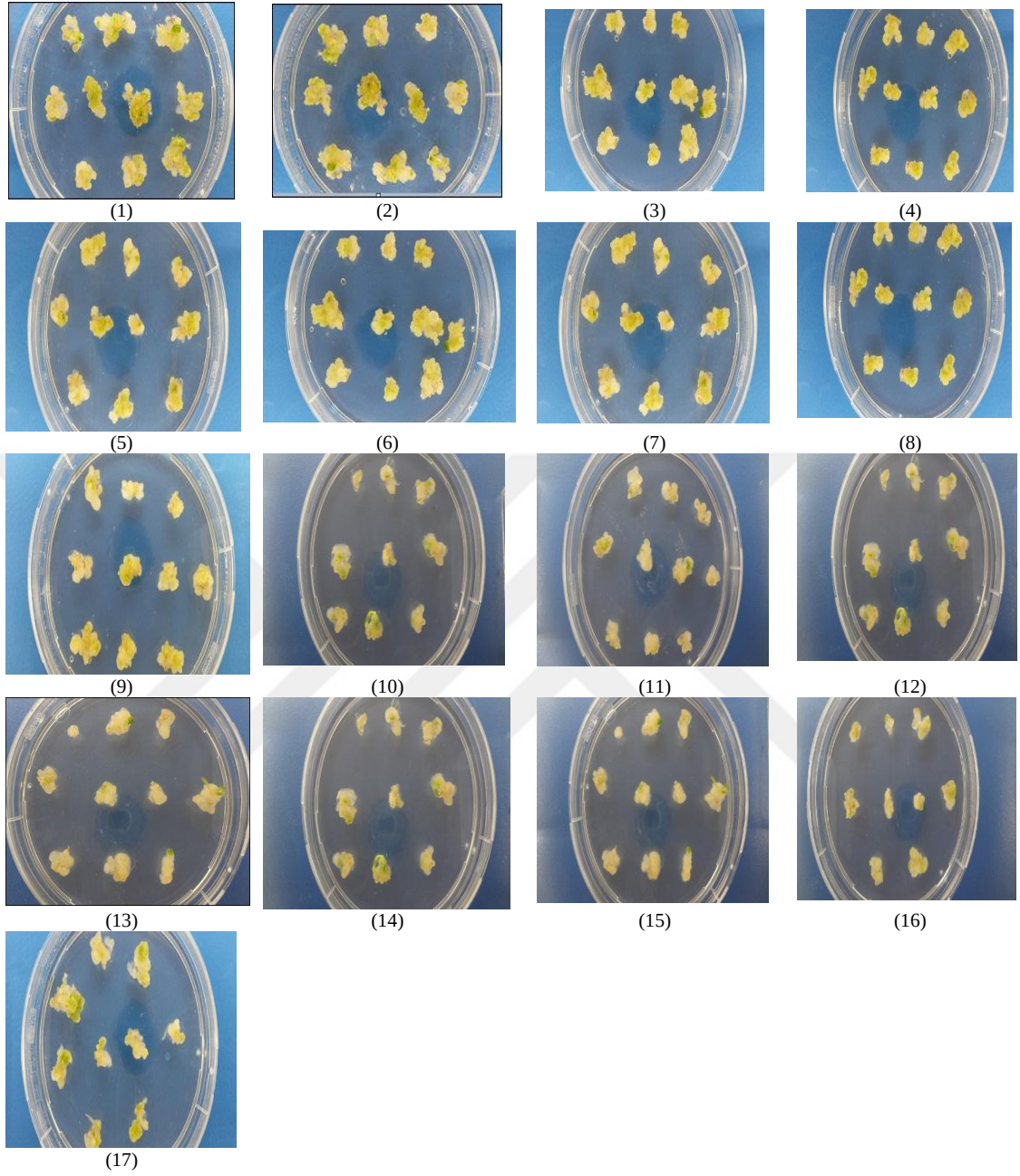
Süre (saat)	Konsantrasyon (%)	KO (%)	ESEKO (%)	KSEKO (%)	ESCEK (%)	KSCEK (%)	EKSCEK (%)	ESCSE (adet)	KSCSE (adet)	EKSCE (adet)	RE (adet)	BS (adet)
2	0	100.00	100.00 ^{a2}	100.00 ^a	100.00 ^a	100.00 ^a	100.00 ^a	8.33	8.33	8.33 ^c	0.66 ^c	6.60 ^c
	0.1	100.00	74.00 ^{bc}	74.00 ^{bc}	69.00 ^{bc}	69.00 ^{bc}	93.57 ^{ab}	7.79	7.79	10.79 ^{bc}	0.73 ^c	5.00 ^c
	0.2	100.00	62.00 ^d	62.00 ^d	58.00 ^c	58.00 ^c	93.65 ^{ab}	9.07	9.07	14.89 ^a	1.70 ^a	9.60 ^b
	0.3	100.00	78.00 ^b	78.00 ^b	74.00 ^b	74.00 ^b	95.41 ^{ab}	9.63	9.63	12.74 ^{ab}	1.66 ^a	12.00 ^a
	0.4	100.00	66.00 ^{cd}	66.00 ^{cd}	61.00 ^c	60.99 ^c	90.08 ^b	9.02	9.02	14.54 ^a	1.19 ^b	5.90 ^c
	Ortalama	100.00^{A1}	76.00^B	76.00^B	72.40^B	72.39^B	94.54^A	8.76^A	8.76^A	12.26^A	1.19^A	7.82^A
4	0	99.00	98.00 ^a	98.00 ^a	98.00 ^a	98.00 ^a	98.00 ^a	8.32 ^a	8.32 ^a	8.32 ^a	0.64 ^{bc}	6.70 ^{ab}
	0.1	99.00	88.00 ^b	88.88 ^{bc}	47.00 ^b	47.55 ^c	52.86 ^c	4.46 ^c	4.48 ^c	5.24 ^b	1.56 ^a	7.60 ^a
	0.2	97.00	93.00 ^{ab}	96.00 ^{ab}	54.00 ^b	56.00 ^{bc}	58.75 ^{bc}	5.25 ^{bc}	5.43 ^{bc}	5.69 ^b	0.99 ^b	7.00 ^{ab}
	0.3	95.00	88.00 ^b	92.66 ^{abC}	60.00 ^b	63.44 ^b	68.58 ^b	6.07 ^b	6.43 ^b	6.96 ^{ab}	0.42 ^c	6.00 ^b
	0.4	97.00	85.00 ^b	87.66 ^c	55.00 ^b	56.66 ^{bc}	64.46 ^{bc}	6.73 ^b	6.91 ^{ab}	7.89 ^b	0.72 ^{bc}	5.90 ^b
	Ortalama	97.40^B	90.40^A	92.64^A	62.80^C	64.33^C	68.53^B	6.16^{BC}	6.31^{BC}	6.82^C	0.86^B	6.64^B
6	0	99.00	98.00 ^a	98.00 ^a	98.00 ^a	98.00 ^a	98.00 ^a	8.28 ^a	8.28 ^a	8.28 ^a	0.65 ^c	6.50 ^c
	0.1	97.00	82.00 ^b	84.88 ^b	77.00 ^c	79.77 ^c	93.88 ^{ab}	5.65 ^b	5.79 ^b	6.84 ^{ab}	1.00 ^b	8.00 ^b
	0.2	94.00	79.00 ^b	84.03 ^b	76.00 ^c	80.92 ^c	96.63 ^a	4.38 ^b	4.78 ^b	5.75 ^{bc}	0.99 ^b	8.00 ^b
	0.3	93.00	82.00 ^b	88.52 ^b	77.00 ^c	83.30 ^{bc}	93.98 ^{ab}	5.07 ^b	5.45 ^b	6.11 ^{bc}	1.22 ^b	8.20 ^b
	0.4	95.00	95.00 ^b	100.00 ^a	86.00 ^b	90.66 ^{ab}	90.66 ^b	4.53 ^b	4.86 ^b	4.86 ^c	2.61 ^a	9.80 ^a
	Ortalama	95.60^B	87.20^A	91.08^A	82.80^A	86.53^A	94.63^A	5.58^C	5.83^C	6.37^C	1.29^A	8.10^A
8	0	98.00	98.00 ^a	98.00 ^a	98.00 ^a	98.00 ^a	98.00 ^a	8.10 ^a	8.10 ^a	8.10 ^{ab}	0.65 ^c	6.50 ^d
	0.1	95.00	74.00 ^b	78.00 ^b	68.00 ^b	71.66 ^b	92.10 ^{ab}	6.30 ^{bc}	6.64 ^{ab}	8.61 ^{ab}	0.34 ^c	3.10 ^e
	0.2	98.00	62.00 ^c	63.22 ^c	57.00 ^b	58.00 ^c	91.80 ^{ab}	6.54 ^{abC}	6.67 ^{ab}	10.75 ^a	1.57 ^{ab}	8.80 ^b
	0.3	98.00	73.00 ^b	74.55 ^b	69.00 ^b	70.44 ^b	93.88 ^{ab}	7.09 ^{ab}	7.26 ^a	10.20 ^a	1.79 ^a	10.10 ^a
	0.4	95.00	73.00 ^b	76.99 ^b	66.00 ^b	69.55 ^b	89.33 ^b	5.00 ^c	5.23 ^b	7.28 ^b	1.24 ^b	7.60 ^c
	Ortalama	96.80^B	76.00^B	78.15^B	71.60^B	73.53^B	93.02^A	6.60^B	6.78^B	8.99^B	1.12^A	7.22^B
Ortalama Konsantrasyon (%)	0	99.00	98.50 ^A	98.50 ^A	98.50 ^A	98.50 ^A	98.50 ^A	8.25 ^A	8.25 ^A	8.26	0.65 ^C	6.58 ^D
	0.1	97.75	79.50 ^B	81.44 ^B	65.25 ^{BC}	67.00 ^{CD}	83.10 ^C	6.05 ^C	6.18 ^C	7.88	0.90 ^B	5.93 ^D
	0.2	97.25	74.00 ^C	76.31 ^C	61.25 ^C	63.23 ^D	85.21 ^{AB}	6.31 ^{BC}	6.49 ^{BC}	9.27	1.31 ^A	8.35 ^B
	0.3	96.50	80.25 ^B	83.43 ^B	70.00 ^B	72.79 ^B	96.97 ^B	6.96 ^B	7.19 ^B	9.01	1.27 ^A	9.08 ^A
	0.4	96.75	79.75 ^B	82.66 ^B	67.00 ^B	69.47 ^{BC}	83.63 ^{BC}	6.32 ^{BC}	6.51 ^{BC}	8.65	1.44 ^A	7.30 ^C
LD₅₀ değeri		49.50	49.25	49.25	49.25	49.25	49.25	4.12	4.12	4.13	0.32	3.29

¹: Aynı sütunda aynı büyük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemsizdir.

²: Her bir uygulama süresi için aynı sütunda aynı küçük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemsizdir.

2) Embriyogenik kallus oluşum oranı

Sert dokulu, dağılabilir özellikte, sıkı yapılı ve krem renkli kalluslar embriyogenik kallus; beyaz ve sulu yapılı kalluslar ise embriyogenik olmayan kallus olarak değerlendirilmiştir. Embriyogenik kallus oluşum oranı kültüre alınan eksplant sayısına göre ve kallus sayısına göre olmak üzere iki şekilde değerlendirilmiştir. Kalluslar hormonsuz ortama konulduktan yaklaşık 7-8 gün sonra embriyogenik kalluslar oluşmaya başlamıştır. Embriyogenik kallusların büyüklüğü etil metansülfonatın hem uygulama süresine hem de konsantrasyonuna göre farklılık göstermiştir. Nitekim, 2 saatlik uygulama süresinde embriyogenik kallusların boyutu %0.3'l k konsantrasyonda en büyük olmuş, bunu azalan sıra ile %0.4, %0.1 ve %0.2'lik konsantrasyonlar izlemiştir. Buna karşın, 4 saatlik uygulama süresinde embriyogenik kallusların büyüklüğü bakımından konsantrasyonlara göre görülebilir bir farklılık oluşmamıştır. Diğer taraftan, hem 6 saatlik hem de 8 saatlik uygulama sürelerinde en büyük embriyogenik kalluslar %0.4'l k konsantrasyonda oluşmuştur (şekil 4.2). Embriyogenik kalluslar 15 gün boyunca bu ortamda tutularak gelişmeleri sağlanmıştır.



Şekil 4.2. EMS'nin farklı süre ve konsantrasyonlarında meydana gelen embriyogenik kallusların görünüşleri.

(1) kontrol, (2) 2 saat + %0.1, (3) 2 saat + %0.2, (4) 2 saat + %0.3, (5) 2 saat + %0.4, (6) 4 saat + %0.1, (7) 4 saat + %0.2, (8) 4 saat + %0.3, (9) 4 saat + %0.4, (10) 6 saat + %0.1, (11) 6 saat + %0.2, (12) 6 saat + %0.3, (13) 6 saat + %0.4, (14) 8 saat + %0.1, (15) 8 saat + %0.2, (16) 8 saat + %0.3 ve (17) 8 saat + %0.4 konsantrasyonlarda embriyogenik kallusların görünüşleri.

a. Eksplant sayısına göre embriyogenik kallus oluşum (ESEKO) oranı

ESEKO oranı üzerine mutagenin uygulama süresi ve konsantrasyonu ile bu iki faktör arasındaki interaksiyon çok önemli ($P<0.01$) olmuştur (Çizelge 4.1).

Uygulama süresi uzadıkça genel olarak ESEKO azalmıştır. Mutagen uygulama sürelerine göre ortalamalar esas alındığında en yüksek ESEKO oranı (%90.40) 4 saatlik uygulamadan elde edilmiş, bunu azalan sıra ile 6 saat (%87.20), 2 ve 8 saat (%76.00) uygulama süreleri izlemiştir. Bununla birlikte 2 saatlik uygulama ve 8 saatlik uygulamalar ve yine 4 ve 6 saatlik uygulamalar arasındaki farklılıklar önemsiz olmuştur (Çizelge 4.2).

Ortalamalar esas alınarak konsantrasyonlara göre değerlendirildiğinde, en yüksek ESEKO oranının kontrolde (%98.50), en düşük ise %0.2'lik konsantrasyonda (%74.00) gerçekteşiği belirlenmiştir. Bununla birlikte, EMS'nin %0.1, %0.3 ve %0.4'lük konsantrasyonları arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemsiz olmuştur (Çizelge 4.2).

ESEKO oranı üzerine EMS'nin uygulama süresinin etkisi kullanılan konsantrasyona göre farklılık göstermiştir. Bu nedenle uygulama süresi $\times$ konsantrasyon etkisi çok önemli ($P<0.01$) olmuştur (Çizelge 4.1). En yüksek ESEKO oranı tüm sürelerde kontrol uygulamasından; en düşük ESEKO oranı ise 2, 6 ve 8 saatlik uygulamanın %0.2 EMS konsantrasyonunda; 4 saatlik uygulamada ise %0.4'lük konsantrasyondan elde edilmiştir (Çizelge 4.2).

b. Kallus sayısına göre embriyogenik kallus oluşum (KSEKO) oranı

KSEKO oranı üzerine etil metansülfonatin uygulama süresi ve konsantrasyonu ile bu iki faktör arasındaki interaksiyon çok önemli ($P<0.01$) olmuştur (Çizelge 4.1).

Ortalama kallus sayısına göre embriyogenik kallus oluşum oranı en yüksek KSEKO oranının %92.64 ile 4 saatlik uygulamadan elde edildiği, bunu çok küçük bir farkla 6 saatlik (%91.08) uygulamanın izlediği ve bu karakter bakımından en düşük değer %76.00 ile 2 saatlik uygulamaya ait olduğu görülmüştür (Çizelge 4.2).

Ortalamalar bakımından konsantrasyonlar karşılaştırıldığında, en yüksek KSEKO oranı kontrolde (%98.50), en düşük ise (%76.31) %0.2'lik konsantrasyonda elde edilmiştir. Diğer taraftan, %0.1, %0.3 ve %0.4'lük konsantrasyonlarda elde edilen değerler birbirine çok yakın olmuş ve konsantrasyonlar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır (Çizelge 4.2).

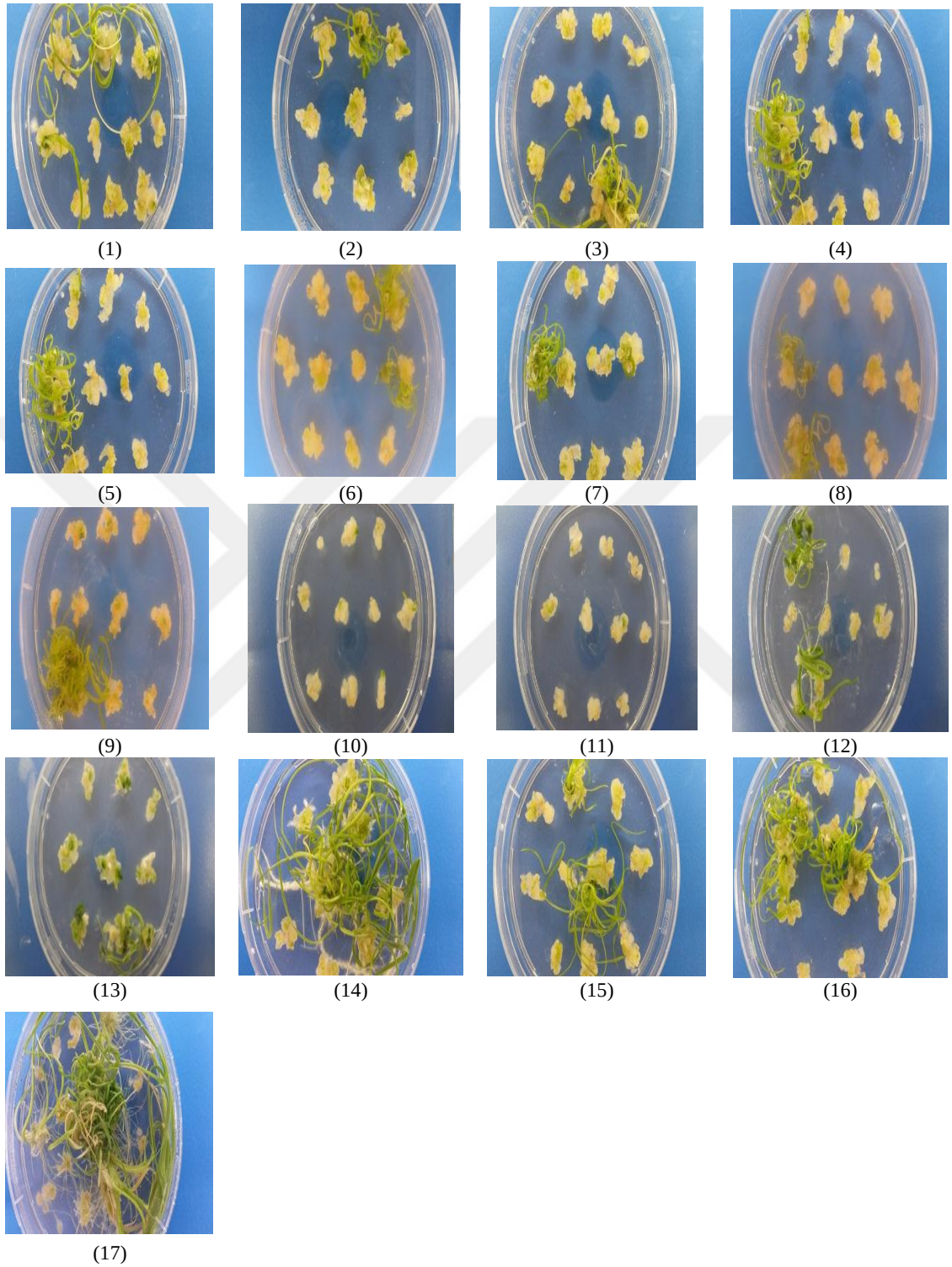
KSEKO oranı üzerine EMS'nin uygulama süresinin etkisi, kullanılan miktara göre değişiklik göstermesi nedeniyle uygulama süresi $\times$ konsantrasyonun etkisi çok önemli ($P < 0.01$) olmuştur (Çizelge 4.1). Her uygulama süresine göre EMS miktarının etkisi karşılaştırıldığında tüm uygulama sürelerinde en yüksek KSEKO oranı kontrol uygulamalarından elde edilmiştir. En düşük KSEKO oranı ise ESEKO oranında olduğu gibi, 2, 6 ve 8 saatlik uygulamalarda %0.2'lik konsantrasyonda; 4 saatlik uygulama süresinde ise %0.4 konsantrasyonda elde edilmiştir (Çizelge 4.2).

3) Cevap veren embriyogenik kallus oranı

Kök ve sürgüne sahip bitkicik meydana getiren embriyogenik kalluslar cevap veren embriyogenik kallus olarak değerlendirilmiştir. Cevap veren embriyogenik kallus oranı eksplant sayısına, kallus sayısına ve embriyogenik kallus sayısına göre üç şekilde değerlendirilmiştir. Embriyogenik kalluslar hormonsuz ortama konulduktan yaklaşık 6-8 gün sonra cevap veren embriyogenik kalluslar oluşmaya başlamıştır. Cevap veren embriyogenik kallusların büyüklüğü EMS'nin hem uygulama süresine hem de konsantrasyonuna göre farklılık göstermiştir. Nitekim, 2 saatlik uygulama süresinde cevap veren embriyogenik kallusların boyutu %0.3'lük konsantrasyonda en büyük olmuş, bunu azalan sıra ile %0.1, %0.4 ve %0.2'lik konsantrasyonlar izlemiştir. Buna karşın, 4 saatlik uygulama süresinde cevap veren embriyogenik kallusların büyüklüğü

bakımından konsantrasyonlara göre görülebilir bir farklılık oluşmamıştır. Diğer taraftan, 6 saatlik uygulama süresinde en büyük cevap veren embriyogenik kalluslar %0.4'lük konsantrasyonda, 8 saatlik uygulama süresinde ise %0.3'lük konsantrasyonunda oluşmuştur (Şekil 4.3). Cevap veren embriyogenik kalluslar 15 gün boyunca bu ortamda tutularak gelişmeleri sağlanmıştır.





Şekil 4.3. EMS'nin farklı süre ve konsantrasyonlarında meydana gelen cevap veren embriyogenik kallusların görünüşleri.

(1) kontrol, (2) 2 saat + %0.1, (3) 2 saat + %0.2, (4) 2 saat + %0.3, (5) 2 saat + %0.4, (6) 4 saat + %0.1, (7) 4 saat + %0.2, (8) 4 saat + %0.3, (9) 4 saat + %0.4, (10) 6 saat + %0.1, (11) 6 saat + %0.2, (12) 6 saat + %0.3, (13) 6 saat + %0.4, (14) 8 saat + %0.1, (15) 8 saat + %0.2, (16) 8 saat + %0.3 ve (17) 8 saat + %0.4 konsantrasyonlarda cevap veren embriyogenik kallusların görünüşleri.

a. Eksplant sayısına göre cevap veren embriyogenik kallus (ESCEK) oranı

ESCEK oranı üzerine mutagenin uygulama süresi ve konsantrasyonu ile bu iki faktör arasındaki interaksiyon çok önemli ($P<0.01$) etki oluşturmuştur (Çizelge 4.1).

Ortalamalar esas alınarak uygulama süresine göre değerlendirildiğinde en yüksek ESCEK oranı %82.80 ile 6 saatlik uygulamadan elde edilmiş, bunu %72.40 ile 2 saat ve %71.60 ile 8 saatlik uygulamalar izlemiştir. Bu karakter bakımından 4 saatlik uygulama %62.80 ile son sırada yer almıştır (Çizelge 4.2).

Ortalamalar bakımından konsantrasyonlar karşılaştırıldığında, en yüksek ESCEK oranı kontrolde (%98.50), en düşük ise %0.2'lik konsantrasyonda (%61.25) elde edilmiştir. Diğer taraftan, ESCEK oranı %0.1'lik konsantrasyonda %65.25, %0.2'lik konsantrasyonda 61.25, %0.3'lük konsantrasyonda 70.00 ve %0.4'lük konsantrasyonda 67.00 olmuştur. Bununla birlikte %0.3 ve %0.4'lük konsantrasyonlar arasındaki farklılıklar önemsiz olup, istatistiksel olarak aynı grupta yer almışlardır (Çizelge 4.2).

ESCEK oranı üzerine etil metansülfonatin uygulama süresinin etkisi kullanılan konsantrasyona göre farklılık göstermiştir. Bu nedenle uygulama süresi $\times$ konsantrasyonun etkisi çok önemli ($P<0.01$) olmuştur (Çizelge 4.1). En yüksek ESCEK oranı tüm sürelerde kontrol uygulamasından elde edilmiştir. En düşük ESEKO oranı ise 2, 4, 6 ve 8 saatlik uygulamalarda sırasıyla, %0.2, %0.1, %0.2 ve %0.2'lik konsantrasyonlarında elde edilmiştir (Çizelge 4.2).

b. Kallus sayısına göre cevap veren embriyogenik kallus (KSCEK) oranı

KSCEK oranı üzerine mutagenin hem uygulama süresi ve konsantrasyonu ile hem de bu iki faktör arasındaki interaksiyon çok önemli ($P<0.01$) olmuştur (Çizelge 4.1).

Ortalamalar esas alınarak uygulama süresine göre değerlendirildiğinde en yüksek EKSCCK oranı 6 saatlik uygulamada %86.53 iken, bu oran 2 saatlik uygulamada %72.39'a, 8 saatlik uygulamada 73.53'e ve 4 saatlik uygulamada %64.33'e kadar düşmüştür. Bununla birlikte 2 ve 4 saatlik uygulama süreleri arasındaki farklılıklar önemsiz olup, istatistiksel olarak aynı grupta yer almışlardır (Çizelge 4.2).

Ortalamalar esas alındığında, kontrolde %98.50 olan KSCEK oranı, %0.1'lik konsantrasyonda %67.00'ye, %0.2'lik konsantrasyonda %63.23'e, %0.3'lük konsantrasyonda 72.79'a ve %0.4'lük konsantrasyonda %69.47'ye düşmüştür. Bununla birlikte %0.1 ve %0.2 ve yine %0.3 ve %0.4'lük konsantrasyonlar arasındaki farklılıklar önemsiz olup, istatistiksel olarak aynı grupta yer almışlardır (Çizelge 4.2).

KSCEK oranı üzerine EMS'nin uygulama süresinin etkisi, kullanılan miktara göre değişiklik göstermesi nedeniyle uygulama süresi $\times$ konsantrasyonun etkisi çok önemli ($P<0.01$) olmuştur (Çizelge 4.1). Her uygulama süresine göre EMS miktarının etkisi karşılaştırıldığında tüm uygulama sürelerinde en yüksek KSCEK oranı kontrol uygulamalarından elde edilmiştir. En düşük KSCEK oranı ise ESCEK oranında olduğu gibi, 2, 6 ve 8 saatlik uygulamalarda %0.2'lik konsantrasyonda; 4 saatlik uygulama süresinde ise %0.1'lik konsantrasyonda elde edilmiştir (Çizelge 4.2).

c. Embriyogenik kallus sayısına göre cevap veren embriyogenik kallus (EKSCCK) oranı

EKSCCK oranı üzerine mutagenin uygulama süresi ve konsantrasyonu ile bu iki faktör arasındaki interaksiyon çok önemli ($P<0.01$) etki oluşturmuştur (Çizelge 4.1).

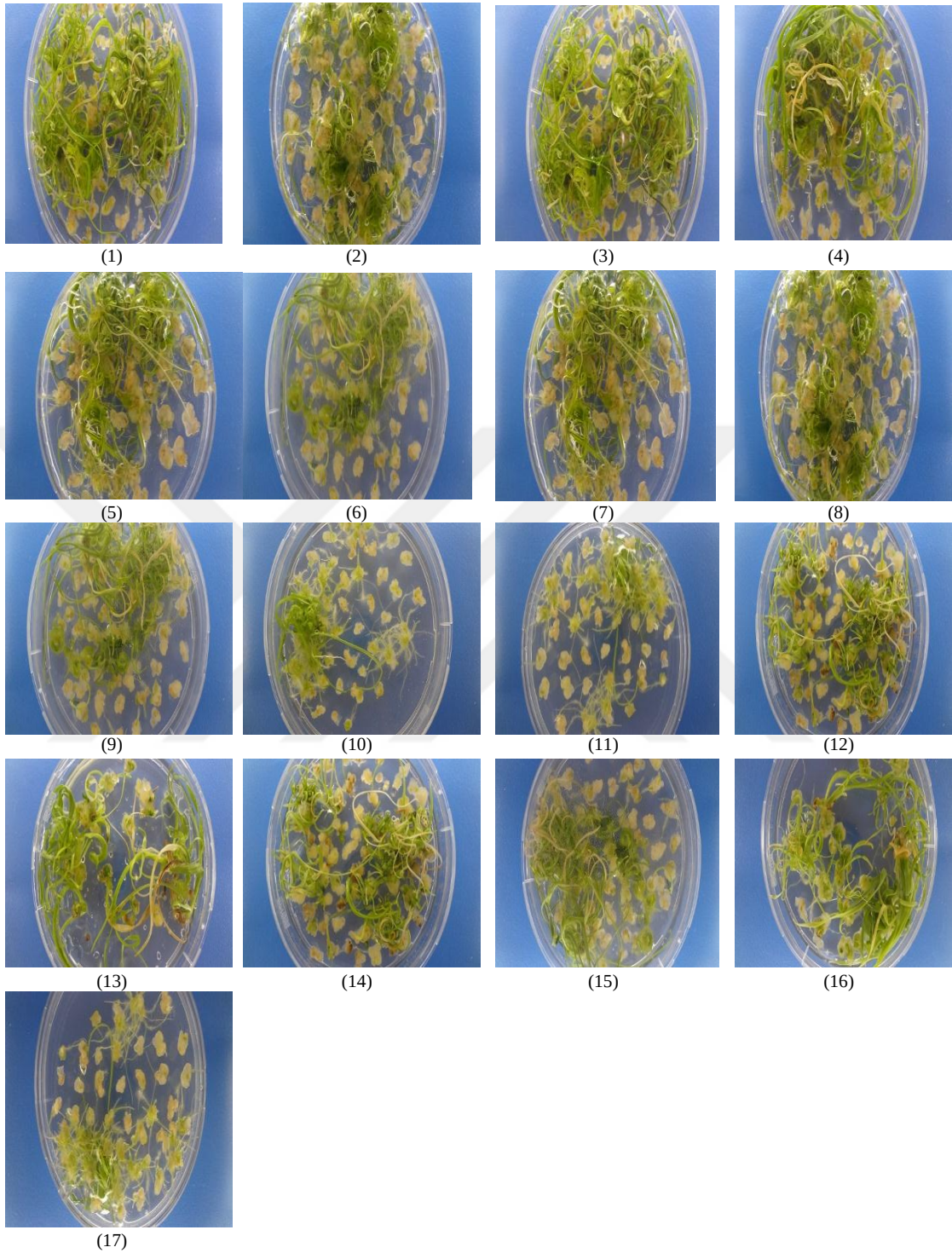
Ortalamalar esas alınarak uygulama süresine göre değerlendirildiğinde en yüksek EKSCCK oranı 6 saatlik uygulamada %94.63 olan, 2 saatlik uygulamada %94.54'e, 8 saatlik uygulamada %93.02'ye düşmüş, ancak bu uygulama süresi arasındaki farklılıklar önemsiz olmuştur. Diğer taraftan EKSCCK oranı 4 saatlik uygulamada %68.53'e kadar düşmüştür (Çizelge 4.2).

Ortalamalar esas alınarak değerlendirildiğinde, en yüksek EKSCEK oranının (%98.50) kontrolde (%0), en düşük ise (%83.10) %0.2'lik konsantrasyonda gerçekleştiği tespit edilmiştir. Diğer taraftan, EKSCEK oranı %0.2'lik konsantrasyonda %85.21, %0.3'lük konsantrasyonda 87.97 ve %0.4'lük konsantrasyonda %83.64 olmuştur (Çizelge 4.2).

EKSCEK oranı üzerine EMS'nin uygulama süresinin etkisi kullanılan konsantrasyona göre farklılık göstermiştir. Bu nedenle uygulama süresi $\times$ konsantrasyonun etkisi çok önemli ($P < 0.01$) olmuştur (Çizelge 4.1). En yüksek EKSCEK oranı tüm sürelerde kontrol uygulamasında elde edilmiştir. En düşük EKSCEK oranı ise 2 ve 8 saatlik uygulamalarda %0.2'lik konsantrasyonda; 4 saatlik uygulamada %0.2'lik konsantrasyonda; 6 saatlik uygulamada %0.1'lik konsantrasyonda elde edilmiştir (Çizelge 4.2).

4) Cevap veren somatik embriyo sayısı

Cevap veren somatik embriyo sayısı, eksplant sayısına, eksplantlardan meydana gelen kallus sayısına ve embriyogenik kallus sayısına göre olmak üzere üç şekilde değerlendirilmiştir. Embriyogenik kalluslar hormonsuz ortama konulduktan yaklaşık 2-3 gün sonra cevap veren somatik embriyolar daha net bir şekilde görülmeye başlamıştır. Cevap veren somatik embriyoların büyüklüğü EMS'nin hem uygulama süresine hem de konsantrasyonuna göre farklılık göstermiştir. Nitekim, 2 saatlik uygulama süresinde cevap veren somatik embriyoların boyutu EMS'nin %0.3'lük konsantrasyonda en büyük olmuş, bunu azalan sıra ile %0.2, %0.4 ve %0.1'lik konsantrasyonlar izlemiştir. Buna karşın, 4 saatlik uygulama süresinde cevap veren somatik embriyoların boyutu %0.4'lük konsantrasyonda en büyük olmuş, bunu azalan sıra ile %0.3, %0.2 ve %0.1'lik konsantrasyonlar izlemiştir. 6 saatlik uygulama süresinde cevap veren somatik embriyoların büyüklüğü bakımından konsantrasyonlara göre görülebilir bir farklılık oluşmamıştır. Buna karşın 8 saatlik uygulama süresinde en büyük somatik embriyolar %0.3'lük konsantrasyonda oluşmuştur (Şekil 4.4). Cevap veren somatik embriyolar 15 gün süre ile hormonsuz ortamda tutulduktan sonra 0.5 ng/l TDZ içeren rejenrasyon ortamına aktarılmış ve gelişmeleri sağlanmıştır.



Şekil 4.4. EMS'nin farklı süre ve konsantrasyonlarında meydana gelen cevap veren somatik embriyoların (ok işareti ile gösterilmiştir) ve rejenere bitkilerin görünüşleri.

(1) kontrol, (2) 2 saat + %0.1, (3) 2 saat + %0.2, (4) 2 saat + %0.3, (5) 2 saat + %0.4, (6) 4 saat + %0.1, (7) 4 saat + %0.2, (8) 4 saat + %0.3, (9) 4 saat + %0.4, (10) 6 saat + %0.1, (11) 6 saat + %0.2, (12) 6 saat + %0.3, (13) 6 saat + %0.4, (14) 8 saat + %0.1, (15) 8 saat + %0.2, (16) 8 saat + %0.3 ve (17) 8 saat + %0.4 konsantrasyonlarda cevap veren somatik embriyoların (ok işareti ile gösterilmiştir) ve rejenere bitkilerin görünüşleri.

a. Eksplant Sayısına Göre Cevap Veren Somatik Embriyo (ESCSE) Sayısı

ESCSE sayısı üzerine etil metansülfonatin uygulama süresi ve konsantrasyonu ile bu iki faktör arasındaki interaksiyon çok önemli ($P<0.01$) olmuştur (Çizelge 4.1).

Ortalamalar esas alınarak uygulama süresine göre değerlendirildiğinde en yüksek ESCSE sayısı 8.76 adet ile 2 saatlik uygulamadan elde edilmiş, bunu 6.60 adet ile 8 saat ve 6.16 adet ile 4 saatlik uygulamalar izlemiştir. Bu karakter bakımından 6 saatlik uygulama 5.58 adet ile son sırada yer almıştır (Çizelge 4.2).

Konsantrasyonların kendi içerisindeki ortalamaları esas alındığında, ESCSE sayısı bakımından ilk sırada 8.25 adet ile kontrol grubun yer aldığı, bunu 6.96 adet ile %0.3, 6.32 adet ile %0.4 ve 6.31 adet %0.2'lik konsantrasyonların izlediği ve bu karakter bakımından son sırada %0.1'lik konsantrasyonun (6.05 adet) bulunduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.2).

ESCSE sayısı üzerine etil metansülfonatin uygulama süresinin etkisi, kullanılan miktara göre değişiklik göstermesi nedeniyle uygulama süresi $\times$ konsantrasyonun etkisi çok önemli ($P<0.01$) olmuştur (Çizelge 4.1). Her uygulama süresine göre EMS konsantrasyonunun miktarının etkisi karşılaştırıldığında, en yüksek ESCSE sayısı, 2 saatlik uygulamanın tüm konsantrasyonları arasında farklılık gösterilmemiş, ancak 4 ve 6 ve 8 saatlik uygulamalarda kontrol konsantrasyonda elde edilmiştir. En düşük ESCSE sayısı ise 2, 4 ve 6 ve 8 saatlik uygulamalarda sırasıyla %0.1, %0.1, %0.2 ve %0.4'lük konsantrasyonda elde edilmiştir (Çizelge 4.2).

b. Kallus Sayısına Göre Cevap Veren Somatik Embriyo (KSCSE) Sayısı

KSCSE sayısı üzerine EMS'nin uygulama süresi ve konsantrasyonu ile bu iki faktör arasındaki interaksiyon çok önemli ($P<0.01$) olmuştur (Çizelge 4.1).

Ortalamalar esas alınarak uygulama süresine göre değerlendirildiğinde en yüksek KSCSE sayısı 8.76 adet ile 2 saatlik uygulama süresinden elde edilmiş, bunu 6.78 adet ile 8 saat ve 6.31 adet ile 4 saatlik uygulamalar izlemiştir. Bu karakter bakımından 6 saatlik uygulama 5.83 adet ile son sırada yer almıştır (Çizelge 4.2).

Ortalama dikkate alınarak konsantrasyonlara göre değerlendirilme yapıldığında, en yüksek KSCSE sayısının 8.25 adet ile kontrol grupta tespit edilmiş, bunu 6.18 adet ile %0.1'lik, 6.49 adet ile %0.2'lik, 7.19 adet ile %0.3'lük ve 6.51 adet ile %0.4'lük konsantrasyonlar izlediği görülmüştür (Çizelge 4.2).

KSCSE sayısı üzerine EMS'nin uygulama süresinin etkisi kullanılan konsantrasyona göre farklılık göstermiştir. Bu nedenle uygulama süresi $\times$ konsantrasyonun etkisi çok önemli ($P<0.01$) olmuştur (Çizelge 4.1). Her uygulama süresine göre EMS konsantrasyonunun miktarının etkisi karşılaştırıldığında, en yüksek ESCSE sayısı, 2 saatlik uygulamanın tüm konsantrasyonları arasında farklılık gösterilmemiş, ancak 4 ve 6 saatlik uygulamalarda EMS'nin kontrol uygulamalarından elde edilmiş, ancak 8 saatlik uygulama süresinin %0.2'lik konsantrasyonda elde edilmiştir. En düşük ESCSE sayısı ise 2, 4 ve 6 ve 8 saatlik uygulamalarda sırasıyla %0.1, %0.1, %0.2 ve %0.4'lük konsantrasyonda elde edilmiştir (Çizelge 4.2).

c. Embriyogenik Kallus Sayısına Göre Cevap Veren Somatik Embriyo (EKSCE) Sayısı

Etil metansülfonatın uygulama süresi EKSCE sayısını çok önemli ($P<0.01$) derecede etkilemiş, buna karşın konsantrasyonun etkisi önemsiz, süre $\times$ konsantrasyon interaksyonu ise çok önemli ($P<0.01$) olmuştur (Çizelge 4.1).

Ortalamalar esas alınarak uygulama süresine göre değerlendirildiğinde en yüksek EKSCE sayısı 12.26 adet ile 2 saatlik uygulama süresinden elde edilmiş, bunu 8.99 adet ile 8 saat ve 6.82 adet ile 4 saatlik uygulamalar izlemiştir. Bu karakter bakımından 6 saatlik uygulama 6.37 adet ile son sırada yer almıştır. Bununla birlikte 4 ve 6 saatlik

uygulama süreleri arasındaki farklılıklar önemsiz olup, istatistiksel olarak aynı grupta yer almışlardır (Çizelge 4.2).

Ortalamalar esas alındığında, konsantrasyonlara göre en yüksek EKSCE sayısı 9.27 adet ile %0.2'lik konsantrasyonda tespit edilmiş, bunu 9.01 adet ile %0.3, 8.65 adet ile %0.4'lük konsantrasyonlar izlemiş ve bu uygulamalardan elde edilen değerler kontrol gruptan elde edilene (8.33 adet) göre daha yüksek olmuştur. Bu karakter bakımından son sırada 7.88 adet ile %0.1'lik konsantrasyon yer almıştır. Tüm konsantrasyonlar arasındaki farklılıklar önemsiz olmuştur (Çizelge 4.2).

EKSCE sayısı üzerine EMS'nin uygulama süresinin etkisi, kullanılan miktara göre değişiklik göstermesi nedeniyle uygulama süresi $\times$ konsantrasyonun etkisi çok önemli ($P<0.01$) olmuştur (Çizelge 4.1). Her uygulama süresine göre EMS miktarının etkisi karşılaştırıldığında uygulama sürelerinde en yüksek EKSCE sayısı 2 ve 8 saatlik uygulama sürelerinde %0.2'lik konsantrasyonda; 4 ve 6 saatlik uygulama sürelerinde %0.0 (kontrol) konsantrasyonda elde edilmiştir. En düşük EKSCE sayısı, 2 saatlik uygulama süresinde kontrol konsantrasyonda; 4 saatlik uygulama süresinin % 0.1'lik konsantrasyonda, 6 ve 8 saatlik uygulamalarda ise %0.4'lük konsantrasyonda elde edilmiştir (Çizelge 4.2).

5) Rejenerasyon etkinliği (RE)

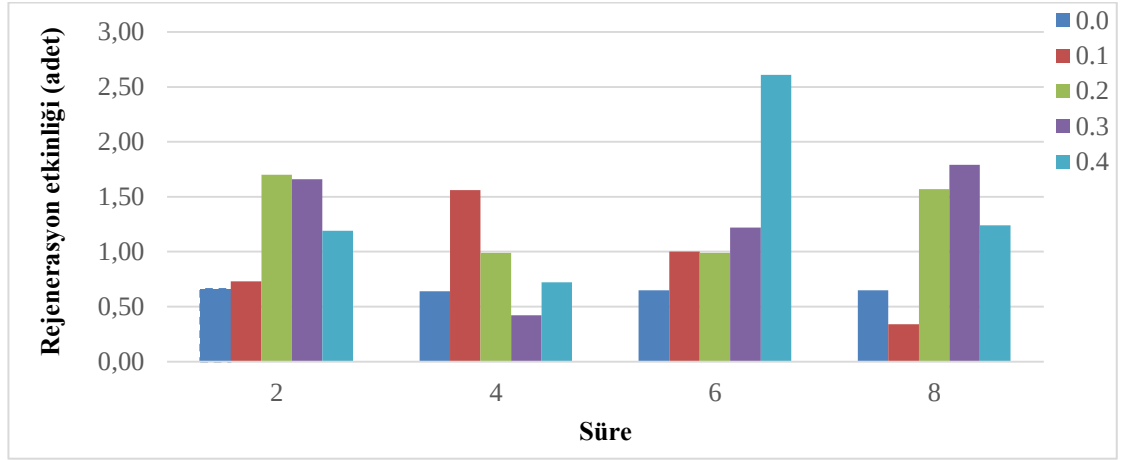
Cevap veren somatik embriyolar rejenerasyon ortamına aktarıldıktan 15 gün sonra hormonsuz ortama konulmuşlar ve burada bir ay süreyle tutulmuşlardır. Bu süre içerisinde somatik embriyolarda kök ve sürgün oluşumları gerçekleşmiştir (Şekil 4.4). Rejenerasyon etkinliği cevap veren embriyogenik kallus sayısına göre hesaplanmıştır.

Rejenerasyon etkinliği mutagenin hem uygulama süresinden hem de konsantrasyondan çok önemli ($P<0.01$) derecede etkilenmiş ayrıca bu iki faktör arasındaki interaksiyon da çok önemli ($P<0.01$) olmuştur (Çizelge 4.1).

Uygulama süresine göre ortalama rejenerasyon etkinliği dikkate alındığında, en yüksek rejenerasyon etkinliğinin 1.29 adet ile 6 saatlik uygulamadan elde edildiği, bunu 1.19 adet ile 2 saatlik, 1.12 adet ile 8 saatlik uygulamaların izlediği ve bu uygulama süreleri arasındaki farklılıkların önemsiz olduğu belirlenmiştir. Bu bakımdan 4 saatlik uygulama 0.86 adet ile son sırada yer almasıdır (Çizelge 4.2).

Diğer taraftan, ortalamalar esas alınarak konsantrasyonlara göre değerlendirme yapıldığında, en yüksek rejenerasyon etkinliğinin 1.44 adet ile %0.4'lük konsantrasyondan elde edildiği, bunu %0.2 (1.31 adet), %0.3 (1.27 adet) ve %0.1 (0.90 adet)'lik konsantrasyonların izlediği, kontrol uygulamasının ise 0.65 adet ile son sırada yer aldığı görülmüştür. Bununla birlikte %0.2, %0.3 ve %0.4'lük konsantrasyonlar arasındaki farklılıklar önemsiz olup, istatistiksel olarak aynı grupta yer almışlardır (Çizelge 4.2).

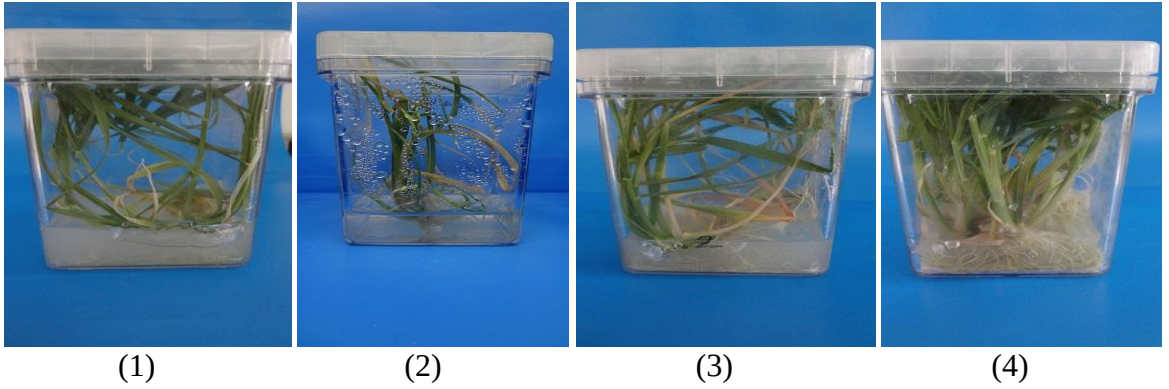
RE üzerine EMS'nin uygulama süresinin etkisi kullanılan konsantrasyona göre farklılık göstermiştir. Bu nedenle uygulama süresi $\times$ konsantrasyonun etkisi çok önemli ($P < 0.01$) olmuştur (Çizelge 4.1). Her uygulama süresine göre EMS konsantrasyonunun miktarının etkisi karşılaştırıldığında, en yüksek RE, 2 saatlik uygulama süresinin %0.2'lik konsantrasyonda; 4 saatlik uygulama süresinin %0.1'lik konsantrasyonda; 6 saatlik uygulamanın %0.4'lük konsantrasyonda ve 8 saatlik uygulama süresi ise %0.3'lük konsantrasyonda elde edilmiştir. En düşük RE ise 2, 4 ve 6 ve 8 saatlik uygulamalarda sırasıyla %0.0, %0.3, %0.0 ve %0.1'lik konsantrasyonda elde edilmiştir (Çizelge 4.2 ve Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Olgun embriyolara farklı süre ve dozlarda EMS uygulamasının rejenerasyon etkinliği üzerine etkileri.

6) Bitki sayısı (BS)

Kök ve sürgün oluşturan somatik embriyolar 30 gün boyunca hormonsuz ortam içeren magenda kutularında tutularak gelişmeye bırakılmışlardır (Şekil 4.6). Rejenere bitkilerin farklı ortamlarda görünüşleri; bitkilerin saksılara aktarılması ve aklimasyona alınması, bitkilerin aklimasyon sonrası görünüşleri, bitkilerin saksılarda görünüşleri ve toprağa aktarılmış bitkilerin görünüşleri şekil 4.7’da gösterilmiştir.



Şekil 4.6. EMS'nin bazı süre ve konsantrasyonlarında meydana gelen bitkiciklerin magendada görünüşleri.



(a)



(b)



(c)



(d)

Şekil 4.7. Rejenere bitkilerin farklı ortamlarda görünüşleri.

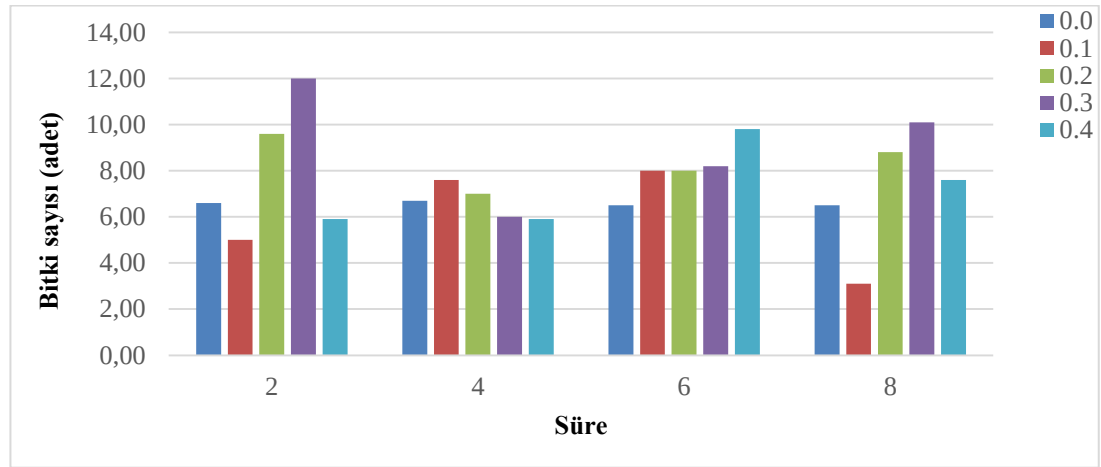
a) bitkilerin saksılara aktarılması ve aklamasyona alınması, b) bitkilerin aklamasyon sonrası görünüşleri, c) bitkilerin saksılarda görünüşleri, d) toprağa aktarılmış bitkilerin görünüşleri.

Rejenere bitki sayısı üzerine mutagenin uygulama süresi ve konsantrasyonu ile bu iki faktör arasındaki interaksiyon çok önemli ($P < 0.01$) etki oluşturmuştur (Çizelge 4.1).

Ortalamalar esas alınarak uygulama süresine göre değerlendirildiğinde en yüksek bitki sayısı 8.10 adet ile 6 saatlik uygulamadan elde edilmiş, bunu 7.82 adet ile 2 saat, 7.22 adet ile 8 saatlik uygulamalar izlemiştir. Bu karakter bakımından 4 saatlik uygulaması 6.64 adet ile son sırada yer almıştır (Çizelge 4.2).

Ortalama dikkate alınarak konsantrasyonlara göre değerlendirilme yapıldığında, en yüksek bitki sayısının 9.06 adet ile %0.3'lük konsantrasyondan elde edildiği, buna %0.1 (5.93 adet), %0.2 (8.35 adet), %0.4 (7.30 adet) ve kontrol (6.58 adet) konsantrasyonların izlediği görülmüştür. Bununla birlikte %0.0 ve %0.1'lik konsantrasyonlar arasındaki farklılıklar önemsiz olup, istatistiksel olarak aynı grupta yer almışlardır (Çizelge 4.2).

BS üzerine EMS'nin uygulama süresinin etkisi, kullanılan miktara göre değişiklik göstermesi nedeniyle uygulama süresi $\times$ konsantrasyon interaksiyonunun etkisi çok önemli ($P<0.01$) olmuştur (Çizelge 4.1). Her uygulama süresine göre EMS konsantrasyonunun miktarının etkisi karşılaştırıldığında, en yüksek BS, 2 ve 8 saatlik uygulama sürelerinde %0.3'lük uygulama konsantrasyonunda, 4 saatlik uygulama süresinin mutagenin %0.2'lik, 6 saatlik uygulamanın %0.4'lük konsantrasyonda elde edilmiştir. En düşük BS ise 2, 4 ve 6 ve 8 saatlik uygulamalarda sırasıyla %0.1, %0.4, %0.0 ve %0.1'lik konsantrasyonda elde edilmiştir (Çizelge 4.2 ve Şekil 4.8).



Şekil 4.8. Olgun embriyolara farklı süre ve dozlarda EMS uygulamasının bitki sayısı üzerine etkileri.

7) Optimum dozun (LD_{50}) tespit edilmesi

Kimyasal mutagenlerin optimum konsantrasyonunun ve uygulama süresinin belirlenmesinde LD_{50} (letal doz) kriteri esas alınmıştır. *İn vitro* çalışmalarda rejenerasyon etkinliği ve elde edilen bitki sayısı çok önemli karakterler olup, doku kültürünün başarısı bunlara göre değerlendirilmektedir. Bu nedenle burada LD_{50} değeri bu iki karaktere göre ayrı ayrı belirlenmiştir. Buna göre, hem rejenerasyon etkinliği hem de bitki sayısı için LD_{50} değeri aynı uygulamadan elde edilmiş olup bu EMS'nin %0.1'lik konsantrasyonunun 8 saat süre ile muamele edildiği uygulamadır (Çizelge 4.2 ve Şekil 4.5 ve Şekil 4.8).

8) EMS uygulamasından sonra incelenen doku kültürü karakterler arasındaki korelasyonlar

İncelenen karakterler arasındaki ilişkiler Çizelge 4.3'de verilmiştir. İncelenen karakterlerden KO oranı ile ESCSE oranı ($r=0.24$); ESEKO oranı ile KSEKO ($r=0.95$), ESCEK ($r=0.56$) ve KSCEK ($r=0.52$) oranları; KSEKO oran ile ESCEK ($r=0.54$) ve KSCEK ($r=0.57$) oranları; ESCEK oranı ile KSCEK ($r=0.97$) ve EKSCEK ($r=0.69$) oranları; KSCEK oranı ile EKSCEK ($r=0.69$) oranı; EKSCEK oranı ile ESCSE

($r=0.24$), KSCSE ($r=0.25$) ve EKSCE ($r=0.24$) oranları; ESCSE sayısı ile KSCSE ($r=0.99$) ve EKSCE ($r=0.84$) sayıları; KSCSE sayısı ile EKSCE ($r=0.83$) sayısı; EKSCE sayısı ile RE ($r=0.23$) ve RE ile BS ($r=0.67$) arasındaki ilişkiler olumlu ve çok önemli ($p<0.01$) olmuştur. Ayrıca, KO ile EKSCE ($r=0.17$) ve EKSCE ile BS ($r=0.16$) arasındaki ilişkilerin olumlu ve önemli olduğu tespit edilmiştir.



Çizelge 4.3. Olgun embriyolara farklı süre ve dozlarda EMS uygulamasından sonra *in vitro* ortamda incelenen bazı karakterlere ait korelasyon katsayıları.

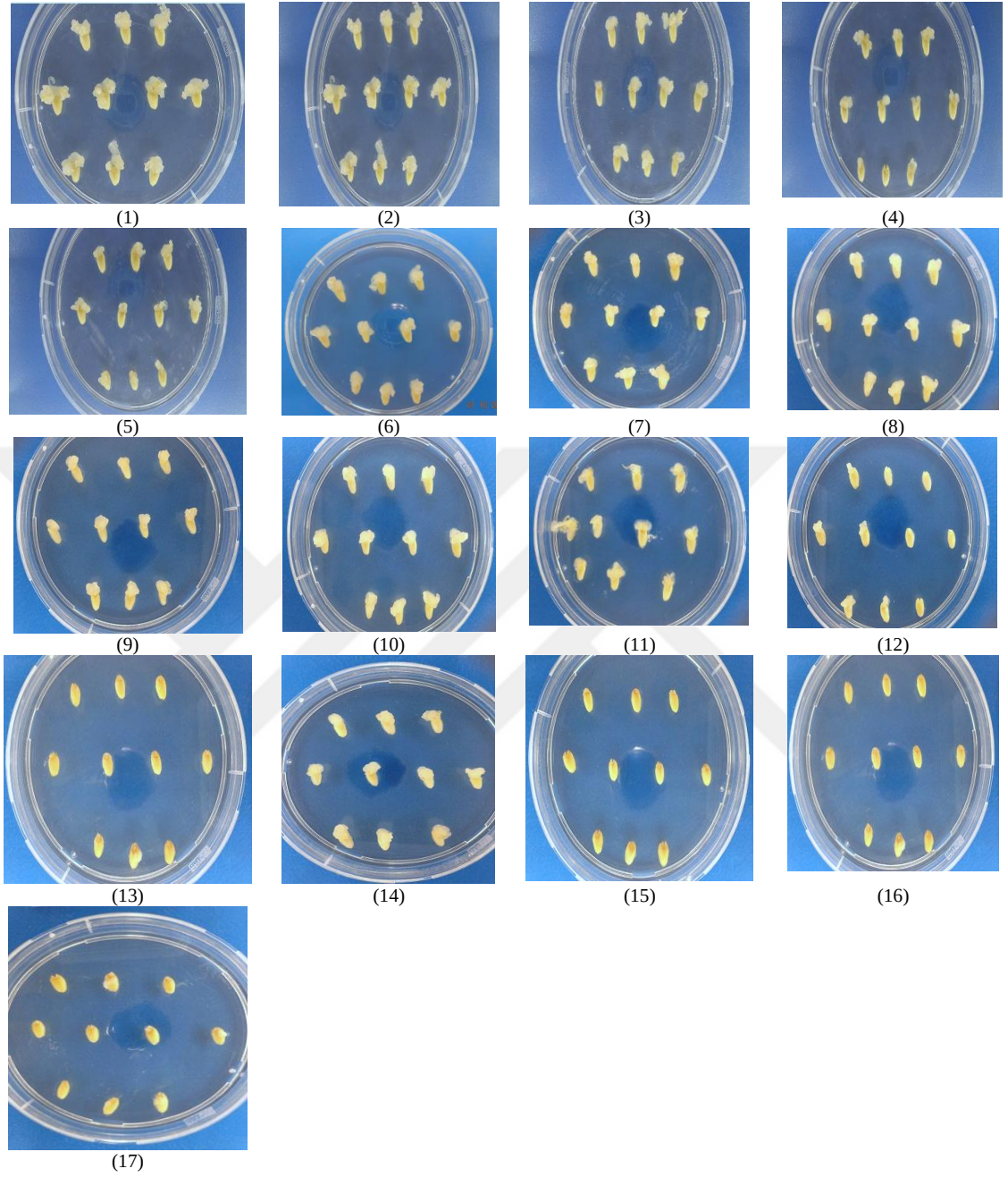
	KO (%)	ESEKO (%)	KSEKO (%)	ESCEK (%)	KSCEK (%)	EKSCEK (%)	ESCSE (adet)	KSCSE (adet)	EKSCE (adet)	RE (adet)	BS (adet)
KO	1										
ESEKO	0.10	1									
KSEKO	-0.21	0.95**	1								
ESCEK	0.04	0.56**	0.54**	1							
KSCEK	-0.19	0.52**	0.57**	0.97**	1						
EKSCEK	-0.04	-0.20	-0.18	0.69**	0.69**	1					
ESCSE	0.24**	-0.20	-0.27	0.05	0.00	0.24**	1				
KSCSE	0.10	-0.22	-0.24	0.05	0.02	0.25**	0.99**	1			
EKSCE	0.17*	-0.66	-0.69	-0.28	-0.31	0.24**	0.84**	0.83**	1		
RE	-0.01	-0.33	-0.32	-0.27	-0.25	-0.05	-0.02	-0.01	0.23**	1	
BS	0.05	-0.07	-0.08	0.06	0.05	0.13	0.12	0.11	0.16*	0.67**	1

*, p<0.05; **, p<0.01 düzeyinde önemlidir.

4.1.1.b. Olgun embriyo kültürüne sodyum azitin (NaN_3) etkileri

1) Kallus oluşum (KO) oranı

Eksplantlar ortama konulduktan yaklaşık 8-12 gün sonra kalluslar oluşmaya başlamıştır. Mutagen uygulama süresinin kısa ve konsantrasyonların düşük olduğu uygulamalarda kalluslar morfolojik olarak büyük ve sıkı yapılı iken, uygulama süresi ve konsantrasyonu arttıkça daha sulu olmuşlar ve küçülmeler meydana gelmiştir. Nitekim 1 saatlik uygulama süresinde NaN_3 'ün tüm konsantrasyonlarında kallus oluşumunda morfolojik olarak önemli bir farklılık gözlenmemiştir. 1 mM'lık konsantrasyonda kalluslar büyük ve sıkı iken, diğer tüm konsantrasyonlarda hafif sulu yapıda olmuşlardır. 2, 3 ve 4 saatlik uygulama sürelerinde 1, 2, 3 ve 4 mM'lık konsantrasyonlarda kallus yapısında farklılıklar gözlemlenmiştir. 3 saatlik uygulamada 4 mM'lık konsantrasyonda kallus oluşmamış, aynı şekilde 4 saatlik uygulamanın 2 mM, 3 mM, 4 mM'lık konsantrasyonlarında kallus oluşmamıştır (Şekil 4.9). Kalluslar 30 gün boyunca bu ortamda tutularak gelişmeleri sağlanmıştır.



Şekil 4.9. Sodyum azitin farklı süre ve konsantrasyonlarında meydana gelen kallusların görünümleri.

(1) kontrol, (2) 1 saat + 1 mM, (3) 1 saat + 2 mM, (4) 1 saat + 3 mM, (5) 1 saat + 4 mM, (6) 2 saat + 1 mM, (7) 2 saat + 2 mM, (8) 2 saat + 3 mM, (9) 2 saat + 4 mM, (10) 3 saat + 1 mM, (11) 3 saat + 2 mM, (12) 3 saat + 3 mM, (13) 3 saat + 4 mM, (14) 4 saat + 1 mM, (15) 4 saat + 2 mM, (16) 4 saat + 3 mM ve (17) 4 saat + 4 mM konsantrasyonlarda kallusların görünümleri.

KO oranı üzerine mutagenin uygulama süresi ve konsantrasyonu ile bu iki faktör arasındaki interaksiyon çok önemli ($P<0.01$) olmuştur (Çizelge 4.4).

Uygulama süresi uzadıkça KO oranı azalmıştır. Ortalamalar esas alınarak uygulama süresine göre değerlendirildiğinde en yüksek KO oranı 1 saatlik uygulamada %100.00 iken, bu oran 2 saatlik uygulamada %91.40'a, 3 saatlik uygulamada 57.60'a ve 4 saatlik uygulamada %39.60'a kadar düşmüştür (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5'da görüleceği gibi uygulama konsantrasyonu arttıkça kallus oluşum oranı azalmıştır. Ortalamalar esas alınarak değerlendirildiğinde, en yüksek KO oranının (%99.00) kontrolden (0 mM) elde edilmiş, bunu azalan sıra ile 1 mM (%96.75) 2 mM (%71.00), 3 mM (%52.50) ve 4 mM'lık (%41.50) konsantrasyonlar izlemiştir (Çizelge 4.5).

KO oranı üzerine sodyum azitin uygulama süresinin etkisi, kullanılan miktara göre değişiklik göstermesi nedeniyle uygulama süresi $\times$ konsantrasyonun etkisi çok önemli ($P<0.01$) olmuştur (Çizelge 4.4). Her uygulama süresine göre sodyum azit konsantrasyonunun miktarının etkisi karşılaştırıldığında, en yüksek KO oranı, 1 saatlik uygulamanın tüm konsantrasyonları arasında farklılık göstermemiş, ancak 2 saatlik uygulamada 1 ve 2 mM'lık konsantrasyondan, 3 saatlik uygulama süresinde 0 mM konsantrasyondan ve 4 saatlik uygulamalarda 1 mM'lık uygulamasından elde edilmiştir. En düşük KO oranı ise, yine 1 saatlik uygulamanın tüm konsantrasyonları arasında farklılık görülmemiş, ancak 2 ve 3 saatlik uygulama sürelerinde 4 mM'lık konsantrasyondan, 4 saatlik uygulamada ise 2, 3 ve 4 mM'lık konsantrasyonlardan elde edilmiştir (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.4. Olgun embriyolara farklı süre ve dozlarda sodyum azit uygulamasından sonra *in vitro* ortamda incelenen bazı karakterlere ait varyans analizi sonuçları.

Varyasyon Kaynağı	Kareler ortalaması											
	SD	KO	ESEKO	KSEKO	ESCEK	KSCEK	EKSCEK	ESCSE	KSCSE	EKSCE	RE	BS
Süre (saat)	3	40289.83**	30537.33**	35390.73**	29811.16**	36930.09**	42197.36**	43.17**	53.45**	67.52**	38.59**	256.27**
Konsantrasyon (mM)	4	26529.50**	35631.25**	32495.02**	43078.00**	39363.72**	27107.32**	448.72**	439.00**	413.33**	3.4	134.60**
Süre × Konsantrasyon	12	8469.83**	3146.91**	3439.26**	2628.66**	2610.93**	3884.01**	3.85**	3.53**	4.14**	4.60*	21.24**
Hata	180	106.39	138.33	129.4	72.28	85.95	200.45	1.06	1.13	1.31	2.2	8.69
Toplam	200											

*, p<0.05; **, p<0.01 düzeyinde önemlidir.

Çizelge 4.5. Olgun embriyolara farklı süre ve dozlarda sodyum azit uygulamasından sonra in vitro ortamda incelenen bazı karakterlere ait veriler.

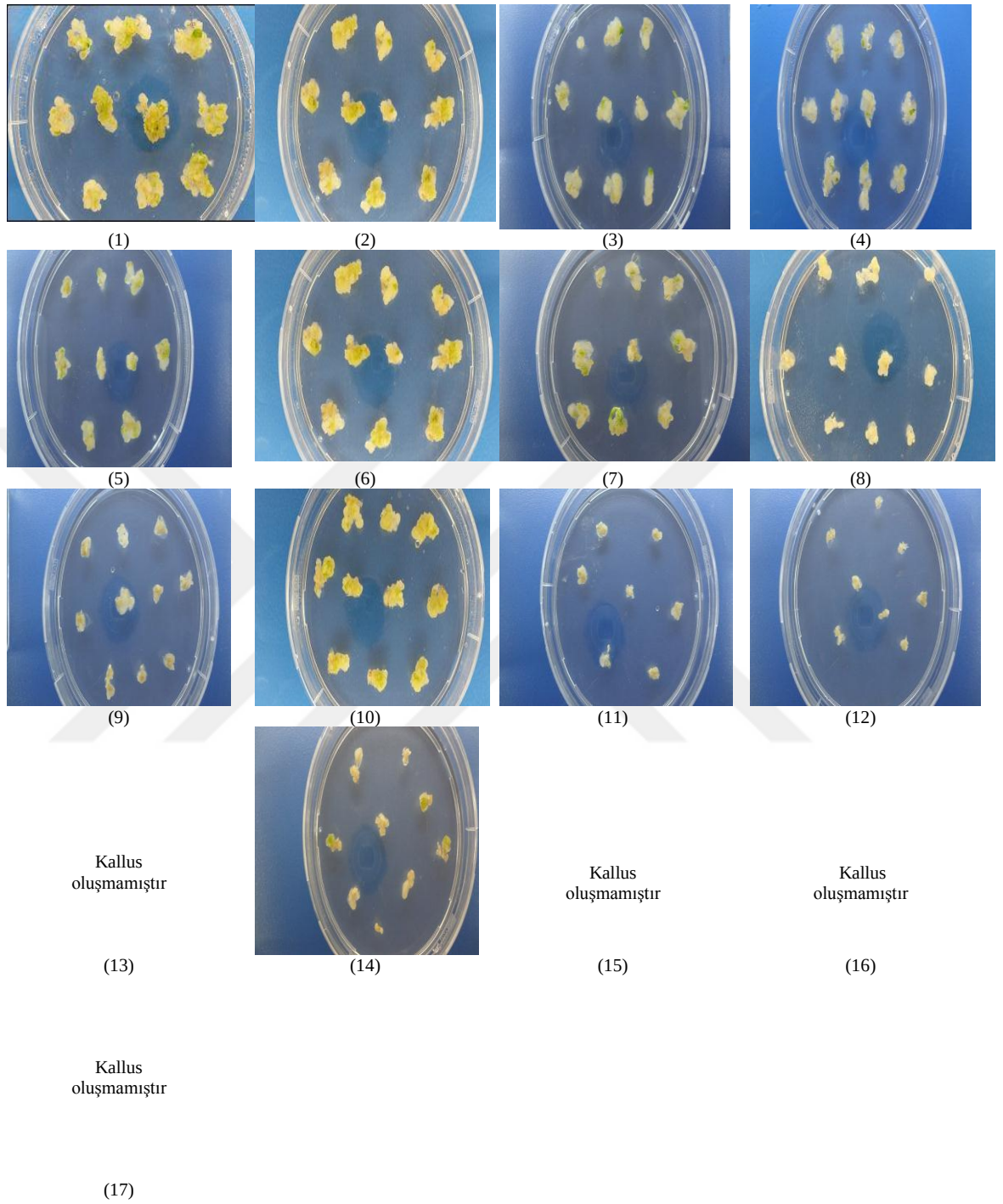
Süre (saat)	Konsantrasyon (mM)	KO (%)	ESEKO (%)	KSEKO (%)	ESCEK (%)	KSCEK (%)	EKSCEK (%)	ESCSE (adet)	KSCSE (adet)	EKSCE (adet)	RE (adet)	BS (adet)
1	0	100.00	100.00 ^a	100.00 ^a	100.00 ^a	100.00 ^a	100.00 ^a	8.33 ^a	8.33 ^a	8.33 ^a	0.66	6.60
	1	100.00	86.00 ^b	86.00 ^b	37.00 ^b	37.00 ^b	42.63 ^b	0.91 ^b	0.91 ^b	1.03 ^b	2.10	7.60
	2	100.00	64.00 ^c	64.00 ^c	24.00 ^c	24.00 ^c	38.11 ^b	0.44 ^b	0.44 ^b	0.69 ^b	2.76	5.50
	3	100.00	51.00 ^c	51.00 ^c	16.00 ^c	16.00 ^c	35.14 ^b	0.19 ^b	0.19 ^b	0.42 ^b	2.75	3.90
	4	100.00	61.00 ^c	61.00 ^c	22.00 ^c	22.00 ^c	37.38 ^b	0.33 ^b	0.33 ^b	0.56 ^b	1.72	3.70
	Ortalama	100.00^{A1}	72.40^B	72.39^B	39.80^B	39.80^B	50.65^B	2.04^B	2.04^B	2.21^B	1.99^A	5.46^A
2	0	99.00 ^{a2}	98.00 ^a	98.00 ^a	98.00 ^a	98.00 ^a	98.00	8.32 ^a	8.32 ^a	8.32 ^a	0.64 ^b	6.70
	1	100.00 ^a	95.00 ^a	95.00 ^b	87.00 ^b	87.00 ^{bc}	91.67	3.13 ^b	3.13 ^b	3.30 ^b	1.65 ^{ab}	5.60
	2	100.00 ^a	95.00 ^a	95.00 ^b	91.00 ^{ab}	91.00 ^{ab}	95.89	3.18 ^b	3.18 ^b	3.35 ^b	2.22 ^a	7.50
	3	92.00 ^a	76.00 ^b	82.87 ^b	72.00 ^c	78.40 ^c	94.40	2.56 ^b	2.81 ^{bc}	3.45 ^b	1.25 ^{ab}	4.90
	4	66.00 ^b	44.00 ^c	68.97 ^c	40.00 ^d	64.47 ^d	92.67	1.13 ^c	1.94 ^c	2.71 ^b	2.64 ^a	5.00
	Ortalama	91.40^B	81.60^A	87.97^A	77.60^A	83.77^A	94.52^A	3.66^A	3.87^A	4.23^A	1.68^A	5.94^A
3	0	99.00 ^a	98.00 ^a	98.00 ^a	98.00 ^a	98.00 ^a	98.00 ^a	8.28 ^a	8.28 ^a	8.28 ^a	0.65 ^a	6.50 ^a
	1	87.00 ^a	56.00 ^b	64.50 ^b	24.00 ^b	28.25 ^b	44.31 ^{cb}	0.42 ^b	0.42 ^b	0.55 ^b	0.78 ^a	2.80 ^b
	2	84.00 ^a	28.00 ^c	33.71 ^c	17.00 ^b	20.25 ^b	52.16 ^b	0.21 ^b	0.25 ^b	0.63 ^b	0.30 ^{ab}	0.50 ^c
	3	18.00 ^b	11.00 ^d	5.71 ^d	7.00 ^c	5.71 ^c	28.33 ^c	0.06 ^b	0.04 ^b	0.19 ^b	0.00 ^b	0.00 ^c
	4	0.00 ^c	0.00 ^d	0.00 ^d	0.00 ^c	0.00 ^c	0.00 ^d	0.00 ^b	0.00 ^b	0.00 ^b	0.00 ^b	0.00 ^c
	Ortalama	57.60^C	38.60^C	40.38^C	29.20^C	30.44^C	44.56^C	1.79^B	1.79^B	1.93^{BC}	0.34^B	1.96^B
4	0	98.00 ^b	98.00 ^a	98.00 ^a	98.00 ^a	98.00 ^a	98.00 ^a	8.10 ^a	8.10 ^a	8.10 ^a	0.65 ^a	6.50 ^a
	1	100.00 ^a	59.00 ^b	59.00 ^b	18.00 ^b	18.00 ^b	31.52 ^b	0.21 ^b	0.21 ^b	0.36 ^b	0.98 ^a	1.70 ^b
	2	0.00 ^c	0.00 ^c	0.00 ^c	0.00 ^c	0.00 ^c	0.00 ^c	0.00 ^b	0.00 ^b	0.00 ^b	0.00 ^b	0.00 ^c
	3	0.00 ^c	0.00 ^c	0.00 ^c	0.00 ^c	0.00 ^c	0.00 ^c	0.00 ^b	0.00 ^b	0.00 ^b	0.00 ^b	0.00 ^c
	4	0.00 ^c	0.00 ^c	0.00 ^c	0.00 ^c	0.00 ^c	0.00 ^c	0.00 ^b	0.00 ^b	0.00 ^b	0.00 ^b	0.00 ^c
	Ortalama	39.60^D	31.40^D	31.40^D	23.20^D	23.20^D	25.90^D	1.66^B	1.66^B	1.69^C	0.32^B	1.64^B
Konsantrasyon Ortalama (mM)	0	99.00 ^A	98.50 ^A	98.50 ^A	98.50 ^A	98.50 ^A	98.50 ^A	8.25 ^A	8.25 ^A	8.25 ^A	0.65	6.57 ^A
	1	96.75 ^A	74.00 ^B	76.12 ^B	41.50 ^B	42.56 ^B	52.53 ^B	1.16 ^B	1.16 ^B	1.31 ^B	1.38	4.42 ^B
	2	71.00 ^B	46.75 ^C	48.17 ^C	33.00 ^C	33.81 ^C	46.54 ^B	0.95 ^B	0.96 ^{BC}	1.17 ^B	1.32	3.37 ^{BC}
	3	52.50 ^C	34.50 ^D	34.89 ^D	23.75 ^D	25.02 ^D	39.47 ^C	0.70 ^{BC}	0.76 ^{BC}	1.01 ^B	1.00	2.20 ^C
	4	41.50 ^D	26.25 ^E	32.49 ^D	15.50 ^E	21.61 ^D	32.51 ^D	0.36 ^C	0.56 ^C	0.81 ^B	1.08	2.17 ^C
LD₅₀ değeri		49.50	49.25	49.25	49.25	49.25	49.25	4.12	4.12	4.12	0.32	3.28

¹: Aynı sütunda aynı büyük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemsizdir.

²: Her bir uygulama süresi için aynı sütunda aynı küçük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemsizdir.

2) Embriyogenik kallus oluşum oranı

Sert dokulu, dağılabilir özellikte, sıkı yapılı ve krem renkli kalluslar embriyogenik kallus; beyaz ve sulu yapılı kalluslar ise embriyogenik olmayan kallus olarak değerlendirilmiştir. Embriyogenik kallus oluşum oranı kültüre alınan eksplant sayısına göre ve kallus sayısına göre olmak üzere iki şekilde değerlendirilmiştir. Kalluslar hormonsuz ortama konulduktan yaklaşık 14 gün sonra embriyogenik kalluslar oluşmaya başlamıştır. Embriyogenik kallusların büyüklüğü sodyum azitin hem uygulama süresine hem de konsantrasyonuna göre farklılık göstermiştir. Nitekim, 1 saatlik uygulama süresinde embriyogenik kallusların boyutu 1 mM'lık konsantrasyonda en büyük olmuş, bunu azalan sıra ile 2, 3 ve 4 mM'lık konsantrasyonlar izlemiştir. Diğer taraftan, 2 saatlik uygulama süresinde embriyogenik kallusların boyutu 1 ve 2 mM'lık konsantrasyonlarda en büyük olmuş, bunu azalan sıra ile 3 ve 4 mM'lık konsantrasyonlar izlemiştir. Buna karşın, 3 saatlik uygulama süresinde embriyogenik kallusların boyutu 1 mM'lık konsantrasyonda en büyük olmuş, bunu azalan sıra ile 2, 3 ve 4 mM'lık konsantrasyonlar izlemiştir. Diğer taraftan, 4 saatlik uygulama süresinde en büyük embriyogenik kalluslar 1 mM'lık konsantrasyonunda oluşmuştur (şekil 4.10). Embriyogenik kalluslar 15 gün boyunca bu ortamda tutularak gelişmeleri sağlanmıştır.



Şekil 4.10. Sodyum azitin farklı süre ve konsantrasyonlarında meydana gelen embriyogenik kallusların görünümümüleri.

(1) kontrol, (2) 1 saat + 1 mM, (3) 1 saat + 2 mM, (4) 1 saat + 3 mM, (5) 1 saat + 4 mM, (6) 2 saat + 1 mM, (7) 2 saat + 2 mM, (8) 2 saat + 3 mM, (9) 2 saat + 4 mM, (10) 3 saat + 1 mM, (11) 3 saat + 2 mM, (12) 3 saat + 3 mM, (13) 3 saat + 4 mM, (14) 4 saat + 1 mM, (15) 4 saat + 2 mM, (16) 4 saat + 3 mM ve (17) 4 saat + 4 mM konsantrasyonlarda meydana gelen embriyogenik kallusların görünümümüleri.

a. Eksplant sayısına göre embriyogenik kallus oluşum (ESEKO) oranı

ESEKO oranı üzerine mutagen uygulama süresi ve konsantrasyonu ile bu iki faktör arasındaki interaksyon çok önemli ($P<0.01$) olmuştur (Çizelge 4.4).

Uygulama süresi uzadıkça ESEKO azalmıştır. Ortalamalar esas alınarak uygulama süresine göre değerlendirildiğinde en yüksek ESEKO oranı (%81.60) 2 saatlik uygulamadan elde edilmiş, bunu azalan sıra ile 1 saat (%72.40), 3 saat (%38.60) ve 4 saatlik (%31.40) uygulama süreleri izlemiştir (Çizelge 4.5).

Ortalamalar esas alınarak konsantrasyonlara göre değerlendirildiğinde, en yüksek ESEKO oranının kontrolde (%98.50), en düşük ise 4 mM'lık konsantrasyonda (%26.25) gerçekteştiği belirlenmiş, bunu azalan sıra ile 1 mM (%74.00), 2 mM (%46.75) ve 3 mM'lık (%34.50) konsantrasyonlar izlemiştir (Çizelge 4.5).

ESEKO oranı üzerine sodyum azitinin uygulama süresinin etkisi kullanılan konsantrasyona göre farklılık göstermiştir. Bu nedenle uygulama süresi $\times$ konsantrasyonun etkisi çok önemli ($P<0.01$) olmuştur (Çizelge 4.4). En yüksek ESEKO oranı tüm sürelerde kontrol uygulamasında elde edilmiştir. En düşük ESEKO oranı ise 1 saatlik uygulamada 3 mM'lık konsantrasyonda, 2 ve 3 saatlik uygulamalarda 4 mM'lık konsantrasyonda; 4 saatlik uygulamada 2, 3 ve 4 mM'lık konsantrasyonda uygulamasından elde edilmiştir (Çizelge 4.5).

b. Kallus sayısına göre embriyogenik kallus oluşum (KSEKO) oranı

Eksplant sayısına göre embriyogenik kallus oluşumunda olduğu gibi, kallus sayısına göre embriyogenik kallus oluşum oranı bakımından da hem uygulama süresi ve konsantrasyonu hem de bu iki faktör arasındaki interaksyon çok önemli ($P<0.01$) olmuştur (Çizelge 4.4).

NaN_3 uygulamasının süresi dikkate alındığında, uygulama süresinin uzamasına bağlı olarak genel olarak KSEKO oranı azalmıştır. Ortalama kallus sayısına göre embriyogenik kallus oluşum oranı en yüksek %87.97 ile 2 saatlik uygulamadan elde edilmiş, bunu azalan sıra ile 1 saat (%72.39), 3 saat (%40.38) ve 4 saatlik (%31.40) uygulama süreleri izlemiştir (Çizelge 4.5).

Ortalamalar bakımından konsantrasyonlar karşılaştırıldığında, en yüksek KSEKO oranı kontrolde (%98.50), en düşük ise (%32.49) 4 mM'lık konsantrasyonda gerçekleşmiş, bunu azalan sıra ile 1 mM (%76.12), 2 mM (%48.18) ve 3 mM'lık (%34.89) konsantrasyonlar izlemiştir. Bununla birlikte 3 ve 4 mM'lık uygulama konsantrasyonları arasındaki farklılıklar önemsiz olup, istatistiksel olarak aynı grupta yer almışlardır (Çizelge 4.5).

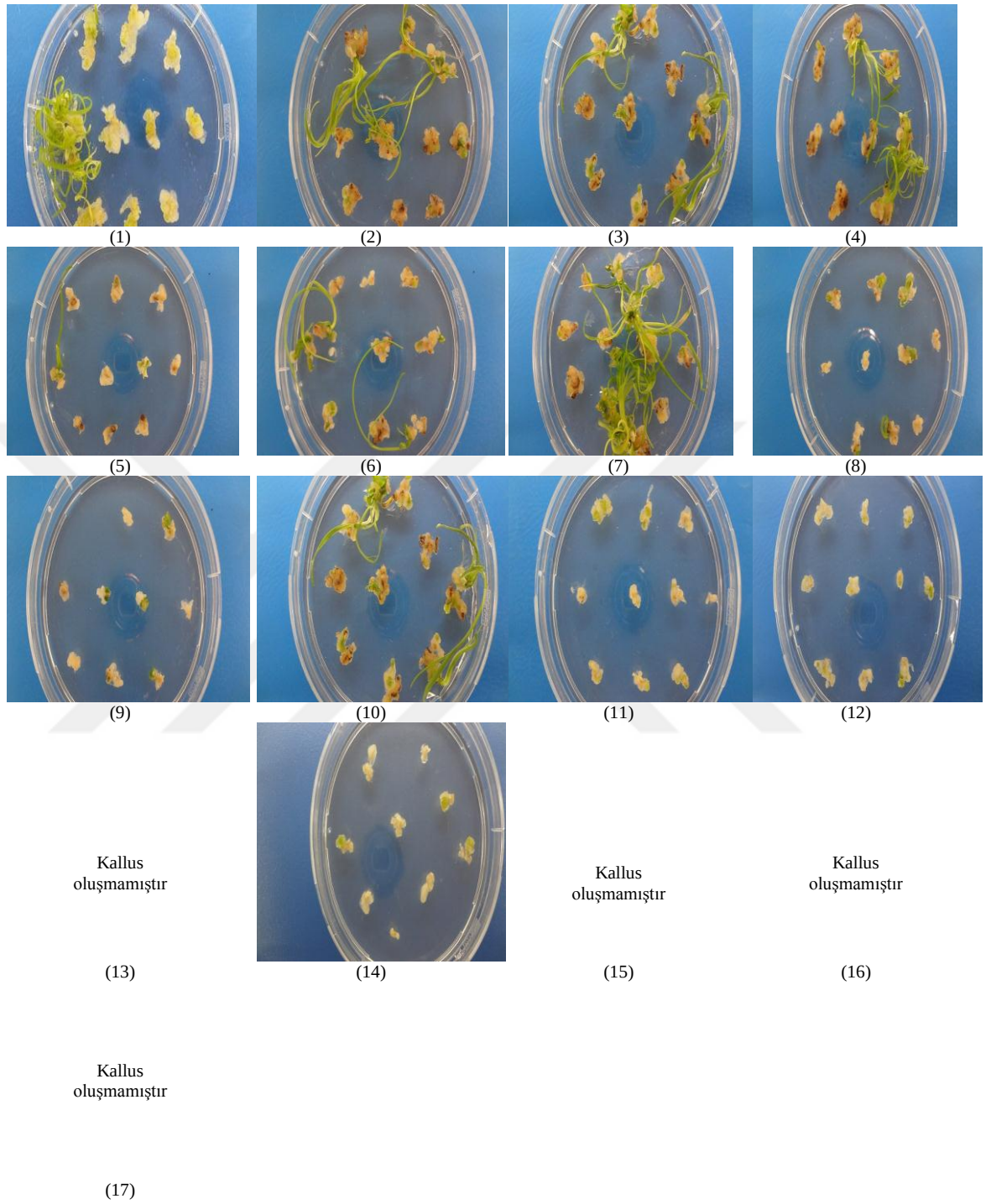
KSEKO oranı üzerine sodyum azitin uygulama süresinin etkisi kullanılan konsantrasyona göre farklılık göstermiştir. Bu nedenle uygulama süresi $\times$ konsantrasyonun etkisi çok önemli ($P < 0.01$) olmuştur (Çizelge 4.4). En yüksek KSEKO oranı ESEKO oranı gibi tüm sürelerde kontrol uygulamasında elde edilmiştir. En düşük KSEKO oranı ise 1 saatlik uygulamada 3 mM'lık konsantrasyonda; 2 ve 3 saatlik uygulamalarda 4 mM'lık konsantrasyonda; 4 saatlik uygulamada ise 2, 3 ve 4 mM'lık konsantrasyondan elde edilmiştir (Çizelge 4.5).

3) Cevap veren embriyogenik kallus oranı

Kök ve sürgüne sahip bitkicik meydana getiren embriyogenik kalluslar cevap veren embriyogenik kallus olarak değerlendirilmiştir. Cevap veren embriyogenik kallus oranı eksplant sayısına, kallus sayısına ve embriyogenik kallus sayısına göre üç şekilde değerlendirilmiştir. Embriyogenik kalluslar hormonsuz ortama konulduktan yaklaşık 8-14 gün sonra cevap veren embriyogenik kalluslar oluşmaya başlamıştır. Cevap veren embriyogenik kallusların büyüklüğü NaN_3 'ün hem uygulama süresine hem de konsantrasyonuna göre farklılık göstermiştir. Niketim, 1 saatlik uygulama süresinde cevap veren embriyogenik kallusların boyutu 1 mM'lık konsantrasyonda en büyük

olmuş, bunu azalan sıra ile 2 , 3 ve 4 mM’lık konsantrasyonlar izlemiştir. Buna karşın, 2 saatlik uygulama süresinde cevap veren embriyogenik kallusların boyutu, 2 mM’lık konsantrasyonda en büyük olmuş, bunu azalan sıra ile 1, 3 ve 4 mM’lık konsantrasyonlar izlemiştir. Diğer taraftan, 3 ve 4 saatlik uygulama sürelerinde en büyük cevap veren embriyogenik kalluslar 1 mM’lık konsantrasyonda meydana gelmiştir (Şekil 4.11). Cevap veren embriyogenik kalluslar 15 gün boyunca bu ortamda tutularak gelişmeleri sağlanmıştır.





Şekil 4.11. Sodyum azitin farklı süre ve konsantrasyonlarında meydana gelen cevap veren embriyogenik kallusların görünüşleri.

(1) kontrol, (2) 1 saat + 1 mM, (3) 1 saat + 2 mM, (4) 1 saat + 3 mM, (5) 1 saat + 4 mM, (6) 2 saat + 1 mM, (7) 2 saat + 2 mM, (8) 2 saat + 3 mM, (9) 2 saat + 4 mM, (10) 3 saat + 1 mM, (11) 3 saat + 2 mM, (12) 3 saat + 3 mM, (13) 3 saat + 4 mM, (14) 4 saat + 1 mM, (15) 4 saat + 2 mM, (16) 4 saat + 3 mM ve (17) 4 saat + 4 mM konsantrasyonlarda cevap veren embriyogenik kallusların görünüşümleri.

a. Eksplant sayısına göre cevap veren embriyogenik kallus (ESCEK) oranı

ESCEK oranı üzerine sodyum azitin uygulama süresi ve konsantrasyonu ile bu iki faktör arasındaki interaksiyon çok önemli ($P<0.01$) olmuştur (Çizelge 4.4).

Ortalamalar bakımından süreleri karşılaştırıldığında, eksplant sayısına göre cevap veren embriyogenik kallus oranı 2 saatlik uygulamada %77.60 olmuş ve bunu azalan sıra ile 1 saat (%39.80), 3 saat (%29.20) ve 4 saatlik (%23.20) uygulama süreleri izlemiştir (Çizelge 4.5).

Ortalamalar bakımından konsantrasyonlar karşılaştırıldığında, en yüksek ESCEK oranı kontrolde (%98.50), en düşük ise (%15.50) 4 mM'lık konsantrasyonda elde edilmiştir. Diğer taraftan, ESCEK oranı 1 mM'lık konsantrasyonda %41.50, 2 mM'lık konsantrasyonda %33.00 ve 3 mM'lık konsantrasyonda %23.75 olmuştur (Çizelge 4.5).

ESCEK oranı üzerine sodyum azitin uygulama süresinin etkisi kullanılan konsantrasyona göre farklılık göstermiştir. Bu nedenle uygulama süresi $\times$ konsantrasyonun etkisi çok önemli ($P<0.01$) olmuştur (Çizelge 4.4). En yüksek ESCEK oranı ESEKO ve KSEKO oranları gibi tüm sürelerde kontrol uygulamasında elde edilmiştir. En düşük ESCEK oranı ise 1 saatlik uygulamada 3 mM'lık konsantrasyonda; 2 ve 3 saatlik uygulamalarda 4 mM'lık konsantrasyonda; 4 saatlik uygulamada ise 2, 3 ve 4 mM'lık konsantrasyonda elde edilmiştir (Çizelge 4.5).

b. Kallus sayısına göre cevap veren embriyogenik kallus (KSCEK) oranı

KSCEK oranı mutagenin hem uygulama süresine hem de konsantrasyonu göre çok önemli ($P<0.01$) değişim göstermiş, ayrıca bu iki faktör arasındaki interaksiyon da çok önemli ($P<0.01$) olmuştur (Çizelge 4.4).

Ortalamlar bakımından süreleri karşılaştırıldığında, en yüksek KSCEK oranı 2 saatlik uygulamada (%83.77) iken, bu oran 4 saatlik uygulamada %23.20'ye kadar düşmüştür. Buna azalan sıra ile 1 saat (%39.80) ve 3 saatlik (%30.44) uygulama süreleri izlemiştir (Çizelge 4.5).

Ortalamlar esas aldığında, kontrolde %98.50 olan KSCEK oranı, 1 mM'lık konsantrasyonda %42.56'ya, 2 mM'lık konsantrasyonda %33.81'e, 3 mM'lık konsantrasyonda %25.02'ye ve 4 mM'lık konsantrasyonda %21.61'e düşmüştür. Bu karakter bakımından 3 ve 4 mM'lık konsantrasyonlar arasındaki farklılıklar önemsiz, diğerleri arasındaki farklılıklar ise çok önemli olmuştur. Bununla birlikte 3 ve 4 mM'lık uygulama konsantrasyonları arasındaki farklılıklar önemsiz olup, istatistiksel olarak aynı grupta yer almışlardır (Çizelge 4.5).

KSCEK oranı üzerine sodyum azitin uygulama süresinin etkisi kullanılan konsantrasyona göre farklılık göstermiştir. Bu nedenle uygulama süresi $\times$ konsantrasyonun etkisi çok önemli ($P < 0.01$) olmuştur (Çizelge 4.4). En yüksek KSCEK oranı ESEKO, KSEKO, ESCEK oranları gibi tüm sürelerde kontrol uygulamasında elde edilmiştir. En düşük KSCEK oranı ise 1 saatlik uygulamada 3 mM'lık konsantrasyonda; 2 ve 3 saatlik uygulamalarda 4 mM'lık konsantrasyonda; 4 saatlik uygulamada ise 2, 3 ve 4 mM'lık konsantrasyonda elde edilmiştir (Çizelge 4.5).

c. Embriyogenik kallus sayısına göre cevap veren embriyogenik kallus (EKSCEK) oranı

EKSCEK oranı üzerine mutagenin hem uygulama süresi ve konsantrasyonu ile hem de bu iki faktör arasındaki interaksiyon çok önemli ($P < 0.01$) olmuştur (Çizelge 4.4).

Ortalamlar bakımından süreleri karşılaştırıldığında, 2 saatlik uygulamada %94.52 olan EKSCEK oranı, 1 saatlik uygulamada %50.65'e, 3 saatlik uygulamada %44.56'ya ve 4 saatlik uygulamada %25.90'a düşmüştür (Çizelge 4.5).

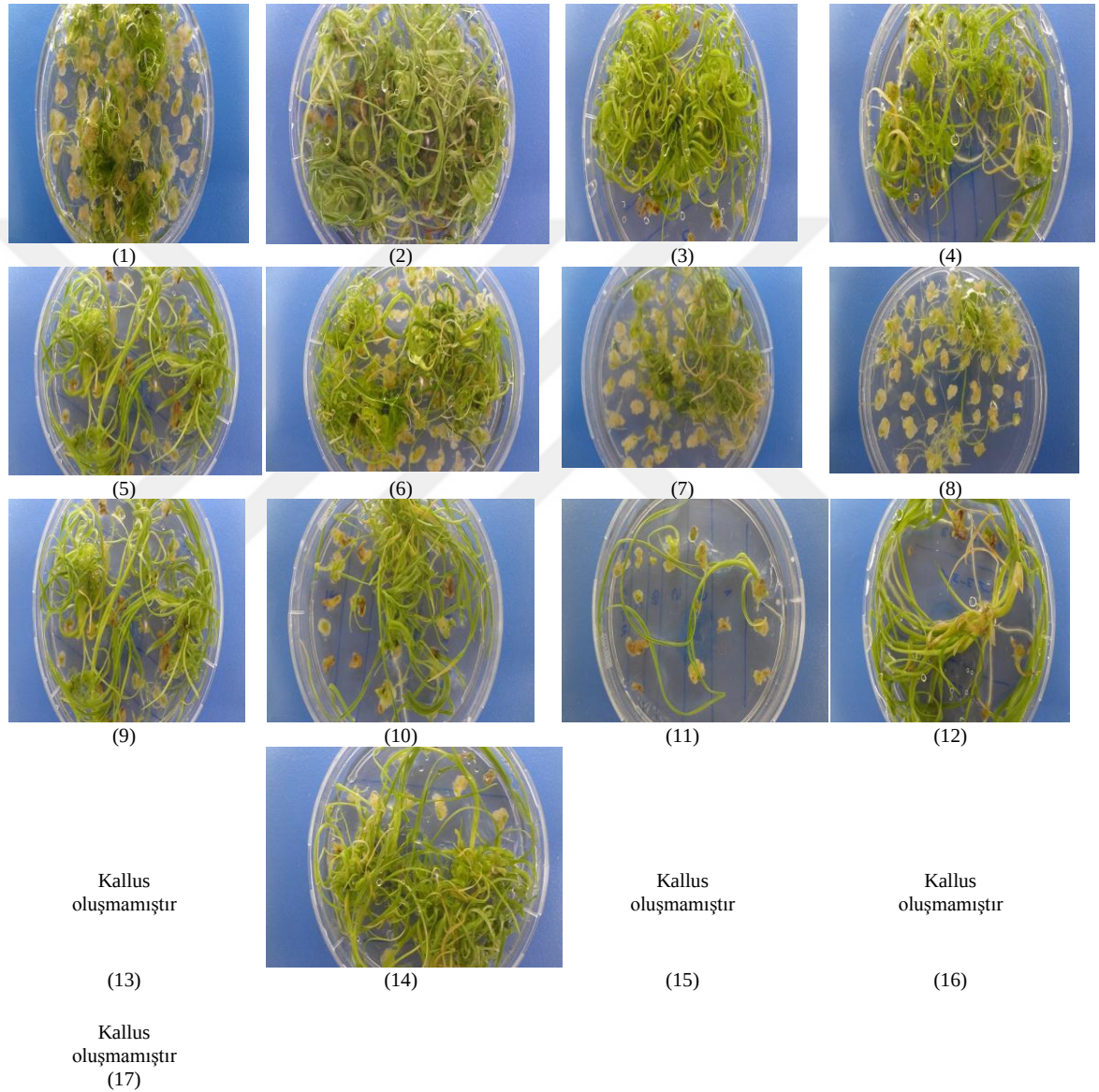
Ortalamalar esas alınarak konsantrasyonlara göre değerlendirildiğinde, en yüksek EKSCCK oranının (%98.50) kontrolde (%0), en düşük (%32.51) ise 4 mM'lık konsantrasyonda gerçekleştiği tespit edilmiştir. Diğer taraftan, EKSCCK oranı 1 mM'lık konsantrasyonda %52.53, 2 mM'lık konsantrasyonda %46.54 ve 3 mM'lık konsantrasyonda %39.47 olmuştur. Bununla birlikte 1 ve 2 mM'lık uygulama konsantrasyonları arasındaki farklılıklar önemsiz olup, istatistiksel olarak aynı grupta yer almışlardır (Çizelge 4.5).

EKSCCK oranı üzerine sodyum azitin uygulama süresinin etkisi kullanılan konsantrasyona göre farklılık göstermiştir. Bu nedenle uygulama süresi $\times$ konsantrasyonun etkisi çok önemli ($P < 0.01$) olmuştur (Çizelge 4.4). En yüksek EKSCCK oranı ESEKO, KSEKO, ESCEK ve KSCEK oranları gibi tüm sürelerde kontrol uygulamasında elde edilmiştir. En düşük EKSCCK oranı ise 1 saatlik uygulamada 3 mM'lık konsantrasyonda; 2 ve 3 saatlik uygulamalarda 4 mM'lık konsantrasyonda; 4 saatlik uygulamada ise 2, 3 ve 4 mM'lık konsantrasyonda elde edilmiştir (Çizelge 4.5).

4) Cevap veren somatik embriyo sayısı

Cevap veren somatik embriyo sayısı eksplant sayısına, eksplantlardan meydana gelen kallus sayısına ve embriyogenik kallus sayısına göre olmak üzere üç şekilde değerlendirilmiştir. Embriyogenik kalluslar, hormonsuz ortama konulduktan yaklaşık 2-3 gün sonra cevap veren somatik embriyolar daha net bir şekilde görülmeye başlamıştır. Cevap veren somatik embriyoların büyüklüğü NaN_3 'ün hem uygulama süresine hem de konsantrasyonuna göre farklılık göstermiştir. Niketim, 1 saatlik uygulama süresinde cevap veren somatik embriyoların boyutu 1 mM'lık konsantrasyonda en büyük olmuş, bunu azalan sıra ile 2, 3 ve 4 mM'lık konsantrasyonlar izlemiştir. Buna karşın, 2 saatlik uygulama süresinde cevap veren somatik embriyoların boyutu 2 mM'lık konsantrasyonda en büyük olmuş, bunu azalan sıra ile 3, 4 ve 1 mM'lık konsantrasyonlar izlemiştir. Diğer taraftan, 3 ve 4 saatlik uygulama sürelerinde en büyük somatik embriyolar 1 mM'lık konsantrasyonda oluşmuştur (Şekil 4.12). Cevap

veren somatik embriyolar 15 gün süre ile hormonsuz ortamda tutulduktan sonra rejenrasyon ortamına aktarılmış ve gelişmeleri sağlanmıştır. Cevap veren somatik embriyolar 15 gün süre ile hormonsuz ortamda tutulduktan sonra 0.5 ng/l TDZ içeren rejenrasyon ortamına aktarılmış ve gelişmeleri sağlanmıştır.



Şekil 4.12. Sodyum azitin farklı süre ve konsantrasyonlarında meydana gelen cevap veren somatik embriyoların (ok işareti ile gösterilmiştir) ve rejenere bitkilerin görünüşleri.

(1) kontrol, (2) 1 saat + 1 mM, (3) 1 saat + 2 mM, (4) 1 saat + 3 mM, (5) 1 saat + 4 mM, (6) 2 saat + 1 mM, (7) 2 saat + 2 mM, (8) 2 saat + 3 mM, (9) 2 saat + 4 mM, (10) 3 saat + 1 mM, (11) 3 saat + 2 mM, (12) 3 saat + 3 mM, (13) 3 saat + 4 mM, (14) 4 saat + 1 mM, (15) 4 saat + 2 mM, (16) 4 saat + 3 mM ve (17) 4 saat + 4 mM konsantrasyonlarda cevap veren somatik embriyoların (ok işareti ile gösterilmiştir) ve rejenere bitkilerin görünüşleri.

a. Eksplant sayısına göre cevap veren somatik embriyo (ESCSE) sayısı

ESCSE sayısı üzerine sodyum azitin uygulama süresi ve konsantrasyonu ile bu iki faktör arasındaki interaksiyon çok önemli ($P<0.01$) olmuştur (Çizelge 4.4).

Ortalama eksplant sayısına göre cevap veren somatik embriyo sayısı en yüksek 3.66 adet ile 2 saatlik uygulamadan elde edilmiş, bunu azalan sıra ile 1 saat (2.04 adet), 3 saat (1.79 adet) ve 4 saatlik (1.66 adet) uygulama süreleri izlemiştir. Bununla birlikte 3 ve 4 saatlik uygulama süreleri arasındaki farklılıklar önemsiz olup, istatistiksel olarak aynı grupta yer almışlardır (Çizelge 4.5).

Konsantrasyonların kendi içerisindeki ortalamaları esas alındığında, ESCSE sayısı bakımından ilk sırada 8.25 adet ile kontrol grubun yer aldığı, bunu 1.16 adet ile 1 mM, 0.95 adet ile 2 mM ve 0.70 adet 3 mM'lık konsantrasyonların izlediği ve bu karakter bakımından son sırada 4 mM'lık konsantrasyonun (0.36 adet) bulunduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte 1 ve 2 mM'lık uygulama konsantrasyonları arasındaki farklılıklar önemsiz olup, istatistiksel olarak aynı grupta yer almışlardır (Çizelge 4.5).

ESCSE sayısı üzerine sodyum azitin uygulama süresinin etkisi kullanılan konsantrasyona göre farklılık göstermiştir. Bu nedenle uygulama süresi $\times$ konsantrasyonun etkisi çok önemli ($P<0.01$) olmuştur (Çizelge 4.4). En yüksek ESCSE sayısı, ESEKO, KSEKO, ESCEK ve KSCEK oranları gibi tüm sürelerde kontrol uygulamasında elde edilmiştir. En düşük ESCSE sayısı oranı ise 1 saatlik uygulamada 3 mM'lık konsantrasyonda; 2 ve 3 saatlik uygulamalarda 4 mM'lık konsantrasyonda; 4 saatlik uygulamada 2, 3 ve 4 mM'lık konsantrasyonda elde edilmiştir (Çizelge 4.5).

b. Kallus sayısına göre cevap veren somatik embriyo (KSCSE) sayısı

KSCSE sayısı üzerine sodyum azitin uygulama süresi ve konsantrasyonu ile bu iki faktör arasındaki interaksiyon çok önemli ($P<0.01$) olmuştur (Çizelge 4.4).

Ortalamalar bakımından süreleri karşılaştırıldığında, en yüksek KSCSE sayısı 3.87 adet ile 2 saatlik uygulamadan elde edilmiş, bunu azalan sıra ile 1 saat (2.04 adet), 3 saat (1.79 adet) ve 4 saatlik (1.66 adet) uygulama süreleri takip etmiştir. Bununla birlikte 3 ve 4 saatlik uygulama süreleri arasındaki farklılıklar önemsiz olup, istatistiksel olarak aynı grupta yer almışlardır (Çizelge 4.5).

Ortalamalar esas alınarak konsantrasyonlara göre değerlendirildiğinde, en yüksek KSCSE sayısı 8.25 ile kontrol grupta tespit edilmiş, bunu 1.16 adet ile 1 mM, 0.96 adet ile 2 mM, 0.76 adet ile 3 mM ve 0.56 adet ile 4 mM'lık konsantrasyonlar izlemiştir (Çizelge 4.5).

KSCSE sayısı üzerine sodyum azitin uygulama süresinin etkisi kullanılan konsantrasyona göre farklılık göstermiştir. Bu nedenle uygulama süresi $\times$ konsantrasyonun etkisi çok önemli ($P<0.01$) olmuştur (Çizelge 4.4). En yüksek KSCSE sayısı, ESEKO, KSEKO, ESCEK ve KSCEK oranları ve ESCSE sayısı gibi tüm sürelerde kontrol uygulamasından elde edilmiştir. En düşük KSCSE sayısı oranı ise 1 saatlik uygulamada 3 mM'lık konsantrasyonda; 2 ve 3 saatlik uygulamalarda 4 mM'lık konsantrasyonda; 4 saatlik uygulamada ise 2, 3 ve 4 mM'lık konsantrasyonda elde edilmiştir (Çizelge 4.5).

c. Embriyogenik kallus sayısına göre cevap veren somatik embriyo (EKSCE) sayısı

Sodyum azitin uygulama süresi ve konsantrasyonu ile bu iki faktör arasındaki interaksiyon EKSCE sayısını çok önemli ($P<0.01$) derecede etkilemiştir (Çizelge 4.4).

Ortalama embriyogenik kallus sayısına göre cevap veren somatik embriyo sayısı uygulama süresine göre çok önemli değişim göstermiştir. En yüksek EKSCE sayısı 4.23 adet ile 2 saatlik uygulamadan elde edilmiş, bunu azalan sıra ile 1 saat (2.21 adet), 3 saat (1.93 adet) ve 4 saatlik (1.69 adet) uygulama süreleri takip etmiştir (Çizelge 4.5).

Konsantrasyonların ortalamalarına göre en yüksek EKSCE sayısı kontrolde (8.25 adet), en düşük ise 4 mM'lık konsantrasyonda (0.81 adet) gerçekleşmiştir. Diğer taraftan, EKSCE sayısı 1 mM'lık konsantrasyonda 1.31 adet, 2 mM'lık konsantrasyonda 1.17 adet ve 3 mM'lık konsantrasyonda 1.01 adet olarak belirlenmiştir. Bununla birlikte 1,2,3 ve 4 mM'lık uygulama konsantrasyonları arasındaki farklılıklar önemsiz olup, istatistiksel olarak aynı grupta yer almışlardır (Çizelge 4.5).

EKSCE sayısı üzerine sodyum azitin uygulama süresinin etkisi kullanılan konsantrasyona göre farklılık göstermiştir. Bu nedenle uygulama süresi $\times$ konsantrasyonun etkisi çok önemli ($P<0.01$) olmuştur (Çizelge 4.4). En yüksek EKSCE sayısı, ESEKO, KSEKO, ESCEK ve KSCEK oranları ve yine ESCSE ve KSCSE sayıları gibi tüm sürelerde kontrol uygulamasından elde edilmiştir. En düşük KSCSE sayısı oranı ise 1 saatlik uygulamada 3 mM'lık konsantrasyonda, 2 ve 3 saatlik uygulamalarda 4 mM'lık konsantrasyonda; 4 saatlik uygulamada ise 2, 3 ve 4 mM'lık konsantrasyonda elde edilmiştir (Çizelge 4.5).

5) Rejenerasyon etkinliği (RE)

Cevap veren somatik embriyolar rejenerasyon ortamına aktarıldıktan 15 gün sonra hormonsuz ortama konulmuşlar ve burada bir ay süreyle tutulmuşlardır. Bu süre içerisinde somatik embriyolarda kök ve sürgün oluşumları gerçekleşmiştir (Şekil 4.12).

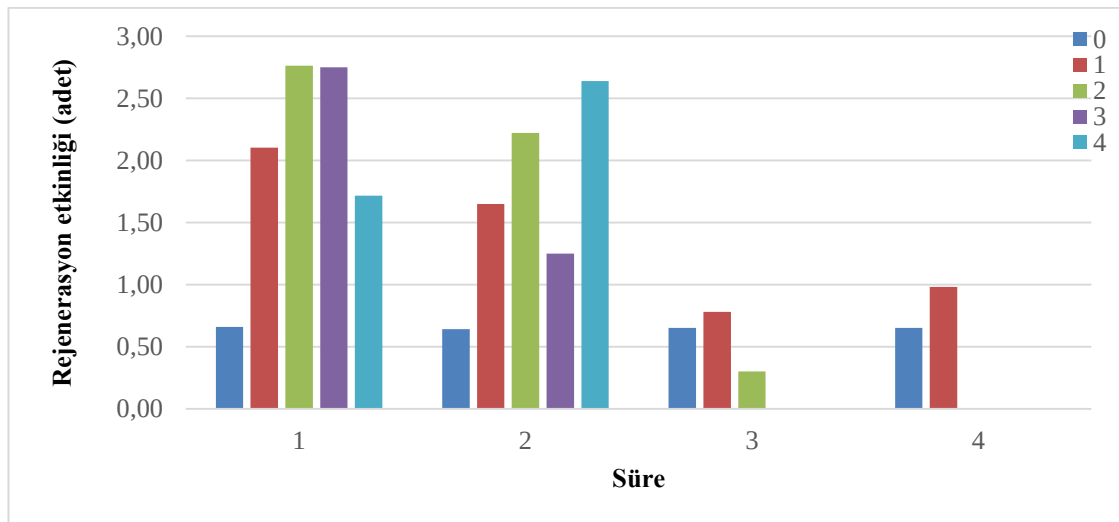
RE üzerine sodyum azitin uygulama süresi çok önemli ($P<0.01$) derecede etkilemiş, konsantrasyonun etkisi önemsiz, bu iki faktör arasındaki interaksiyon önemli ($P<0.05$) olmuştur (Çizelge 4.4).

Uygulama süresine göre ortalama rejenerasyon etkinliği dikkate alındığında, en yüksek rejenerasyon etkinliğinin 1.99 adet ile 1 saatlik uygulamadan elde edildiği, bunu 1.68 adet ile 2 saatlik, 0.34 adet ile 3 saatlik ve 0.32 adet ile 4 saatlik uygulamaların izlediği belirlenmiştir. Bununla birlikte 1 saatlik uygulama ve 2 saatlik uygulamalar ve yine 3 ve

4 saatlik uygulamalar arasındaki farklılıklar önemsiz olup, istatistiksel olarak aynı grupta yer almışlardır (Çizelge 4.5).

Diğer taraftan, ortalamalar esas alınarak konsantrasyonlara göre değerlendirme yapıldığında, en yüksek rejenerasyon etkinliğinin 1.38 adet ile 1 mM'lık konsantrasyondan elde edildiği, bunu 2 mM (1.32 adet), 4 mM (1.08 adet) ve 3 mM'lık (1.00 adet) konsantrasyonların izlediği, kontrol uygulamasının ise 0.65 adet ile son sırada yer aldığı görülmüştür (Çizelge 4.5).

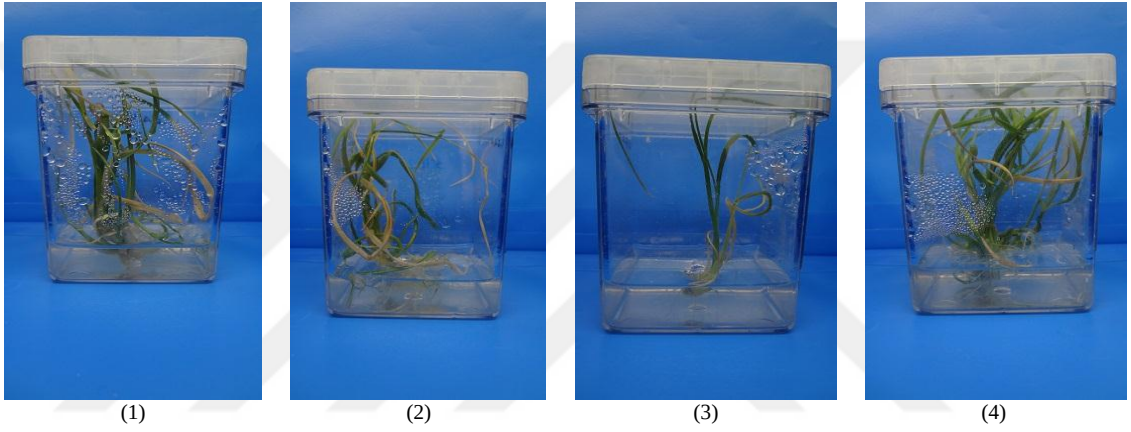
RE üzerine sodyum azitin uygulama süresinin etkisi kullanılan konsantrasyona göre farklılık göstermiştir. Bu nedenle uygulama süresi $\times$ konsantrasyonun etkisi önemli ($P<0.05$) olmuştur (Çizelge 4.4). En yüksek RE, 1 ve 2 saatlik uygulama sürelerinde 2 mM'lık konsantrasyondan ve 3 ve 4 saatlik uygulama süreleri ise 1 mM'lık konsantrasyondan elde edilmiştir. En düşük RE, 1 ve 2 saatlik uygulama sürelerinde 0 mM'lık konsantrasyonda; 3 saatlik uygulamada 3 ve 4 mM'lık konsantrasyonda ve 4 saatlik uygulama süresi ise 2, 3 ve 4 mM'lık konsantrasyonda elde edilmiştir (Çizelge 4.5 ve Şekil 4.13).



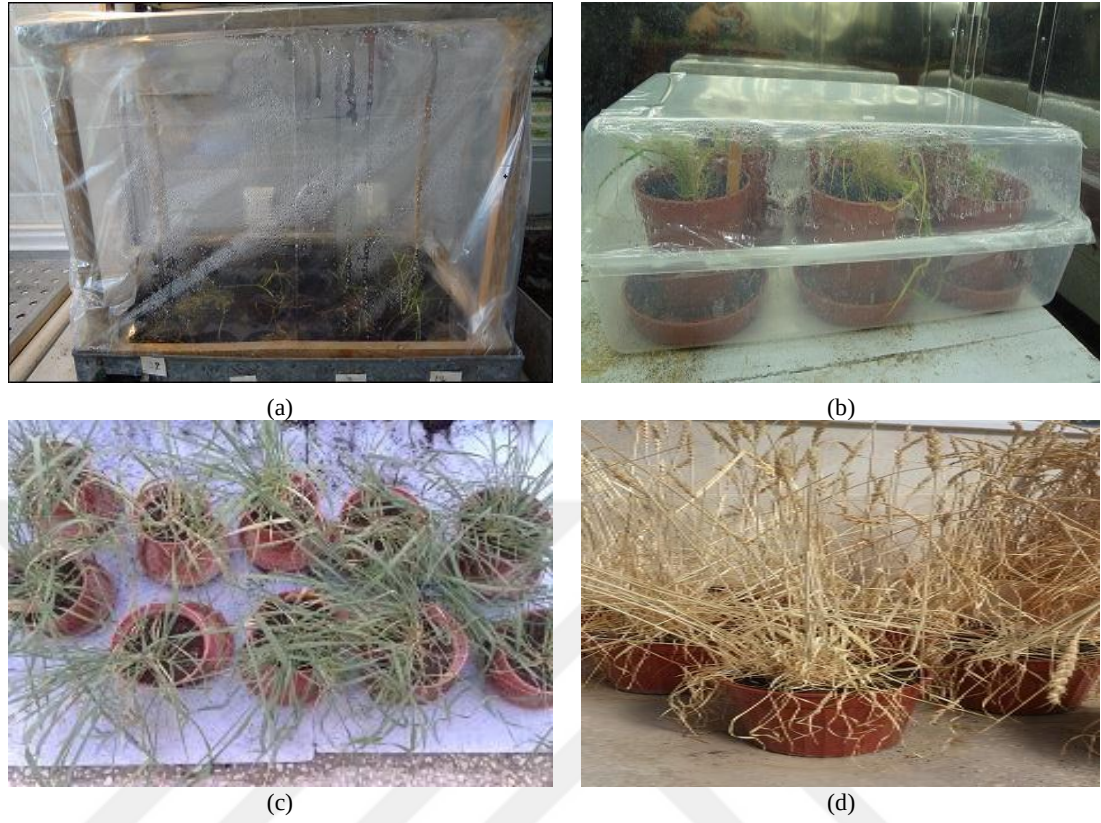
Şekil 4.13. Olgun embriyolara farklı süre ve dozlarda sodyum azit uygulamasının rejenerasyon etkinliği üzerine etkileri.

6) Bitki sayısı (BS)

Kök ve sürgün oluşturan somatik embriyolar 30 gün boyunca hormonsuz ortam içeren magenda kutularında tutularak gelişmeye bırakılmışlardır (Şekil 4.14). Rejenere bitkilerin farklı ortamlarda görünüşleri; bitkilerin saksılara aktarılması ve aklimasyona alınması, bitkilerin aklimasyon sonrası görünüşleri, bitkilerin saksılarda görünüşleri ve toprağa aktarılmış bitkilerin görünüşleri şekil 4.15’de gösterilmiştir.



Şekil 4.14. Sodyum azitin bazı süre ve konsantrasyonlarında bitkiciklerin magendada görünüşleri



Şekil 4.15. Rejenere bitkilerin farklı ortamlarda görünüşleri.

a) bitkilerin saksılara aktarılması ve aklımasyona alınması, b) bitkilerin aklımasyon sonrası görünüşler, c) bitkilerin saksılarda görünüşleri, d) toprağa aktarılmış bitkilerin görünüşleri.

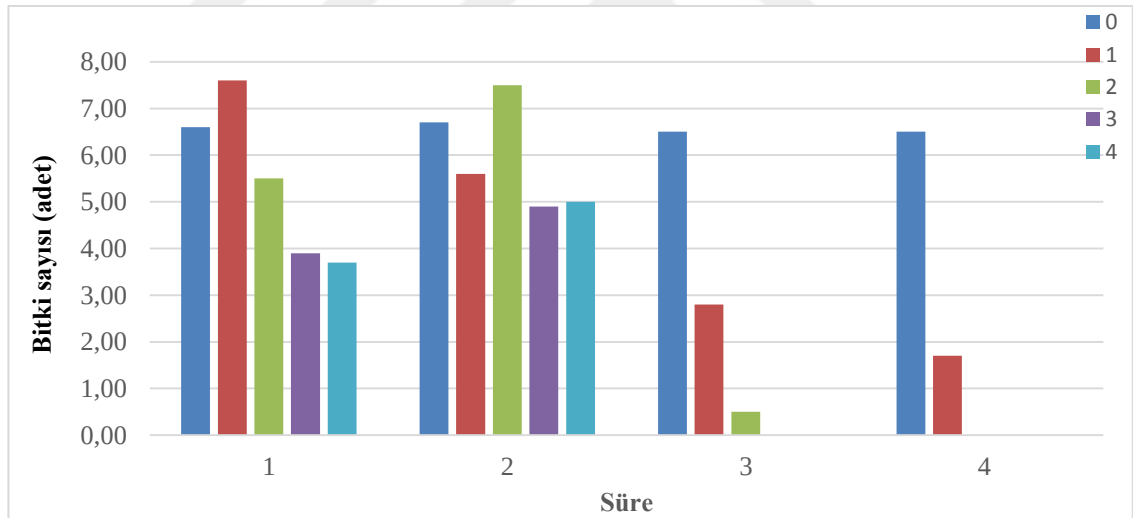
Bitki sayısı üzerine sodyum azitin uygulama süresi ve konsantrasyonu ile bu iki faktör arasındaki interaksiyon çok önemli ($P < 0.01$) derecede etkilemiştir (Çizelge 4.4).

Ortalama bitki sayısı en yüksek bitki sayısı 5.94 adet ile 2 saatlik uygulamadan elde edilmiş, bunu azalan sıra ile 1 saat (5.46 adet), 3 saat (1.96 adet) ve 4 saatlik (1.64 adet) uygulama süreleri izlemiştir. Bununla birlikte 1 saatlik uygulama ve 2 saatlik uygulamalar ve yine 3 ve 4 saatlik uygulama süreleri arasındaki farklılıklar önemsiz olup, istatistiksel olarak aynı grupta yer almışlardır (Çizelge 4.5).

Ortalamalar dikkate alınarak konsantrasyonlara göre değerlendirme yapıldığında, en yüksek bitki sayısının 6.57 adet ile kontrolden (0 mM) elde edildiği, buna 1 mM (4.42 adet), 2 mM (3.37 adet), 3 mM (2.20 adet) ve 4 mM'lık (2.17) konsantrasyonların izlediği görülmüştür. Bununla birlikte 3 ve 4 mM'lık uygulama konsantrasyonları

arasındaki farklılıklar önemsiz olup, istatistiksel olarak aynı grupta yer almışlardır (Çizelge 4.5).

BS üzerine sodyum azitin uygulama süresinin etkisi kullanılan konsantrasyona göre farklılık göstermiştir. Bu nedenle uygulama süresi $\times$ konsantrasyonun etkisi çok önemli ($P<0.01$) olmuştur (Çizelge 4.4). En yüksek BS, 1 saatlik uygulama süresinde 1 mM'lık konsantrasyonda; 2 saatlik uygulama süresinde 2 mM'lık konsantrasyonda ve 3 ve 4 saatlik uygulama süreleri ise 0 mM'lık konsantrasyonda elde edilmiştir. En düşük BS ise, 1 saatlik uygulama süresinde 4 mM'lık konsantrasyonda, 2 saatlik uygulamada 3 mM'lık konsantrasyonda; 3 saatlik uygulamada 3 ve 4 mM'lık konsantrasyonda ve 4 saatlik uygulamada ise 2, 3 ve 4 mM'lık konsantrasyonda elde edilmiştir (Çizelge 4.5 ve Şekil 4.16).



Şekil 4.16. Olgun embriyolara farklı süre ve dozlarda sodyum azit uygulamasının bitki sayısı üzerine etkileri.

7) Optimum dozun (LD₅₀) tespit edilmesi

Kimyasal mutagenlerin optimum konsantrasyonunun ve uygulama süresinin belirlenmesinde LD₅₀ (letal doz) kriteri esas alınmıştır. Daha önce belirtildiği gibi LD₅₀ değerinin tespit edilmesinde rejenerasyon etkinliği ve bitki sayısı esas alınmıştır. Buna

göre rejenerasyon etkinliği için LD₅₀ değeri 2 mM'lık konsantrasyonun 3 saat süreyle uygulanmasından, bitki sayısı için ise 4 mM'lık konsantrasyonun 1 saat süre ile uygulanmasından elde edilmiştir (Çizelge 4.5 ve Şekil 4.13 ve Şekil 4.16).

8) Soyum azit uygulamasından sonra incelenen doku kültürü karakterler arasındaki korelasyonlar

İncelenen karakterler arasındaki ilişkiler Çizelge 4.6'da verilmiştir. İncelenen karakterlerden KO oranı ile ESEKO ($r=0.85$), KSEKO ($r=0.83$), ESCEK ($r=0.61$), KSCEK ($r=0.58$), EKSCEK ($r=0.65$), ESCSE ($r=0.38$), KSCSE ($r=0.36$), EKSCE ($r=0.39$), RE ($r=0.36$) ve BS ($r=0.51$); ESEKO oranı ile KSEKO ($r=0.96$), ESCEK ($r=0.83$), KSCEK ($r=0.79$), EKSCEK ($r=0.72$), ESCSE ($r=0.61$), KSCSE ($r=0.59$), EKSCE ($r=0.59$), RE ($r=0.31$) ve BS ($r=0.62$); KSEKO oranı ile ESCEK ($r=0.83$), KSCEK ($r=0.84$), EKSCEK ($r=0.78$), ESCSE ($r=0.59$), KSCSE ($r=0.60$), EKSCE ($r=0.61$), RE ($r=0.35$) ve BS ($r=0.63$); ESCEK oranı ile KSCEK ($r=0.97$), EKSCEK ($r=0.88$), ESCSE ($r=0.81$), KSCSE ($r=0.81$), EKSCE ($r=0.80$), RE ($r=0.18$) ve BS ($r=0.59$); KSCEK oranı ile EKSCEK ($r=0.92$), ESCSE ($r=0.78$), KSCSE ($r=0.80$), EKSCE ($r=0.81$), RE ($r=0.23$) ve BS ($r=0.59$); EKSCEK oranı ile ESCSE ($r=0.65$), KSCSE ($r=0.68$), EKSCE ($r=0.72$), RE ($r=0.25$) ve BS ($r=0.54$); ESCSE sayısı ile KSCSE ($r=0.99$), EKSCE ($r=0.97$), RE ($r=0.08$) ve BS ($r=0.48$); KSCSE sayısı ile EKSCE ($r=0.99$), RE ($r=0.12$) ve BS ($r=0.49$); EKSCE ile RE ($r=0.17$) ve BS ($r=0.51$); RE ile BS ($r=0.68$) arasındaki ilişkiler de olumlu ve çok önemli olmuştur. Ayrıca, RE ile ESCEK ($r=0.18$) ve EKSCE ($r=0.17$) arasındaki ilişkilerin olumlu ve önemli olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.6. Olgun embriyolara farklı süre ve dozlarda sodyum azit uygulamasından sonra *in vitro* ortamda incelenen bazı ait korelasyon katsayıları.

	KO (%)	ESEKO (%)	KSEKO (%)	ESCEK (%)	KSCEK (%)	EKSCEK (%)	ESCSE (adet)	KSCSE (adet)	EKSCE (adet)	RE (adet)	BS (adet)
KO	1										
ESEKO	0.85**	1									
KSEKO	0.83**	0.96**	1								
ESCEK	0.61**	0.83**	0.83**	1							
KSCEK	0.58**	0.79**	0.84**	0.97**	1						
EKSCEK	0.65**	0.72**	0.78**	0.88**	0.92**	1					
ESCSE	0.38**	0.61**	0.59**	0.81**	0.78**	0.65**	1				
KSCSE	0.36**	0.59**	0.60**	0.81**	0.80**	0.68**	0.99**	1			
EKSE	0.39**	0.59**	0.61**	0.80**	0.81**	0.72**	0.97**	0.99**	1		
RE	0.36**	0.31**	0.35**	0.18*	0.23**	0.25**	0.08	0.12	0.17*	1	
B.S	0.51**	0.62**	0.63**	0.59**	0.59**	0.54**	0.48**	0.49**	0.51**	0.68**	1

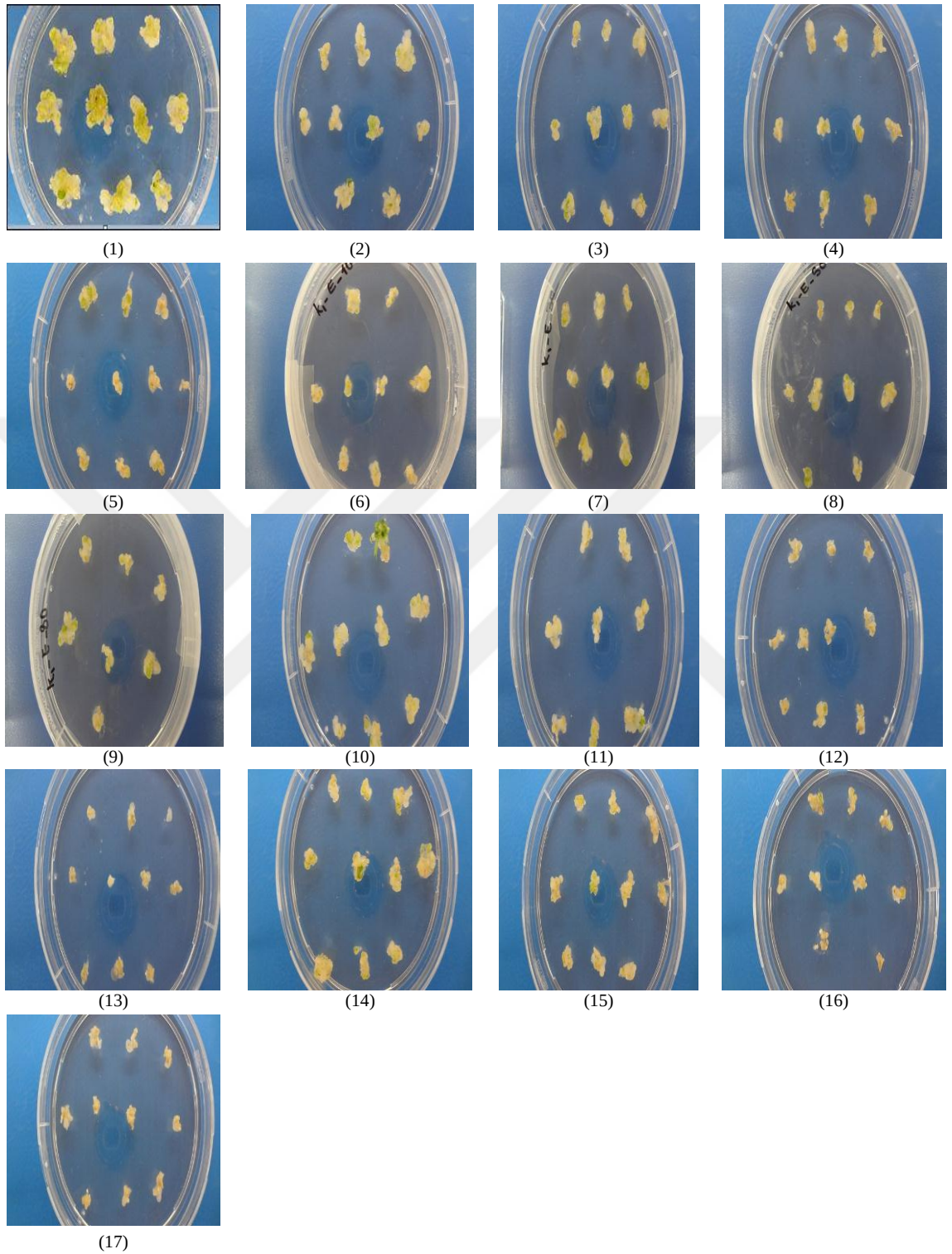
*, p<0.05; **: p<0.01 düzeyinde önemlidir.

4.1.2. Kalluslara mutagen uygulamaları

4.1.2.a. Kallusa etil metansülfonatın (EMS) etkileri

1) Embriyogenik kallus oluşum oranı

Embriyogenik kallus oluşum oranı kültüre alınan eksplant sayısına göre değerlendirilmiştir. Kalluslar hormonsuz ortama konulduktan yaklaşık 7-8 gün sonra embriyogenik kalluslar oluşmaya başlamıştır. Embriyogenik kallusların büyüklüğü etil metansülfonatın hem uygulama süresine hem de konsantrasyonuna göre farklılık göstermiştir. Nitekim, 2 ve 4 saatlik uygulama sürelerinde embriyogenik kallusların büyüklüğü bakımından konsantrasyonlara göre görülebilir bir farklılık oluşmamıştır. Buna karşın, 6 saatlik uygulama süresinde embriyogenik kallusların boyutu 10 mM'lık konsantrasyonda en büyük olmuş, bunu azalan sıra ile 30, 50 ve 80 mM'lık konsantrasyonlar izlemiştir. Diğer taraftan, 8 saatlik uygulama süresinde embriyogenik kallusların boyutu 10 mM'lık konsantrasyonda en büyük olmuş, bunu azalan sıra ile 30, 50 ve 80 mM'lık konsantrasyonlar izlemiştir (Şekil 4.17). Embriyogenik kalluslar 15 gün boyunca bu ortamda tutularak gelişmeleri sağlanmıştır.



Şekil 4.17. EMS'nin farklı süre ve konsantrasyonlarında meydana gelen embriyogenik kallusların görünüşleri.

(1) kontrol, (2) 2 saat + 10 mM, (3) 2 saat + 30 mM, (4) 2 saat + 50 mM, (5) 2 saat + 80 mM, (6) 4 saat + 10 mM, (7) 4 saat + 30 mM, (8) 4 saat + 50 mM, (9) 4 saat + 80 mM, (10) 6 saat + 10 mM, (11) 6 saat + 30 mM, (12) 6 saat + 50 mM, (13) 6 saat + 80 mM, (14) 8 saat + 10 mM, (15) 8 saat + 30 mM, (16) 8 saat + 50 mM ve (17) 8 saat + 80 mM konsantrasyonlarda embriyogenik kallusların görünüşleri.

a. Eksplant sayısına göre embriyogenik kallus oluşum (ESEKO) oranı

ESEKO oranı üzerine mutagenin uygulama süresi ve konsantrasyonu ile bu iki faktör arasındaki interaksyon çok önemli ($P<0.01$) derecede etkilemiştir (Çizelge 4.7).

Uygulama süresine göre ortalama eksplant sayısına göre embriyogenik kallus oluşum oranı dikkate alındığında, uygulama süresi uzadıkça ESEKO oranı azalmış ve en yüksek ESEKO oranı (%81.20) 2 saatlik uygulamadan elde edilmiş, bunu azalan sıra ile 4 saat (%71.00), 8 saat (%69.80) ve 6 saatlik (%68.00) uygulama süreleri izlemiştir. Bununla birlikte 4, 6 ve 8 saatlik uygulamalar arasındaki farklılıklar önemsiz olup, istatistiksel olarak aynı grupta yer almışlardır (Çizelge 4.8).

Ortalamalar esas alınarak konsantrasyonlara göre değerlendirildiğinde, en yüksek ESEKO oranının kontrolde (%98.50), en düşük ise 80 mM'lık konsantrasyonda (%53.00) gerçekleştiği belirlenmiştir. Diğer taraftan, ESEKO oranı 10 mM'lık konsantrasyonda %81.00, 30 mM'lık konsantrasyonda %70.25 ve 50 mM'lık konsantrasyonda %59.75 olmuştur (Çizelge 4.8).

ESEKO oranı üzerine EMS'nin uygulama süresinin etkisi kullanılan konsantrasyona göre farklılık göstermiştir. Bu nedenle uygulama süresi $\times$ konsantrasyonun etkisi çok önemli ($P<0.01$) olmuştur (Çizelge 4.7). En yüksek ESEKO oranı tüm sürelerde kontrol konsantrasyonda elde edilmiştir. En düşük ESEKO oranı ise 2, 4, 6 ve 8 saatlik uygulamalarda 80 mM'lık konsantrasyondan elde edilmiştir (Çizelge 4.8).



Çizelge 4.7. Kallusa farklı süre ve dozlarda EMS uygulamasından sonra in vitro ortamda incelenen bazı karakterlere ait varyans analizi sonuçları.

Varyasyon Kaynağı	Kareler ortalaması							
	SD	ESEKO	ESCEK	EKSCEK	ESCSE	EKSCE	RE	BS
Süre (saat)	3	1758.00**	2285.83**	2737.84**	43.88**	74.25**	0.661**	19.69**
Konsantrasyon (%)	4	12961.25**	19172.00**	2066.97**	338.57**	259.09**	1.86**	227.53**
Süre × Konsantrasyon	12	1532.58**	1923.33**	1606.26**	11.76**	15.05**	0.57**	15.48**
Hata	180	70.22	78.72	156.53	1.29	2.13	0.12	3.266
Toplam	170							

*, p<0.05; **: p<0.01 düzeyinde önemlidir.

Çizelge 4.8. Kallusa farklı süre ve dozlarda EMS uygulamasından sonra *in vitro* ortamda incelenen bazı karakterlere ait veriler.

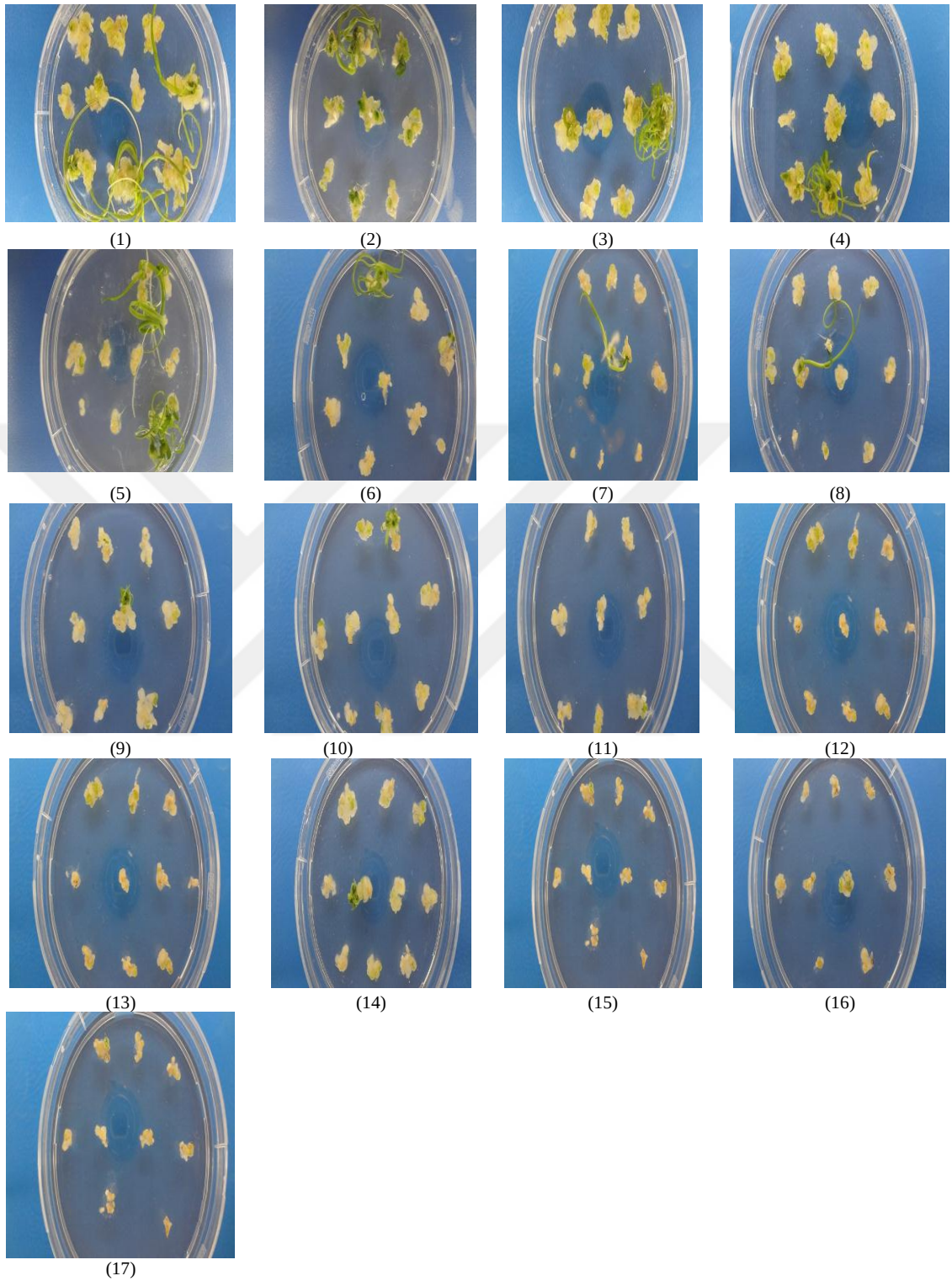
Süre (saat)	Konsantrasyon (mM)	ESEKO (%)	ESCEK (%)	EKSCEK (%)	ESCSE (adet)	EKSCE (adet)	RE (adet)	BS (adet)
2	0	100.00 ^{a2}	100.00 ^a	100.00 ^a	8.33 ^a	8.33 ^a	0.66 ^a	6.60 ^a
	10	80.00 ^b	70.00 ^b	87.22 ^b	6.08 ^b	7.90 ^a	0.20 ^{bc}	1.40 ^{bc}
	30	76.00 ^b	66.00 ^{bc}	86.78 ^b	5.16 ^b	6.76 ^a	0.36 ^b	2.40 ^b
	50	76.00 ^b	62.00 ^c	81.42 ^c	3.82 ^c	5.01 ^b	0.34 ^b	2.00 ^b
	80	74.00 ^b	66.00 ^{bc}	89.28 ^b	1.46 ^d	1.98 ^c	0.05 ^c	0.40 ^c
	Ortalama	81.20 ^{A1}	72.80 ^A	88.94 ^B	4.97 ^A	5.99 ^A	0.32 ^{BC}	2.56 ^B
4	0	98.00 ^a	98.00 ^a	98.00 ^a	8.32 ^a	8.32 ^a	0.64 ^a	6.70 ^a
	10	66.00 ^b	60.00 ^b	91.21 ^b	2.35 ^b	3.84 ^b	0.21 ^b	1.40 ^b
	30	65.00 ^b	62.00 ^b	92.87 ^{ab}	2.21 ^{bc}	3.47 ^{bc}	0.21 ^b	1.30 ^b
	50	65.00 ^b	63.00 ^b	96.66 ^{ab}	1.48 ^{cd}	2.31 ^c	0.02 ^b	0.10 ^b
	80	61.00 ^b	60.00 ^b	98.33 ^a	1.24 ^d	2.13 ^d	0.06 ^b	0.40 ^b
	Ortalama	71.00 ^B	68.60 ^B	95.41 ^A	3.12 ^C	4.01 ^C	0.23 ^C	1.98 ^B
6	0	98.00 ^a	98.00 ^a	98.00 ^a	8.28 ^a	8.28 ^a	0.65 ^a	6.50 ^a
	10	86.00 ^b	78.00 ^b	91.11 ^{ab}	5.12 ^b	5.95 ^b	0.76 ^a	5.80 ^a
	30	82.00 ^b	66.00 ^c	80.83 ^{ab}	4.03 ^c	4.93 ^{bc}	0.66 ^a	4.40 ^a
	50	44.00 ^c	32.00 ^d	76.78 ^b	0.89 ^d	2.15 ^d	0.23 ^b	0.60 ^b
	80	30.00 ^d	32.00 ^d	97.50 ^a	1.02 ^d	3.70 ^c	0.06 ^b	0.20 ^b
	Ortalama	68.00 ^B	61.20 ^C	88.84 ^B	3.86 ^B	5.00 ^B	0.47 ^A	3.50 ^A
8	0	98.00 ^a	98.00 ^a	98.00 ^a	8.10 ^a	8.10 ^a	0.65 ^{ab}	6.50 ^a
	10	92.00 ^a	88.00 ^a	95.77 ^a	5.10 ^b	5.55 ^b	0.18 ^{cd}	1.60 ^c
	30	58.00 ^b	46.00 ^c	79.90 ^b	0.67 ^c	1.18 ^c	0.44 ^{bc}	2.00 ^{bc}
	50	54.00 ^b	40.00 ^c	74.02 ^a	0.56 ^c	1.03 ^{cd}	0.99 ^a	2.90 ^b
	80	47.00 ^c	18.00 ^d	40.33 ^c	0.02 ^c	0.05 ^d	0.00 ^d	0.00 ^d
	Ortalama	69.80 ^B	58.00 ^C	77.60 ^C	2.89 ^C	3.18 ^D	0.45 ^{AB}	2.60 ^B
Ortalama Konsantrasyon (mM)	0	98.50 ^A	98.50 ^A	98.50 ^A	8.25 ^A	8.25 ^A	0.65 ^A	6.57 ^A
	10	81.00 ^B	74.00 ^B	91.33 ^B	4.66 ^B	5.81 ^B	0.34 ^B	2.55 ^B
	30	70.25 ^C	60.00 ^C	85.10 ^C	3.01 ^C	4.08 ^C	0.42 ^B	2.52 ^B
	50	59.75 ^D	49.25 ^D	82.22 ^C	1.68 ^D	2.62 ^D	0.40 ^B	1.40 ^C
	80	53.00 ^E	44.00 ^E	81.36 ^C	0.93 ^E	1.96 ^E	0.04 ^C	0.25 ^D
LD₅₀ değeri		49.25	49.25	49.25	4.12	4.12	0.32	3.28

1: Aynı sütunda aynı büyük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemsizdir.

2: Her bir uygulama süresi için aynı sütunda aynı küçük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemsizdir.

2) Cevap veren embriyogenik kallus oranı

Kök ve sürgüne sahip bitkicik meydana getiren embriyogenik kalluslar cevap veren embriyogenik kallus olarak değerlendirilmiştir. Cevap veren embriyogenik kallus oranı eksplant sayısına ve embriyogenik kallus sayısına göre iki şekilde değerlendirilmiştir. Embriyogenik kalluslar hormonsuz ortama konulduktan yaklaşık 6-8 gün sonra cevap veren embriyogenik kalluslar oluşmaya başlamıştır. Cevap veren embriyogenik kallusların büyüklüğü EMS'nin hem uygulama süresine hem de konsantrasyonuna göre farklılık göstermiştir. Örneğin, 2 saatlik uygulama süresinde cevap veren embriyogenik kallusların boyutu 10 mM'lık konsantrasyonda en büyük olmuş, bunu azalan sıra ile 30, 50 ve 80 mM'lık konsantrasyonlar izlemiştir. Buna karşın, 4 saatlik uygulama süresinde cevap veren embriyogenik kallusların büyüklüğü bakımından konsantrasyonlara göre görülebilir bir farklılık oluşmamıştır. Diğer taraftan, 6 ve 8 saatlik uygulama sürelerinde en büyük cevap veren embriyogenik kalluslar EMS'nin 10 mM'lık konsantrasyonunda oluşmuştur (Şekil 4.18). Cevap veren embriyogenik kalluslar 15 gün boyunca bu ortamda tutularak gelişmeleri sağlanmıştır.



Şekil 4.18. EMS'nin farklı süre ve konsantrasyonlarında meydana gelen cevap veren embriyogenik kallusların görünüşleri.

(1) kontrol, (2) 2 saat + 10 mM, (3) 2 saat + 30 mM, (4) 2 saat + 50 mM, (5) 2 saat + 80 mM, (6) 4 saat + 10 mM, (7) 4 saat + 30 mM, (8) 4 saat + 50 mM, (9) 4 saat + 80 mM, (10) 6 saat + 10 mM, (11) 6 saat + 30 mM, (12) 6 saat + 50 mM, (13) 6 saat + 80 mM, (14) 8 saat + 10 mM, (15) 8 saat + 30 mM, (16) 8 saat + 50 mM ve (17) 8 saat + 80 mM konsantrasyonlarda cevap veren embriyogenik kallusların görünüşleri.

a. Eksplant sayısına göre cevap veren embriyogenik kallus (ESCEK) oranı

ESCEK oranı üzerine etil metansülfonatin uygulama süresi ve konsantrasyonu ile bu iki faktör arasındaki interaksiyon çok önemli ($P<0.01$) derecede etkilemiştir (Çizelge 4.7).

Ortalamalar bakımından süreleri karşılaştırıldığında, eksplant sayısına göre cevap veren embriyogenik kallus oranı 2 saatlik uygulamada %72.80 olmuş ve bunu azalan sıra ile 4 saat (%68.60) ve 6 saatlik (%61.20) uygulama süreleri izlemiştir. Bu karakter bakımından en düşük değer ise %58.00 ile 8 saatlik uygulama süresinde kaydedilmiştir. Bununla birlikte 6 saatlik uygulama ve 8 saatlik uygulama süreleri arasındaki farklılıklar önemsiz olup, istatistiksel olarak aynı grupta yer almışlardır (Çizelge 4.8).

Ortalamalar bakımından konsantrasyonlar karşılaştırıldığında, en yüksek ESCEK oranının (%100) kontrolde (%0), en düşük ise (%44.00) 80 mM'lık konsantrasyonda gerçekleştiği tespit edilmiştir. Diğer taraftan, ESCEK oranı 10 mM'lık konsantrasyonda %74.00, 30 mM'lık konsantrasyonda %60.00 ve 50 mM'lık konsantrasyonda ise %49.25 olmuştur (Çizelge 4.8).

ESCEK oranı üzerine etil metansülfonatin uygulama süresinin etkisi kullanılan konsantrasyona göre farklılık göstermiştir. Bu nedenle uygulama süresi $\times$ konsantrasyonun etkisi çok önemli ($P<0.01$) olmuştur (Çizelge 4.7). En yüksek ESCEK oranı tüm sürelerde kontrol konsantrasyonda elde edilmiştir. En düşük ESCEK oranı ise 2 saatlik uygulama süresinde 50 mM'lık konsantrasyonda; 4 saatlik uygulama süresinde 10 ve 80 mM'lık konsantrasyonda; 6 saatlik uygulama süresinde 50 ve 80 mM'lık konsantrasyonda ve 8 saatlik uygulama süresinde 80 mM'lık konsantrasyonda edilmiştir (Çizelge 4.8).

b. Embriyogenik kallus sayısına göre cevap veren embriyogenik kallus (EKSCEK) oranı

EKSCEK oranı üzerine uygulama süresi ve konsantrasyonu ile bu iki faktör arasındaki interaksiyon çok önemli ($P<0.01$) derecede etkilemiştir (Çizelge 4.7).

Ortalamalar bakımından süreleri karşılaştırıldığında, 4 saatlik uygulamada %95.41 olan EKSCEK oranı, 2 saatlik uygulamada %88.94'e, 6 saatlik uygulamada %88.84'e ve 8 saatlik uygulamada ise %77.60'a düşmüş, ancak 2 ve 6 saatlik uygulamalar arasındaki farklılıklar önemsiz olmuştur (Çizelge 4.8).

Ortalamalar esas alınarak konsantrasyonlara göre değerlendirildiğinde, en yüksek EKSCEK oranın kontrolde (%98.50), en düşük ise 80 mM'lık konsantrasyonda (%81.36) elde edilmiştir. Diğer taraftan, EKSCEK oranı 10 mM'lık konsantrasyonda %91.33, 30 mM'lık konsantrasyonda %85.10 ve 50 mM'lık konsantrasyonda %82.22 olmuştur (Çizelge 4.8).

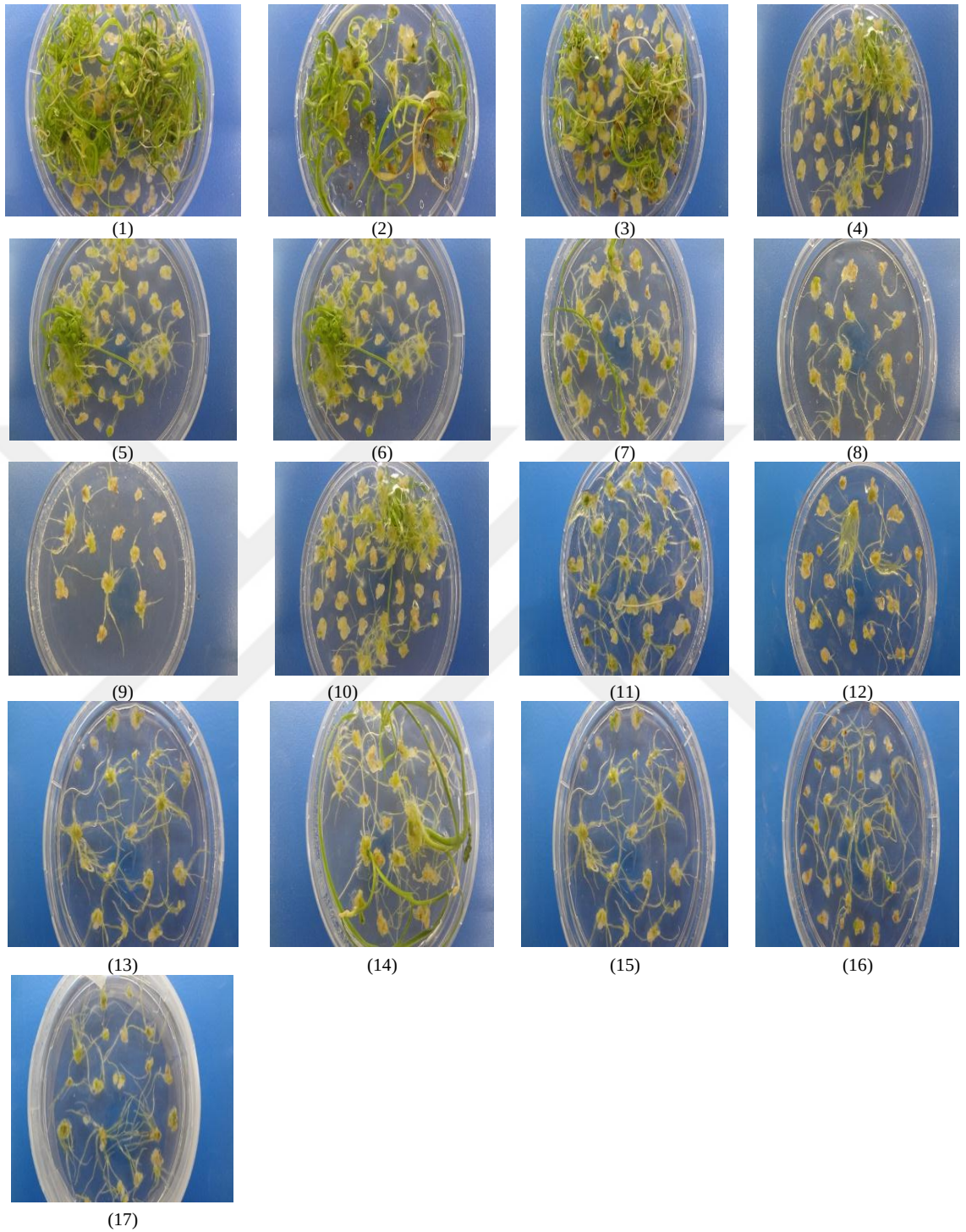
EKSCEK oranı üzerine EMS'nin uygulama süresinin etkisi kullanılan konsantrasyona göre farklılık göstermiştir. Bu nedenle uygulama süresi $\times$ konsantrasyonun etkisi çok önemli ($P<0.01$) olmuştur (Çizelge 4.7). En yüksek EKSCEK oranı tüm sürelerde kontrol konsantrasyonda elde edilmiştir. En düşük EKSCEK oranı ise 2 saatlik uygulama süresinde 50 mM'lık konsantrasyonda; 4 saatlik uygulama süresinde 10 mM'lık konsantrasyonda; 6 saatlik uygulama süresinde 50 mM'lık konsantrasyonda ve 8 saatlik uygulama süresinde 80 mM'lık konsantrasyondan edilmiştir (Çizelge 4.8).

3) Cevap veren somatik embriyo sayısı

Cevap veren somatik embriyo sayısı, eksplant sayısına, ve embriyogenik kallus sayısına göre olmak üzere iki şekilde değerlendirilmiştir. Embriyogenik kalluslar hormonsuz ortama konulduktan yaklaşık 2-3 gün sonra cevap veren somatik embriyolar daha net bir şekilde görülmeye başlamıştır. Cevap veren somatik embriyoların büyüklüğü

EMS'nin hem uygulama süresine hem de konsantrasyonuna göre farklılık göstermiştir. Nitekim, 2, 4, 6 ve 8 saatlik uygulama sürelerinde somatik embriyolar boyutu 10 mM'lık konsantrasyonda en büyük olmuş, bunu azalan sıra ile 30, 50 ve 80 mM'lık konsantrasyonlar izlemiştir (Şekil 4.19). Cevap veren somatik embriyolar 15 gün süresi ile hormonsuz ortamda tutulduktan sonra rejenrasyon ortamına aktarılmış ve gelişmeleri sağlanmıştır.





Şekil 4.19. EMS'nin farklı süre ve konsantrasyonlarında meydana gelen cevap veren somatik embriyoların (ok işareti ile gösterilmiştir) ve rejenere bitkilerin görünüşleri.

(1) kontrol, (2) 2 saat + 10 mM, (3) 2 saat + 30 mM, (4) 2 saat + 50 mM, (5) 2 saat + 80 mM, (6) 4 saat + 10 mM, (7) 4 saat + 30 mM, (8) 4 saat + 50 mM, (9) 4 saat + 80 mM, (10) 6 saat + 10 mM, (11) 6 saat + 30 mM, (12) 6 saat + 50 mM, (13) 6 saat + 80 mM, (14) 8 saat + 10 mM, (15) 8 saat + 30 mM, (16) 8 saat + 50 mM ve (17) 8 saat + 80 mM konsantrasyonlarda cevap veren somatik embriyoların (ok işareti ile gösterilmiştir) ve rejenere bitkilerin görünüşleri.

a. Eksplant sayısına göre cevap veren somatik embriyo (ESCSE) sayısı

ESCSE sayısı üzerine etil metansülfonatin uygulama süresi ve konsantrasyonu ile bu iki faktör arasındaki interaksiyon çok önemli ($P<0.01$) derecede etkilemiştir (Çizelge 4.7).

Ortalama eksplant sayısına göre cevap veren somatik embriyo sayısı en fazla 2 saatlik uygulamada (4.97 adet) tespit edilmiş, bunu azalan sıra ile 6 saatlik (3.86 adet), 4 saat (3.12 adet), ve 8 saat (2.89 adet) uygulama süreleri izlemiştir. Diğer taraftan, 4 ve 8 saatlik uygulamalar arasındaki farklılıklar önemsiz olmuştur (Çizelge 4.8).

Konsantrasyonların kendi içerisindeki ortalamaları esas alındığında, ESCSE sayısı bakımından ilk sırada 8.25 adet ile kontrol grubun yer aldığı, bunu 4.66 adet ile 10 mM, 3.01 adet ile 30 mM ve 1.68 adet 50 mM'lık konsantrasyonların izlediği ve bu karakter bakımından son sırada 80 mM'lık konsantrasyonun (0.93 adet) bulunduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.8).

ESCSE sayısı üzerine EMS'nin uygulama süresinin etkisi kullanılan konsantrasyona göre farklılık göstermiştir. Bu nedenle uygulama süresi $\times$ konsantrasyonun etkisi çok önemli ($P<0.01$) olmuştur (Çizelge 4.7). En yüksek ESCSE sayısı tüm sürelerde kontrol konsantrasyonda elde edilmiştir. En düşük ESCSE sayısı ise 2, 4 ve 8 saatlik uygulama sürelerinde 80 mM'lık konsantrasyonda ve 6 saatlik uygulama süresinde ise 50 mM'lık konsantrasyonda elde edilmiştir (Çizelge 4.8).

b. Embriyogenik kallus sayısına göre cevap veren somatik embriyo (EKSCE) sayısı

EKSCE sayısı üzerine etil metansülfonatin uygulama süresi ve konsantrasyonu ile bu iki faktör arasındaki interaksiyon çok önemli ($P<0.01$) derecede etkilemiştir (Çizelge 4.7).

Ortalamalar bakımından süreleri karşılaştırıldığında, en yüksek EKSCE sayısı 5.99 adete ile 2 saatlik uygulamadan elde edilmiş, bunu azalan sıra ile, 6 saat (5.00 adet), 4 saat (4.01 adet) ve 8 saatlik (3.18 adet) uygulama süreleri izlemiştir (Çizelge 4.8).

Konsantrasyonların ortalamalarına göre en yüksek EKSCCE sayısı 8.25 adet ile kontrol (0 mM'lık) konsantrasyonda tespit edilmiş, bunu 5.81 adet ile 10 mM, 4.08 adet ile 30 mM, 2.62 adet ile 50 mM'lık ve 1.96 adet ile 10 mM'lık konsantrasyonlar izlemiştir (Çizelge 4.8).

EKSCCE sayısı üzerine etil metansülfonatin uygulama süresinin etkisi kullanılan konsantrasyona göre farklılık göstermiştir. Bu nedenle uygulama süresi $\times$ konsantrasyonun etkisi çok önemli ($P<0.01$) olmuştur (Çizelge 4.7). En yüksek EKSCCE sayısı tüm sürelerde kontrol konsantrasyonda elde edilmiştir. En düşük EKSCCE sayısı ise 2, 4, 6 ve 8 saatlik uygulamalarda 80 mM'lık mutagen uygulamasından elde edilmiştir (Çizelge 4.8).

4) Rejenerasyon etkinliği (RE)

Cevap veren somatik embriyolar rejenerasyon ortamına aktarıldıktan 15 gün sonra hormonsuz ortama konulmuşlar ve burada bir ay süreyle tutulmuşlardır. Bu süre içerisinde somatik embriyolarda kök ve sürgün oluşumları gerçekleşmiştir. Rejenerasyon etkinliği cevap veren embriyogenik kallus sayısına göre hesaplanmıştır (Şekil 4.19).

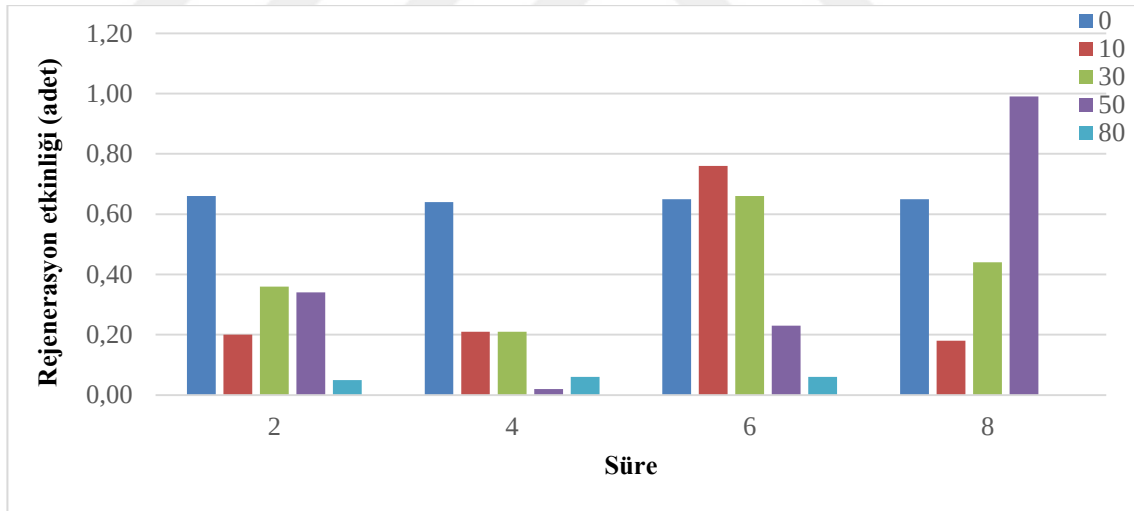
Rejenerasyon etkinliği mutagenin hem uygulama süresinden hem de konsantrasyondan ve bu iki faktör arasındaki interaksiyon da çok önemli ($P<0.01$) derecede etkilenmiştir (Çizelge 4.7).

Uygulama süresine göre ortalama rejenerasyon etkinliği dikkate alındığında, en yüksek rejenerasyon etkinliğinin 0.47 adet ile 6 saatlik uygulamadan elde edildiği, bunu 0.45 adet ile 8 saatlik ve 0.32 adet ile 2 saatlik uygulamaların izlediği görülmüştür (Çizelge 4.8).

Diğer taraftan, ortalamalar esas alınarak konsantrasyonlara göre değerlendirme yapıldığında, en yüksek rejenerasyon etkinliğinin 0.65 adet ile kontrol (0 mM'lık)

konsantrasyondan elde edildiği, bunu 30 mM (0.42 adet), 50 mM (0.40 adet) ve 10 mM'lık (0.34 adet) konsantrasyonların izlediği, 80 mM'lık uygulamanın ise 0.04 adet ile son sırada yer aldığı görülmüştür. Bununla birlikte, 10, 30 ve 50 mM'lık konsantrasyonlar arasındaki farklılıklar istatistiksel anlamda önemsiz olmuştur (Çizelge 4.8).

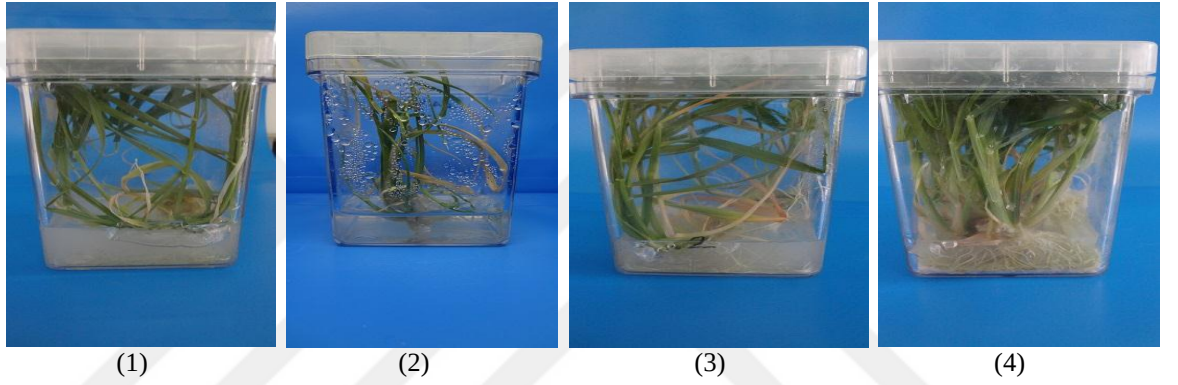
RE üzerine etil metansülfonatin uygulama süresinin etkisi kullanılan konsantrasyona göre farklılık göstermiştir. Bu nedenle uygulama süresi $\times$ konsantrasyonun etkisi çok önemli ($P<0.01$) olmuştur (Çizelge 4.7). En yüksek RE, 2 ve 4 saatlik uygulama sürelerinde kontrol konsantrasyonda, 6 saatlik uygulamada 10 mM'lık konsantrasyonda; 8 saatlik uygulamada ise 50 mM'lık konsantrasyondan elde edilmiştir. En düşük RE ise 2, 6 ve 8 saatlik uygulama sürelerinde 80 mM'lık konsantrasyonda; 4 saatlik uygulama süresinde ise 50 mM'lık konsantrasyondan edilmiştir (Çizelge 4.8 ve Şekil 4.20).



Şekil 4.20. Kallusa farklı süre ve dozlarda EMS uygulamasının rejenerasyon etkinliği üzerine etkileri.

5) Bitki sayısı (BS)

Kök ve sürgün oluşturan somatik embriyolar 30 gün boyunca hormonsuz ortam içeren magenda kutularında tutularak gelişmeye bırakılmışlardır (Şekil 4.21). Rejenere bitkilerin farklı ortamlarda görünüşleri; bitkilerin saksılara aktarılması ve aklimasyona alınması, bitkilerin aklimasyon sonrası görünüşleri, bitkilerin saksılarda görünüşleri ve toprağa aktarılmış bitkilerin görünüşleri şekil 4.22’de gösterilmiştir.



Şekil 4.21. EMS’nin bazı süre ve konsantrasyonlarında meydana gelen bitkiciklerin magendada görünüşleri.



(a)



(b)



(c)



(d)

Şekil 4.22. Rejenere bitkilerin farklı ortamlarda görünüşleri.

a) bitkilerin saksılara aktarılması ve aklımasyona alınması, b) bitkilerin aklımasyon sonrası görünüşleri, c) bitkilerin saksılarda görünüşleri, d) toprağa aktarılmış bitkilerin görünüşleri.

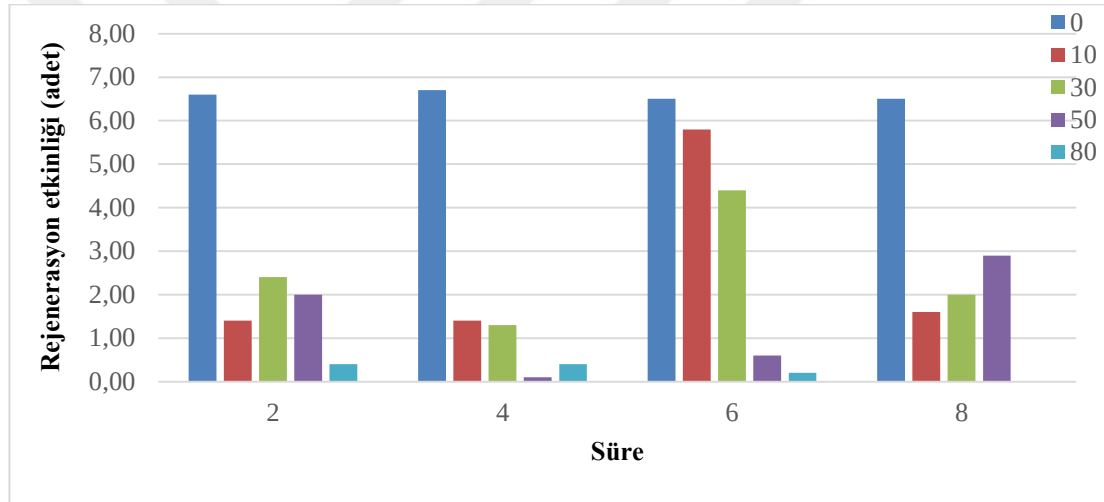
Rejenerasyon etkinliği üzerine mutagenin uygulama süresi ve konsantrasyonu ile bu iki faktör arasındaki interaksiyon çok önemli ($P < 0.01$) derecede etki oluşturmuştur (Çizelge 4.7).

Ortalamalar esas alınarak uygulama süresine göre değerlendirildiğinde en yüksek bitki sayısı 3.50 adet ile 6 saatlik uygulamadan elde edilmiş, bunu 2.60 adet ile 8 saat, 2.56 adet ile 2 saat ve 1.98 adet ile 4 saatlik uygulamalar izlemiştir. Bununla birlikte 2, 4 ve 8 saatlik uygulamalar arasındaki farklılıklar istatistiksel anlamda önemsiz olmuştur (Çizelge 4.8).

Ortalamalar dikkate alınarak konsantrasyonlara göre değerlendirildiğinde, en yüksek bitki sayısını 6.57 adet ile kontrolden (0 mM'lık) elde edildiği, bunu 10 mM (2.55 adet), 30

mM (2.52 adet), 50 mM (1.40) ve 80 mM'lık (0.25) konsantrasyonların izlediği görülmüştür (Çizelge 4.8).

BS üzerine etil metansülfonatın uygulama süresinin etkisi kullanılan konsantrasyona göre farklılık göstermiştir. Bu nedenle uygulama süresi $\times$ konsantrasyonun etkisi çok önemli ($P < 0.01$) olmuştur (Çizelge 4.7). En yüksek BS, tüm sürelerde kontrol konsantrasyondan elde edilmiştir. En düşük BS ise 2, 6 ve 8 saatlik uygulama sürelerinde 80 mM'lık konsantrasyonda; 4 saatlik uygulama süresinde ise 50 mM'lık konsantrasyondan elde edilmiştir (Çizelge 4.8 ve Şekil 4.23).



Şekil 4.23. Kallusa farklı süre ve dozlarda EMS uygulamasının bitki sayısı üzerine etkileri.

6) Optimum dozun (LD_{50}) tespit edilmesi

Kimyasal mutagenlerin optimum konsantrasyonunun ve uygulama süresinin belirlenmesinde LD_{50} (letal doz) kriteri esas alınmıştır. Daha önce belirtildiği gibi LD_{50} değerinin tespit edilmesinde rejenerasyon etkinliği ve bitki sayısı esas alınmıştır. Buna göre rejenerasyon etkinliği için LD_{50} değeri 50 mM'lık konsantrasyonun 2 saat süreyle uygulanmasından, bitki sayısı için ise 50 mM'lık konsantrasyonun 8 saat süre ile uygulanmasından elde edilmiştir (Çizelge 4.8 ve Şekil 4.20 ve Şekil 4.23).

7) Kallusa EMS uygulamasından sonra incelenen doku kültürü karakterler arasındaki korelasyonlar

İncelenen karakterler arasındaki ilişkiler Çizelge 4.9'da verilmiştir. İncelenen karakterlerden ESEKO oranı ile ESCEK ($r=0.93$), ESCSE (0.85), EKSCE (0.72) ve BS (0.66) oranları; ESCEK oranı ile ESCSE ($r=0.87$) ve EKSCE ($r=0.76$) sayıları; ESCSE sayısı ile EKSCE ($r=0.96$) ve BS (0.70) ve RE ile BS ($r=0.82$) arasındaki ilişkiler olumlu ve çok önemli olmuştur. Ayrıca, ESCEK sayısı ile EKSCEK ($r=0.55$), BS ($r=0.60$) ve EKSCE sayısı ile BS ($r=0.59$) arasındaki ilişkilerin olumlu ve önemli olduğu tespit edilmiştir.



Çizelge 4.9. Kallusa farklı süre ve dozlarda EMS uygulamasından sonra *in vitro* ortamda incelenen bazı karakterlere ait korelasyon katsayıları.

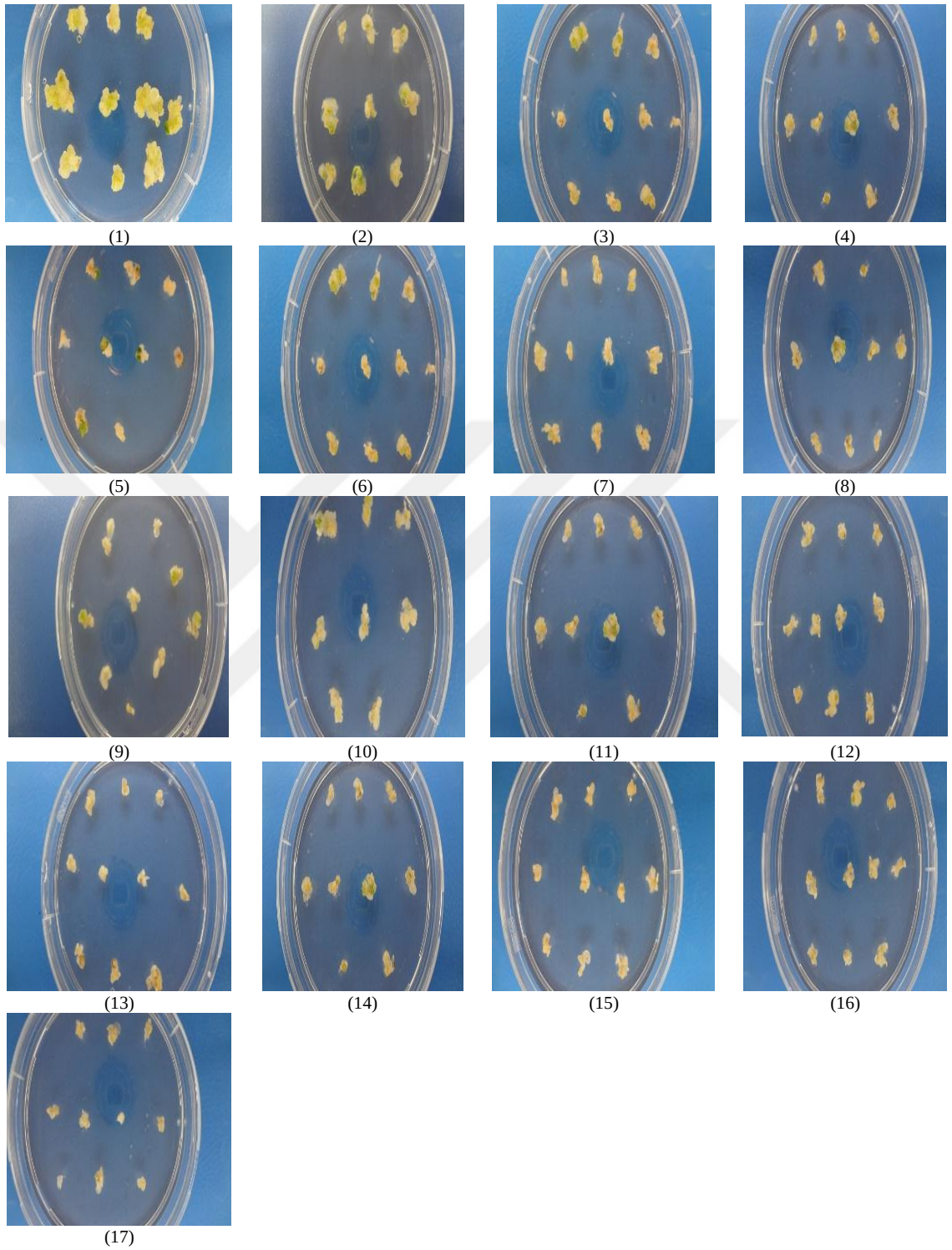
	ESEKO (%)	ESCEK (%)	EKSCEK (%)	ESCSE (adet)	EKSCE (adet)	RE (adet)	BS (adet)
ESEKO	1						
ESCEK	0.93**	1					
EKSCEK	0.23	0.55*	1				
ESCSE	0.85**	0.84**	0.34	1			
EKSCE	0.72**	0.76**	0.46	0.96**	1		
RE	0.34	0.25	-0.06	0.34	0.25	1	
BS	0.66**	0.60*	0.13	0.70**	0.59*	0.82**	1

*, p<0.05; **: p<0.01 düzeyinde önemlidir.

4.1.2.b. Kallusa sodyum azitin (NaN_3) etkileri

1) Embriyogenik kallus oluşum oranı

Sert dokulu, dağılabilir özellikte, sıkı yapılı ve krem renkli kalluslar embriyogenik kallus, beyaz ve sulu yapılı kalluslar ise embriyogenik olmayan kallus olarak değerlendirilmiştir. Embriyogenik kallus oluşum oranı kültüre alınan eksplant sayısına göre değerlendirilmiştir. Kalluslar hormonsuz ortama konulduktan yaklaşık 15-20 gün sonra embriyogenik kalluslar oluşmaya başlamıştır. Embriyogenik kallusların büyüklüğü sodyum azitin hem uygulama süresine hem de konsantrasyonuna göre farklılık göstermiştir. Örneğin, 1 saatlik uygulama süresinde embriyogenik kallusların boyutu 1 ve 2 mM'lık konsantrasyonda en büyük olmuş, bunu azalan sıra ile 3 ve 4 mM'lık konsantrasyonlar izlemiştir. Diğer taraftan, 2, 3 ve 4 saatlik uygulama sürelerinde embriyogenik kallusların boyutu 1 mM'lık konsantrasyonda en büyük olmuş bunu azalan sıra ile 2, 3 ve 4 mM'lık konsantrasyonlar izlemiştir (şekil 4.24). Embriyogenik kalluslar 15 gün boyunca bu ortamda tutularak gelişmeleri sağlanmıştır.



Şekil 4.24. Sodyum azitin farklı süre ve konsantrasyonlarında meydana gelen embriyogenik kallusların görünümümüleri.

(1) kontrol, (2) 1 saat + 1 mM, (3) 1 saat + 2 mM, (4) 1 saat + 3 mM, (5) 1 saat + 4 mM, (6) 2 saat + 1 mM, (7) 2 saat + 2 mM, (8) 2 saat + 3 mM, (9) 2 saat + 4 mM, (10) 3 saat + 1 mM, (11) 3 saat + 2 mM, (12) 3 saat + 3 mM, (13) 3 saat + 4 mM, (14) 4 saat + 1 mM, (15) 4 saat + 2 mM, (16) 4 saat + 3 mM ve (17) 4 saat + 4 mM konsantrasyonlarda meydana gelen embriyogenik kallusların görünümümüleri.

a. Eksplant sayısına göre embriyogenik kallus oluşum (ESEKO) oranı

ESEKO oranı üzerine mutagenin uygulama süresi ve konsantrasyonu ile bu iki faktör arasındaki interaksyon çok önemli ($P<0.01$) olmuştur (Çizelge 4.10).

Ortalamalar esas alınarak sürelerle göre değerlendirildiğinde, uygulama süresi uzadıkça ESEKO azalmış ve en yüksek ESEKO oranı (%88.40) 1 saatlik uygulamadan elde edilmiş, bunu azalan sıra ile 2 saat (%70.80), 3 saat (%61.80) ve 4 saatlik (%43.00) uygulama süreleri izlemiştir (Çizelge 4.11).

Ortalamalar esas alınarak konsantrasyonlara göre değerlendirildiğinde, en yüksek ESEKO oranının kontrolde (%98.50), en düşük ise 1 mM'lık konsantrasyonda (%44.00) gerçekteştiği tespit edilmiştir. Ayrıca, ESEKO oranı 1 mM'lık konsantrasyonda %77.00, 2 mM'lık konsantrasyonda %61.75 ve 3 mM'lık konsantrasyonda %48.75 olarak gerçekteşmiştir (Çizelge 4.11).

ESEKO oranı üzerine sodyum azitin uygulama süresinin etkisi kullanılan konsantrasyona göre farklılık göstermiştir. Bu nedenle uygulama süresi $\times$ konsantrasyonun etkisi çok önemli ($P<0.01$) olmuştur (Çizelge 4.10). En yüksek ESEKO oranı tüm sürelerde kontrol konsantrasyondan elde edilmiştir. En düşük ESEKO oranı ise 1 ve 3 saatlik uygulamalarda 4 mM'lık konsantrasyonda; 2 saatlik uygulamada 3 mM'lık konsantrasyonda ve 4 saatlik uygulamalarda ise 3 ve 4 mM'lık konsantrasyonda elde edilmiştir (Çizelge 4.11).

Çizelge 4.10. Kallusa farklı süre ve dozlarda sodyum azit uygulamasından sonra *in vitro* ortamda incelenen bazı karakterlere ait varyans analizi sonuçları.

Varyasyon Kaynağı	Kareler ortalaması							
	SD	ESEKO	ESCEK	EKSCEK	ESCSE	EKSCE	RE	BS
Süre (saat)	3	17857.33**	29591.33**	36878.02**	5.16**	8.74**	0.28**	20.46**
Konsantrasyon (%)	4	19768.75**	36545.75**	19459.55**	483.76**	459.69**	2.39**	278.91**
Süre × Konsantrasyon	12	1921.08**	2780.08**	3509.79**	0.78	0.89	0.05**	4.09**
Hata	180	81.667	78.89	193.31	0.9	0.95	0.02	0.849
Toplam	200							

*, $p<0.05$; **, $p<0.01$ düzeyinde önemlidir.

Çizelge 4.11. Kallusa farklı süre ve dozlarda sodyum azit uygulamasından sonra *in vitro* ortamda incelenen bazı karakterlere ait veriler.

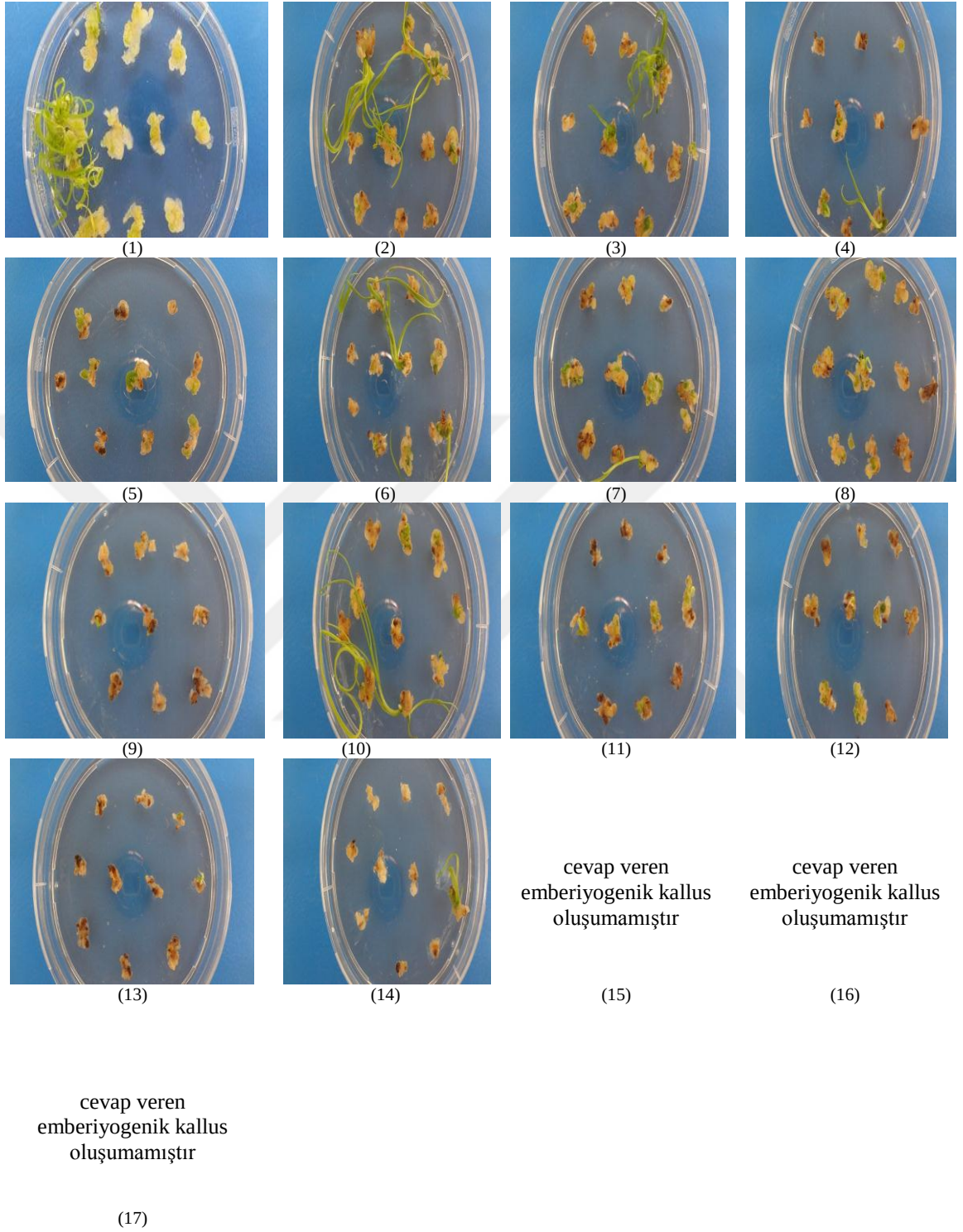
Süre (saat)	Konsantrasyon (mM)	ESEKO (%)	ESCEK (%)	EKSCEK (%)	ESCSE (adet)	EKSCE (adet)	RE (adet)	BS (adet)
1	0	100.00 ^{a2}	100.00 ^a	100.00 ^a	8.33	8.33	0.66 ^a	6.60 ^a
	1	94.00 ^a	90.00 ^b	95.77 ^b	1.58	1.69	0.41 ^b	3.80 ^b
	2	94.00 ^a	85.00 ^b	90.57 ^c	0.86	0.92	0.16 ^c	1.40 ^c
	3	84.00 ^b	76.00 ^c	90.19 ^c	0.74	0.90	0.10 ^c	1.30 ^c
	4	70.00 ^c	61.00 ^d	87.20 ^c	0.39	0.56	0.21 ^c	0.90 ^c
	Ortalama	88.40 ^{A1}	82.40 ^A	92.75 ^A	2.38 ^A	2.47 ^A	0.31 ^A	2.80 ^A
2	0	98.00 ^a	98.00 ^a	98.00 ^a	8.32	8.32	0.64 ^a	6.70 ^a
	1	92.00 ^a	82.00 ^b	89.02 ^b	1.18	1.29	0.19 ^b	1.60 ^b
	2	71.00 ^b	61.00 ^c	85.42 ^b	0.71	1.00	0.19 ^b	1.30 ^b
	3	46.00 ^c	25.00 ^d	55.00 ^c	0.25	0.55	0.05 ^b	0.10 ^c
	4	47.00 ^c	16.00 ^e	34.00 ^d	0.03	0.07	0.05 ^b	0.10 ^c
	Ortalama	70.80 ^B	56.40 ^B	72.28 ^B	2.09 ^A	2.24 ^A	0.22 ^B	1.96 ^B
3	0	98.00 ^a	98.00 ^a	98.00 ^a	8.28	8.28	0.65 ^a	6.50 ^a
	1	87.00 ^b	70.00 ^b	80.70 ^{ab}	1.55	1.77	0.13 ^b	0.80 ^b
	2	54.00 ^c	44.00 ^c	81.41 ^{ab}	0.49	0.92	0.07 ^b	0.40 ^b
	3	38.00 ^d	22.00 ^d	62.66 ^{bc}	0.36	1.01	0.06 ^b	0.20 ^b
	4	32.00 ^d	14.00 ^d	48.33 ^c	0.18	0.67	0.13 ^b	0.40 ^b
	Ortalama	61.80 ^C	49.60 ^C	74.22 ^B	2.17 ^A	2.53 ^A	0.21 ^B	1.66 ^{BC}
4	0	98.00 ^a	98.00 ^a	98.00 ^a	8.10	8.10	0.65 ^a	6.50 ^a
	1	35.00 ^b	18.00 ^b	45.33 ^b	0.00	0.00	0.00 ^b	0.00 ^b
	2	28.00 ^b	0.00 ^c	0.00 ^c	0.00	0.00	0.00 ^b	0.00 ^b
	3	27.00 ^b	0.00 ^c	0.00 ^c	0.00	0.00	0.00 ^b	0.00 ^b
	4	27.00 ^b	0.00 ^c	0.00 ^c	0.00	0.00	0.00 ^b	0.00 ^b
	Ortalama	43.00 ^D	23.20 ^D	28.66 ^C	1.62 ^C	1.62 ^B	0.13 ^C	1.30 ^C
Ortalama	0	98.50 ^A	98.50 ^A	98.50 ^A	8.25 ^A	8.25 ^A	0.65 ^A	6.57 ^A
Konsantrasyon (mM)	1	77.00 ^B	65.00 ^B	77.71 ^B	1.07 ^B	1.18 ^B	0.18 ^B	1.55 ^B
	2	61.75 ^C	47.50 ^C	64.35 ^C	0.51 ^C	0.71 ^C	0.10 ^C	0.77 ^C
	3	48.75 ^D	30.75 ^D	51.96 ^D	0.33 ^C	0.61 ^C	0.05 ^C	0.40 ^C
	4	44.00 ^E	22.75 ^E	42.38 ^E	0.15 ^C	0.32 ^C	0.09 ^C	0.35 ^C
LD₅₀ değeri		49.25	49.25	49.25	49.25	49.25	0.32	3.28

1: Aynı sütunda aynı büyük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemsizdir.

2: Her bir uygulama süresi için aynı sütunda aynı küçük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemsizdir.

2) Cevap veren embriyogenik kallus oranı

Kök ve sürgüne sahip bitkicik meydana getiren embriyogenik kalluslar cevap veren embriyogenik kallus olarak değerlendirilmiştir. Cevap veren embriyogenik kallus oranı eksplant sayısına ve embriyogenik kallus sayısına göre iki şekilde değerlendirilmiştir. Embriyogenik kalluslar hormonsuz ortama konulduktan yaklaşık 12-14 gün sonra cevap veren embriyogenik kalluslar oluşmaya başlamıştır. Cevap veren embriyogenik kallusların büyüklüğü sodyum azitin hem uygulama süresine hem de konsantrasyonuna göre farklılık göstermiştir. Nitekim, 1, 2 ve 3 saatlik uygulama sürelerinde cevap veren embriyogenik kallusların boyutu 1 mM'lık konsantrasyonda en büyük olmuş, bunu azalan sıra ile 2, 3 ve 4 mM'lık konsantrasyonlar izlemiştir. Diğer taraftan, 4 saatlik uygulama süresinde cevap veren embriyogenik kallusların boyutu 1 mM'lık konsantrasyonda en büyük olmuştur (Şekil 4.25). Cevap veren embriyogenik kalluslar 15 gün boyunca bu ortamda tutularak gelişmeleri sağlanmıştır.



Şekil 4.25. Sodyum azitin farklı süre ve konsantrasyonlarında meydana gelen cevap veren embriyogenik kallusların görünüşleri.

(1) kontrol, (2) 1 saat + 1 mM, (3) 1 saat + 2 mM, (4) 1 saat + 3 mM, (5) 1 saat + 4 mM, (6) 2 saat + 1 mM, (7) 2 saat + 2 mM, (8) 2 saat + 3 mM, (9) 2 saat + 4 mM, (10) 3 saat + 1 mM, (11) 3 saat + 2 mM, (12) 3 saat + 3 mM, (13) 3 saat + 4 mM, (14) 4 saat + 1 mM, (15) 4 saat + 2 mM, (16) 4 saat + 3 mM ve (17) 4 saat + 4 mM konsantrasyonlarda cevap veren embriyogenik kallusların görünüşleri.

a. Eksplant sayısına göre cevap veren embriyogenik kallus (ESCEK) oranı

ESCEK oranı üzerine sodyum azitin uygulama süresi ve konsantrasyonu ile bu iki faktör arasındaki interaksiyon çok önemli ($P<0.01$) olmuştur (Çizelge 4.10).

Ortalamalar esas alınarak süreler göre değerlendirildiğinde, eksplant sayısına göre embriyogenik kallus oranı 1 saatlik uygulamada %82.40 olmuş ve bunu azalan sıra ile 2 saat (%56.40), 3 saat (%49.60) ve 4 saatlik (%23.20) uygulama süreleri izlemiştir (Çizelge 4.11).

Ortalamalar bakımından konsantrasyonlar karşılaştırıldığında, en yüksek ESCEK oranı kontrolde (%98.50), en düşük ise (%22.75) 4 mM'lık konsantrasyonda elde edilmiştir. Diğer taraftan, ESCEK 1 mM'lık konsantrasyonda %65.00, 2 mM'lık konsantrasyonda %47.50 ve 3 mM'lık konsantrasyonda %30.75 oranında olmuştur (Çizelge 4.11).

ESCEK oranı üzerine sodyum azitin uygulama süresinin etkisi kullanılan konsantrasyona göre farklılık göstermiştir. Bu nedenle uygulama süresi $\times$ konsantrasyonun etkisi çok önemli ($P<0.01$) olmuştur (Çizelge 4.10). En yüksek ESCEK oranı ESEKO oranı gibi tüm sürelerde kontrol konsantrasyondan elde edilmiştir. En düşük ESCEK oranı ise 1, 2 ve 3 saatlik uygulamalarda 4 mM'lık konsantrasyonda, 4 saatlik uygulamada 2, 3 ve 4 mM'lık konsantrasyondan elde edilmiştir (Çizelge 4.11).

b. Embriyogenik kallus sayısına göre cevap veren embriyogenik kallus (EKSCEK) oranı

EKSCEK oranı üzerine mutagenin hem uygulama süresi ve konsantrasyonu ile hem de bu iki faktör arasındaki interaksiyon çok önemli ($P<0.01$) olmuştur (Çizelge 4.10).

Ortalamalar esas alınarak süreler göre değerlendirildiğinde, 1 saatlik uygulamada %92.75 olan EKSCEK oranı, 2 saatlik uygulamada %72.28'e, 3 saatlik uygulamada

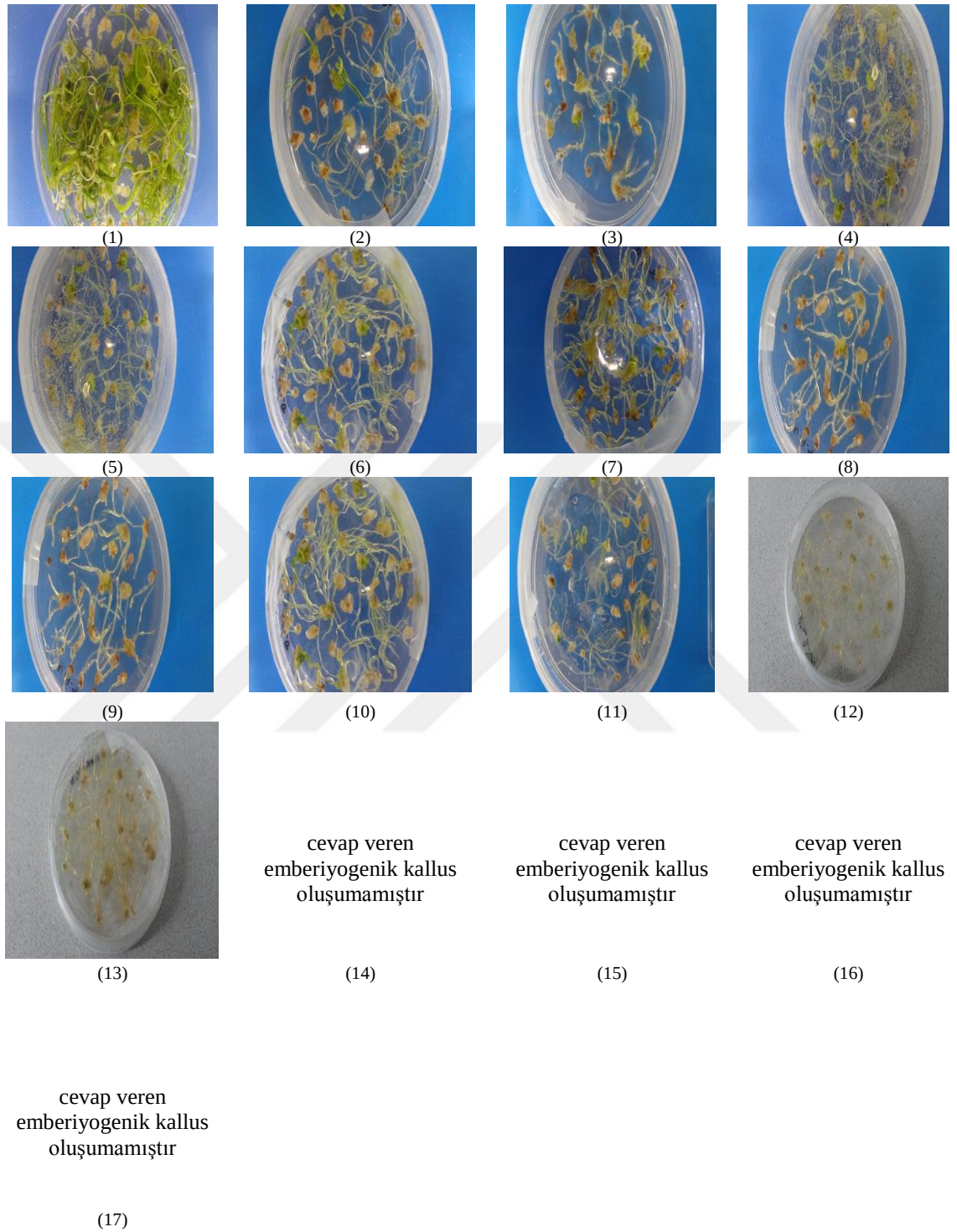
%74.22'ye ve 4 saatlik uygulamada %28.66'ya düşmüş, ancak 2 ve 3 saatlik uygulama süreleri arasındaki farklılıklar önemsiz olmuştur (Çizelge 4.11).

Ortalamlar dikkate alınarak konsantrasyonlara göre değerlendirme yapıldığında, en yüksek EKSCEK oranının kontrolde (%98.50), en düşük ise (%42.38) 4 mM'lık konsantrasyonda gerçekleştiği tespit edilmiştir. Diğer taraftan, EKSCEK oranı 1 mM'lık konsantrasyonda %77.71, 2 mM'lık konsantrasyonda %64.35 ve 3 mM'lık konsantrasyonda %51.96 olmuştur (Çizelge 4.11).

EKSCEK oranı üzerine sodyum azitin uygulama süresinin etkisi kullanılan konsantrasyona göre farklılık göstermiştir. Bu nedenle uygulama süresi $\times$ konsantrasyonun etkisi çok önemli ($P<0.01$) olmuştur (Çizelge 4.10). En yüksek EKSCEK oranı ESEKO ve ESCEK oranları gibi tüm sürelerde kontrol konsantrasyondan elde edilmiştir. En düşük EKSCEK oranı ise 1, 2 ve 3 saatlik uygulamalarda 4 mM'lık konsantrasyonda ve 4 saatlik uygulamada 2, 3 ve 4 mM'lık konsantrasyondan elde edilmiştir (Çizelge 4.11).

3) Cevap veren somatik embriyo sayısı

Cevap veren somatik embriyo sayısı, eksplant sayısına ve embriyogenik kallus sayısına göre olmak üzere iki şekilde değerlendirilmiştir. Embriyogenik kalluslar hormonsuz ortama konulduktan yaklaşık 2-3 gün sonra cevap veren somatik embriyolar daha net bir şekilde görülmeye başlamıştır. Cevap veren somatik embriyoların büyüklüğü sodyum azitin hem uygulama süresine hem de konsantrasyonuna göre farklılık göstermiştir. Nitekim, 1, 2 ve saatlik uygulama sürelerinde cevap veren somatik embriyoların boyutu 1 mM'lık konsantrasyonda en büyük olmuş bunu azalan sıra ile 2, 3 ve 4 mM'lık konsantrasyonlar izlemiştir. Diğer taraftan, 4 saatlik uygulama süresinde cevap veren somatik embriyoların boyutu 1 mM'lık konsantrasyonda en büyük olmuş, ancak diğer konsantrasyonlarda cevap veren somatik embriyolar oluşmamıştır (Şekil 4.26). Cevap veren somatik embriyolar 15 gün boyunca hormonsuz ortamda tutulduktan sonra rejenerasyon ortamına aktarılmış ve gelişmeleri sağlanmıştır.



Şekil 4.26. Sodyum azitin farklı süre ve konsantrasyonlarında meydana gelen cevap veren embriyogenik kallusların görünüşleri.

(1) kontrol, (2) 1 saat + 1 mM, (3) 1 saat + 2 mM, (4) 1 saat + 3 mM, (5) 1 saat + 4 mM, (6) 2 saat + 1 mM, (7) 2 saat + 2 mM, (8) 2 saat + 3 mM, (9) 2 saat + 4 mM, (10) 3 saat + 1 mM, (11) 3 saat + 2 mM, (12) 3 saat + 3 mM, (13) 3 saat + 4 mM, (14) 4 saat + 1 mM, (15) 4 saat + 2 mM, (16) 4 saat + 3 mM ve (17) 4 saat + 4 mM konsantrasyonlarda cevap veren somatik embriyoların (ok işareti ile gösterilmiştir) ve rejener bitkilerin görünüşleri.

a. Eksplant sayısına göre cevap veren somatik embriyo (ESCSE) sayısı

ESCSE sayısı üzerine sodyum azitin uygulama süresi ve konsantrasyonunun etkisi çok önemli ($P<0.01$) olmasına karşın, bu iki faktör arasındaki interaksiyon önemsiz olmuştur (Çizelge 4.10).

Ortalama eksplant sayısına göre cevap veren somatik embriyo sayısı 1 saatlik uygulamadan (2.38 adet) elde edilmiş, bunu azalan sıra ile 1 saat (2.09 adet), 3 saat (2.17 adet) ve 4 saatlik (1.62 adet) uygulama süreleri izlemiştir (Çizelge 4.11).

Konsantrasyonların kendi içerisindeki ortalamaları esas alındığında, ESCSE sayısı bakımından ilk sırada 8.25 adet ile kontrol grubun yer aldığı, bunu 1.07 adet ile 1 mM ve 0.51 adet ile 2 mM, 0.33 adet ile 3 mM'lık konsantrasyonların izlediği, bu karakter bakımından son sırada 4 mM'lık konsantrasyonun (0.15 adet) bulunduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.11).

b. Embriyogenik kallus sayısına göre cevap veren somatik embriyo (EKSCE) sayısı

Sodyum azitin uygulama süresi ve konsantrasyonu EKSCE sayısını çok önemli ($P<0.01$) derecede etkilemiş, buna karşın iki faktör arasındaki interaksiyon önemsiz olmuştur (Çizelge 4.10).

Ortalamalar esas alınarak sürelere göre değerlendirildiğinde, en yüksek EKSCE sayısı 2.47 adet ile 1 saatlik uygulamadan elde edilmiş, bunu azalan sıra ile 3 saat (2.53 adet), 2 saat (2.24 adet) ve 4 saatlik (1.62 adet) uygulama süreleri izlemiştir (Çizelge 4.11).

Konsantrasyonların ortalamalarına göre en yüksek EKSCE sayısının kontrolde (8.25), en düşük ise 4 mM'lık konsantrasyonda (0.32 adet) gerçekleştiği belirlenmiş, bunu 1.18 adet ile 1 mM'lık konsantrasyon, 0.71 adet ile 2 mM'lık konsantrasyon ve 0.61 adet ile 3 mM'lık konsantrasyon izlemiştir (Çizelge 4.11).

4) Rejenerasyon etkinliği (RE)

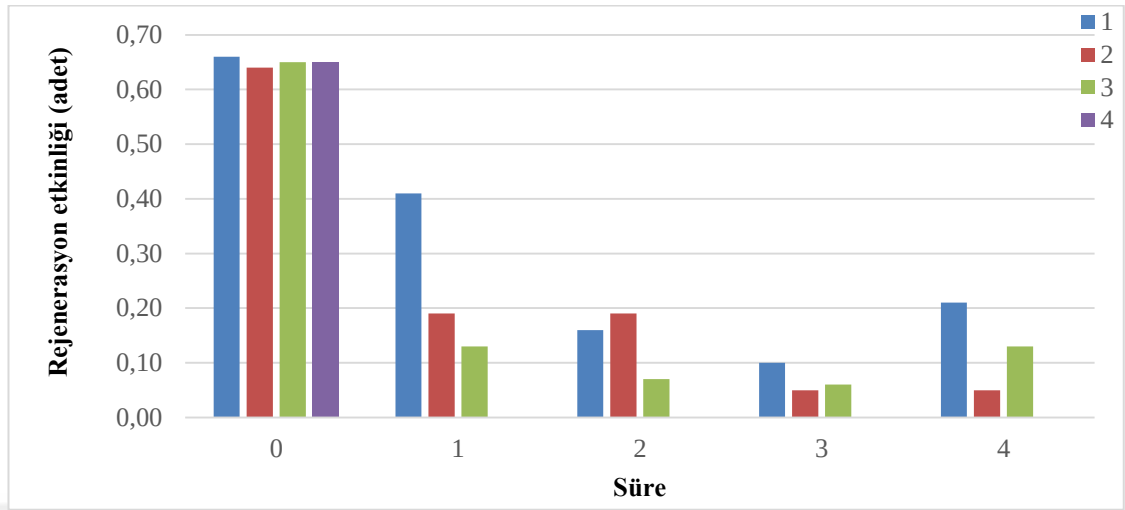
Cevap veren somatik embriyolar rejenerasyon ortamına aktarıldıktan 15 gün sonra hormonsuz ortama konulmuşlar ve burada bir ay süreyle tutulmuşlardır. Bu süre içerisinde somatik embriyolarda kök ve sürgün oluşumları gerçekleşmiştir (Şekil 4.26).

RE üzerine sodyum azitin uygulama süresi süresi ve konsantrasyonu ile hem de bu iki faktör arasındaki interaksiyon çok önemli ($P<0.01$) olmuştur (Çizelge 4.10).

Uygulama süresine göre ortalama rejenerasyon etkinliği dikkate alındığında, en yüksek rejenerasyon etkinliğinin 0.31 adet ile 1 saatlik uygulamadan elde edildiği, bunu 0.22 adet ile 2 saatlik, 0.21 adet ile 3 saatlik ve 0.13 adet ile 4 saatlik uygulamaların izlediği görülmüştür (Çizelge 4.11).

Diğer taraftan, ortalamalar esas alınarak konsantrasyonlara göre değerlendirme yapıldığında, en yüksek rejenerasyon etkinliğinin 0.65 adet ile kontrolden (0 mM) elde edildiği, bunu 1 mM (0.18 adet), 2 mM (0.10 adet), 4 mM (0.09 adet) ve 3 mM'lık (0.05) konsantrasyonların izlediği görülmüştür. Bununla birlikte 2, 3 ve 4 mM'lık konsantrasyonlar arasındaki farklılıklar önemsiz olup, istatistiksel olarak aynı grupta yer almışlardır (Çizelge 4.11).

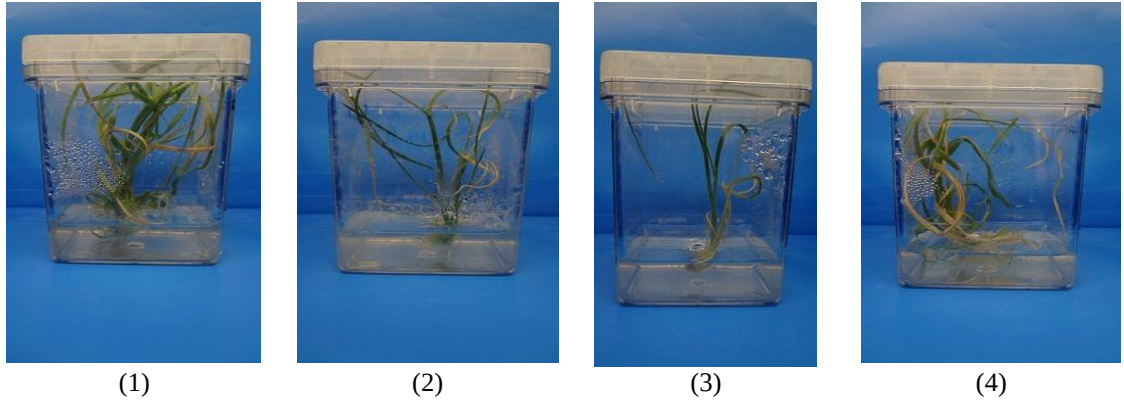
RE üzerine sodyum azitin uygulama süresinin etkisi kullanılan konsantrasyona göre farklılık göstermiştir. Bu nedenle uygulama süresi $\times$ konsantrasyonun etkisi çok önemli ($P<0.01$) olmuştur (Çizelge 4.10). En yüksek RE tüm sürelerde kontrol konsantrasyondan elde edilmiştir. En düşük RE ise 1 ve 3 saatlik uygulamalarda 3 mM'lık konsantrasyonda; 2 saatlik uygulama süresi ise 3 ve 4 mM'lık konsantrasyonda; 4 saatlik uygulamada 1, 2, 3 ve 4 mM'lık konsantrasyonda elde edilmiştir (Çizelge 4.11 ve Şekil 4.27).



Şekil 4.27. Kallusa farklı süre ve dozlarda sodyum azit uygulamasının bitki sayısı üzerine etkileri.

5) Bitki sayısı (BS)

Kök ve sürgün oluşturan somatik embriyolar 30 gün boyunca hormonsuz ortam içeren magenda kutularında tutularak gelişmeye bırakılmışlardır (Şekil 4.28). Rejenere bitkilerin farklı ortamlarda görünümeleri; bitkilerin saksılara aktarılması ve aklımasyona alınması, bitkilerin aklımasyon sonrası görünümüler, bitkilerin saksılarda görünümeleri ve toprağa aktarılmış bitkilerin görünümeleri Şekil 4.29’da gösterilmiştir.



Şekil 4.28. Sodyum azitin bazı süre ve konsantrasyonlarında meydana gelen bitkiciklerin magendada görünüşleri.



(a)



(b)



(c)



(d)

Şekil 4.29. Rejenere bitkilerin farklı ortamlarda görünüşleri.

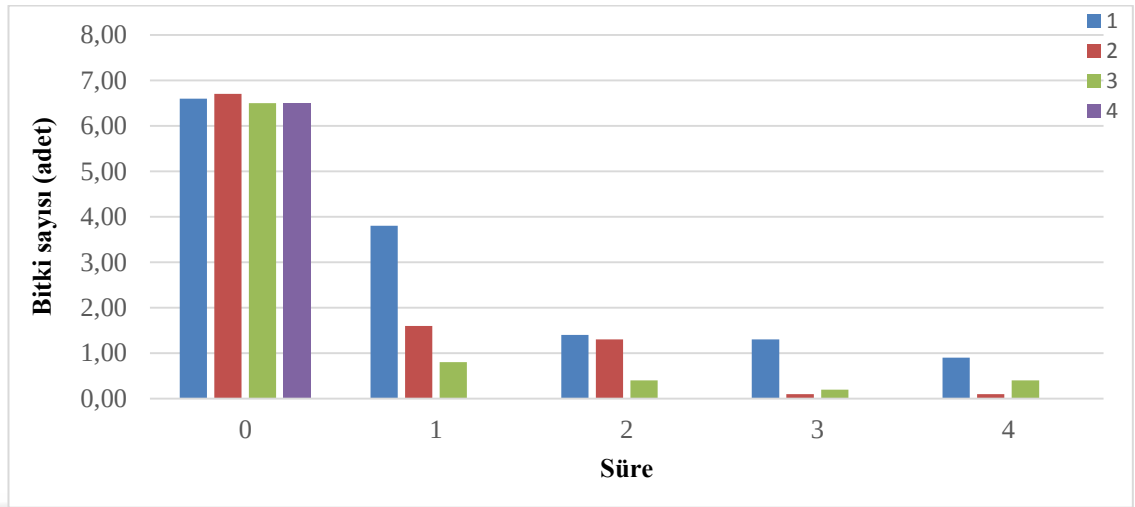
a) bitkilerin saksılara aktarılması ve aklamasyona alınması, b) bitkilerin aklamasyon sonrası görünüşleri, c) bitkilerin saksılarda görünüşleri, d) toprağa aktarılmış bitkilerin görünüşleri.

Bitki sayısı üzerine sodyum azitin uygulama süresi ve konsantrasyonu ile bu iki faktör arasındaki interaksiyon çok önemli ($P < 0.01$) olmuştur (Çizelge 4.10).

Uygulama süresine göre ortalama bitki sayısı dikkate alındığında, en yüksek bitki sayısı 2.80 adet ile 1 saatlik uygulamadan elde edilmiş, bunu azalan sıra ile 2 saat (1.96 adet), 3 saat (1.66 adet) ve 4 saatlik (1.30 adet) uygulama süreleri izlemiştir (Çizelge 4.11).

Ortalamalar dikkate alınarak konsantrasyonlara göre değerlendirme yapıldığında, en yüksek bitki sayısının 6.57 adet ile kontrolden (0 mM) elde edildiği, buna 1 mM (1.55 adet), 2 mM (0.77 adet), 3 mM (0.40 adet) ve 4 mM'lık (0.35) konsantrasyonların izlediği görülmüştür. Bununla birlikte 2, 3 ve 4 mM'lık konsantrasyonlar arasındaki farklılıklar önemsiz olmuştur (Çizelge 4.11).

BS üzerine sodyum azitin uygulama süresinin etkisi kullanılan konsantrasyona göre farklılık göstermiştir. Bu nedenle uygulama süresi $\times$ konsantrasyonun etkisi çok önemli ($P<0.01$) olmuştur (Çizelge 4.10). En yüksek BS, RE gibi tüm sürelerde kontrol uygulamasında elde edilmiştir. En düşük BS ise 1 saatlik uygulama süresinde 4 mM'lık konsantrasyonda; 3 saatlik uygulama süresinde 3 mM'lık konsantrasyonda; 2 saatlik uygulama süresi ise 3 ve 4 mM'lık konsantrasyonda; 4 saatlik uygulamada 1, 2, 3 ve 4 mM'lık konsantrasyonda elde edilmiştir (Çizelge 4.11 ve Şekil 30).



Şekil 4.23. Kallusa farklı süre ve dozlarda sodyum azit uygulamasının bitki sayısı üzerine etkileri.

6) Optimum dozun (LD₅₀) tespit edilmesi

Mutagenlerin kallusa uygulanması durumunda optimum konsantrasyonu ve uygulama süresinin belirlenmesinde LD₅₀ (letal doz) kriteri esas alınmıştır. LD₅₀ değerinin belirlenmesinde rejenerasyon etkinliği ve bitki sayısı esas alınmıştır. Buna göre, hem rejenerasyon etkinliği hem de bitki sayısı için LD₅₀ değeri aynı uygulamadan elde edilmiş olup, bu sodyum azitin 1 mM'lık konsantrasyonunun 1 saat süre ile muamele edildiği uygulamadır (Çizelge 4.11 ve Şekil 27 ve Şekil 30).

7) Kallusa sodyum azit uygulamasından sonra incelenen doku kültürü karakterler arasındaki korelasyonlar

İncelenen karakterler arasındaki ilişkiler Çizelge 4.12'de verilmiştir. İncelenen karakterlerden, ESEKO oranı ile ESCEK ($r=0.95$), EKSCEK ($r=0.75$), ESCSE ($r=0.52$), EKSCE ($r=0.50$), RE ($r=0.55$) ve BS ($r=0.064$); ESCEK oranı ile EKSCEK ($r=0.87$), ESCSE ($r=0.56$), EKSCE ($r=0.56$), RE ($r=0.59$) ve BS ($r=0.50$); ESCSE sayısı ile EKSCE ($r=0.99$), RE ($r=0.66$) ve BS ($r=0.81$); EKSCE sayısı ile RE ($r=0.64$) ve BS ($r=0.79$); RE ile BS ($r=0.84$) arasındaki ilişkiler de olumlu ve çok önemli olmuştur.

Çizelge 4.12. Kallusa farklı süre ve dozlarda sodyum azit uygulamasından sonra *in vitro* ortamda incelenen bazı karakterlere ait korelasyon katsayıları.

	ESEKO (%)	ESCEK (%)	EKSCEK (%)	ESCSE (adet)	EKSCE (adet)	RE (adet)	BS (adet)
ESEKO	1						
ESCEK	0.95**	1					
EKSCEK	0.75**	0.87**	1				
ESCSE	0.52**	0.56**	0.41**	1			
EKSCE	0.50**	0.56**	0.46**	0.99**	1		
RE	0.55**	0.59**	0.48**	0.66**	0.64**	1	
BS	0.64**	0.67**	0.50**	0.81**	0.79**	0.84**	1

*, p<0.05; **: p<0.01 düzeyinde önemlidir.

4.2. İkinci Yöntemde Elde Edilen Bulgular

4.2.1. Kontrollü koşullarda yapılan çalışmalar

4.2.1.a. Etil metansülfonatın (EMS) uygulaması

1) Çimlenme ile ilgili karakterler

Tohumlar ortama konulduktan yaklaşık 1-2 gün sonra çimlenmeye başlamışlar ve 14 gün boyunca bu ortamda tutularak gelişmeleri sağlanmıştır.

a. Çimlenme hızı (%)

Çimlenme hızı üzerine etil metansülfonat hem uygulama süresi, hem de uygulama konsantrasyonu ve yine süre $\times$ konsantrasyon interaksyonu önemsiz olmuştur (Çizelge 4.13).

Çimlenme hızı üzerine mutagenin belirgin bir etkisi olmamıştır. Örneğin, 10 dakikalık uygulamada %100 olan çimlenme hızı 6 saatlik uygulamada da %100 olmuş, diğer sürelerde ise %99'un üzerinde olup, ortaya çıkan farklılıklar önemsizmeyecek kadar küçük olmuştur (Çizelge 4.14).

Konsantrasyonların ortalamalarına göre, kontrolde %100 olan çimlenme hızı %0.2 ve %0.3'lük konsantrasyonlarda %99.75, %0.1 ve %0.4'lük konsantrasyonlarda ise %99.25 olmuştur. Bu sonuçlardan da anlaşılabileceği gibi, çimlenme hızı konsantrasyondaki artışa paralel bir değişim göstermemiştir (Çizelge 4.14).

Çizelge 4.13. Tohuma farklı süre ve dozlarda EMS uygulamasından sonra çimlenme ile ilgili bazı karakterlere ait varyans analizi sonuçları.

Varyasyon Kaynağı	Kareler ortalaması								
	SD	ÇH	ÇG	ÇO	ÇHK	ÇOI	OÇZ	ÇHI	ÇGI
Süre (saat)	3	2.13	2.13	2.13	28.20**	0.000012	0.003**	0.78**	221299.07**
Konsantrasyon (%)	4	1.80	1.80	1.8	10.00	0.000010	0.001	0.23	7322.15
Süre × Konsantrasyon	12	1.80	1.80	1.8	5.61	0.000010	0.001	0.23	49707.29
Hata	60	1.86	1.86	1.86	5.71	0.000010	0.001	0.15	31014.60
Toplam	80								

** : p<0.01 düzeyinde önemlidir.

Çizelge 4.14. Tohuma farklı süre ve dozlarda EMS uygulamasından sonra çimlenme ile ilgili bazı karakterlere ait varyans analizi sonuçları ait veriler.

7	Konsantrasyon (%)	ÇH (%)	ÇG (%)	ÇO (%)	ÇHK	OÇZ (gün)	Çİİ	ÇGİ
10 dakika	0	100.00	100.00	100.00	100.00	1.00	39.00	2370.00
	0.1	100.00	100.00	100.00	100.00	1.00	39.00	2340.50
	0.2	100.00	100.00	100.00	100.00	1.00	39.00	2271.50
	0.3	100.00	100.00	100.00	100.00	1.00	39.00	2364.00
	0.4	98.00	98.00	98.00	100.00	1.00	38.50	2288.24
	Ortalama	99.60	99.60	99.60	100.00^{A1}	1.00^B	38.90^A	2326.84^A
3	0	100.00	100.00	100.00	99.04	1.01	38.88	2408.00
	0.1	98.00	98.00	98.00	95.59	1.05	38.04	2424.36
	0.2	99.00	99.00	99.00	96.23	1.04	38.33	2359.66
	0.3	99.00	99.00	99.00	96.26	1.04	38.33	2299.16
	0.4	100.00	100.00	100.00	99.04	1.01	38.88	2295.00
	Ortalama	99.20	99.20	99.20	97.23^B	1.03^A	38.49^B	2357.23^A
6	0	100.00	100.00	100.00	100.00	1.00	39.00	2330.00
	0.1	100.00	100.00	100.00	100.00	1.00	39.00	2102.00
	0.2	100.00	100.00	100.00	100.00	1.00	39.00	2098.50
	0.3	100.00	100.00	100.00	98.08	1.02	38.75	2244.50
	0.4	100.00	100.00	100.00	98.15	1.02	38.83	2288.50
	Ortalama	100.00	100.00	100.00	99.24^A	1.01^B	38.91^A	2212.70^B
9	0	100.00	100.00	100.00	100.00	1.00	39.00	2006.50
	0.1	99.00	99.00	99.00	100.00	1.00	38.75	2061.92
	0.2	100.00	100.00	100.00	100.00	1.00	39.00	2374.00
	0.3	100.00	100.00	100.00	96.23	1.04	38.58	2041.50
	0.4	99.00	99.00	99.00	100.00	1.00	38.75	2162.58
	Ortalama	99.60	99.60	99.6	99.24^A	1.01^B	38.81^A	2129.30^B
Konsantrasyon Ortalama (%)	0	100.00	100.00	100.00	99.76	1.00	38.97	2278.63
	0.1	99.25	99.25	99.25	98.90	1.01	38.70	2232.20
	0.2	99.75	99.75	99.75	99.06	1.01	38.83	2275.91
	0.3	99.75	99.75	99.75	97.64	1.03	38.67	2237.29
	0.4	99.25	99.25	99.25	99.30	1.01	38.74	2258.58
LD₅₀ değeri		50.00	50.00	50.00	49.87	0.5	19.48	1139.31

¹: Aynı sütunda aynı büyük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemsizdir.

b. Çimlenme gücü (%)

Çimlenme gücü üzerine EMS'nin hem uygulama süresi ve konsantrasyonu hem de süre×konsantrasyon interaksiyonu önemsiz olmuştur (Çizelge 4.13).

Uygulama sürelerinin ortalamalarına göre, 10 dakikalık uygulamada %100 olan çimlenme gücü 6 saatlik uygulama süresinde de %100 olmuştur. Diğer uygulama sürelerinde ise çok küçük bir azalma (%99.20-99.60) gerçekleşmiştir (Çizelge 4.14).

Konsantrasyonların kendi içerisindeki ortalamalar incelendiğinde, kontrolde %100 olan çimlenme gücünün, %0.2 ve %0.3'lük konsantrasyonlarda %99.75'e, %0.1 ve %0.4'lük konsantrasyonlarda ise %99.25'e düştüğü tespit edilmiştir (Çizelge 4.14).

c. Çimlenme oranı

Çimlenme oranı üzerine etil metansülfonatin hem uygulama süresi ve konsantrasyonu hem de süre × konsantrasyon interaksiyonu önemsiz olmuştur (Çizelge 4.13).

Bundan önceki iki karakterde olduğu gibi çimlenme oranı üzerine de uygulama süresinin belirgin bir etkisi olmamıştır. Nitekim, çimlenme oranı hem kontrolde hem de 6 saatlik uygulamada %100 olmuştur. Bunu küçük farklılıkla 10 dakika ve 9 saatlik (%99.60) uygulama süreleri izlemiş, son sırada ise %99.20 ile 3 saatlik uygulama yer almıştır (Çizelge 4.14).

Konsantrasyonların ortalamalarına göre çimlenme oranı kontrolde %100, %0.2 ve %0.3'lük konsantrasyonlarda %99.75, %0.1 ve %0.4'lük konsantrasyonlarda ise %99.25 olmuştur (Çizelge 4.14).

d. Çimlenme hızı katsayısı

Çimlenme hızı katsayısı üzerine EMS'nin uygulama süresinin etkisi çok önemli ($P<0.01$) iken, konsantrasyonun önemli bir etkisi olmamış ve yine süre $\times$ konsantrasyon interaksiyonu da önemsiz olmuştur (Çizelge 4.13).

Ortalamalar esas alınarak süreler göre değerlendirildiğinde, en yüksek çimlenme hızı katsayısı 10 dakikalık uygulamada (100), en düşük ise 3 saatlik uygulama süresinde (99.23) elde edilmiştir. Diğer taraftan, çimlenme hızı katsayısı 6 ve 9 saatlik uygulamalarda 99.24'e, 3 saatlik uygulamada ise 99.23'e düşmüştür. Bununla birlikte 10 dakika, 6 saat ve 9 saatlik süreler arasındaki farklılıklar önemsiz olmuştur (Çizelge 4.14).

Konsantrasyonların ortalamaları dikkate alınarak incelendiğinde, en yüksek çimlenme hızı katsayısı 99.76 ile kontrol grupta tespit edilmiş, bunu küçük farklılıklarla %0.4 (99.30), %0.2 (99.06), %0.1 (98.90) ve %0.3'lük (97.04) konsantrasyonlar takip etmiştir (Çizelge 4.14).

e. Ortalama çimlenme zamanı

Etil metansülfonatın uygulama süresi ortalama çimlenme zamanını çok önemli ($P<0.01$) derecede etkilemiş, buna karşın uygulama konsantrasyonu ile bu iki faktör arasındaki interaksiyonun etkisi önemsiz olmuştur (Çizelge 4.13).

Ortalamalar esas alınarak süreler göre değerlendirildiğinde, en uzun ortalama çimlenme zamanı 1.03 gün ile 3 saatlik uygulamadan elde edilmiş, bunu 1.01 gün ile 6 ve 9 saat, 1.00 gün ile 10 dakika uygulama süreleri izlemiş, ancak bu üç uygulama süresi arasındaki farklılıklar önemsiz olmuştur (Çizelge 4.14).

Ortalama çimlenme zamanı kontrolde 1.00 gün olmuş, bunu 1.01 gün ile %0.1, %0.2 ve %0.4'lük konsantrasyonlar izlemiştir. En geç çimlenme ise 1.03 gün ile %0.3'lük konsantrasyonda tespit edilmiştir (Çizelge 4.14).

f. Çimlenme hızı indeksi

Çimlenme hızı indeksi üzerine mutagenin uygulama süresinin etkisi istatistiksel anlamda çok önemli ($P<0.01$) iken, konsantrasyon ve yine süre $\times$ konsantrasyon interaksiyonun önemli bir etkisi olmamıştır. (Çizelge 4.13).

Uygulama sürelerinin ortalamalarına göre, çimlenme hızı indeksi 6 saatlik uygulamada 38.91 olarak tespit edilmiş, bunu azalan sıra ile 10 dakika (38.90), 9 saat (38.81) ve 3 saatlik (38.49) uygulama süreleri izlemiştir. Diğer taraftan, 10 dakika, 4 ve 8 saatlik uygulamalar arasındaki farklılıklar önemsiz olmuştur (Çizelge 4.14).

Konsantrasyonların ortalamalarına göre değerlendirildiğinde, en yüksek çimlenme hızı indeksi 38.97 ile kontrol grupta tespit edilmiş, bunu küçük farklılıklarla %0.2 (38.83), %0.1 (38.70), %0.4 (38.74) ve %0.3'lük (38.67) konsantrasyonlar takip etmiştir (Çizelge 4.14).

g. Çimlenme gücü indeksi

Etil metansülfonatin uygulama süresi çimlenme gücü indeksini çok önemli ($P<0.01$) derecede etkilemiş, bunu karşın, konsantrasyon ve süre $\times$ konsantrasyon interaksiyonunun etkisi önemsiz olmuştur. (Çizelge 4.13).

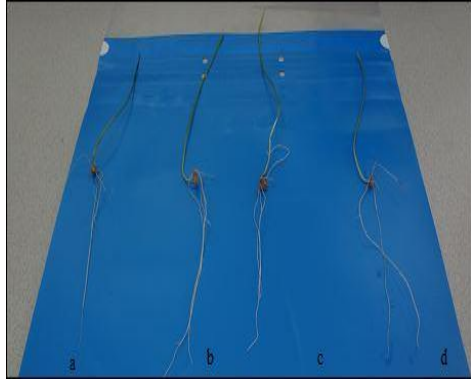
Ortalamalar esas alınarak süreler göre değerlendirildiğinde, en yüksek çimlenme gücü indeksi, 3 saatlik uygulamadan (2357.23) elde edilmiş, bunu 2326.84 ile 10 dakika, 2212.70 ile 6 saat ve 2129.30 ile 9 saatlik uygulama süreleri izlemiştir. Bununla birlikte,

10 dakika ve 3 saatlik ve yine 6 ve 9 saatlik uygulama süreleri arasındaki farklılıklar istatistiksel anlamda önemsiz olmuştur (Çizelge 4.14).

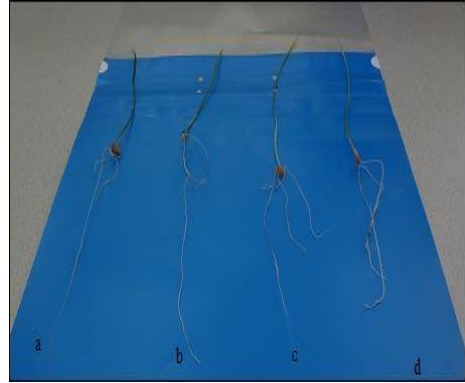
Konsantrasyon ortalamalarına göre en yüksek çimlenme gücü indeksi 2278.63 ile kontrol grupta tespit edilmiş ve son sırada 2232.20 ile %0.1'lik konsantrasyon yer almıştır (Çizelge 4.14).

2) Çim ile ilgili karakterler

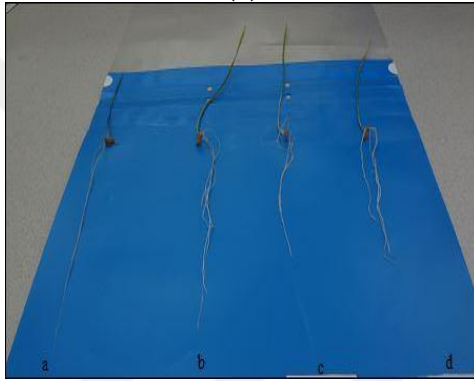
Tohumlar ortama konulduktan yaklaşık ikinci günün sonunda kök ve sürgünler meydana gelmiştir (Şekil 4.31).



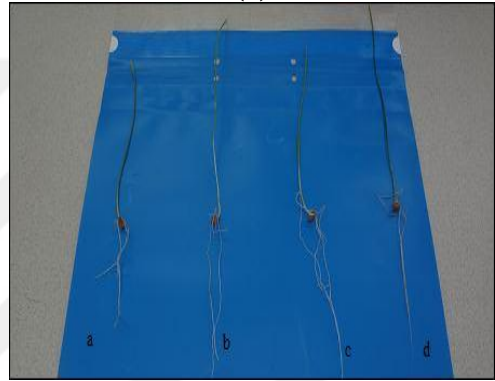
(1)



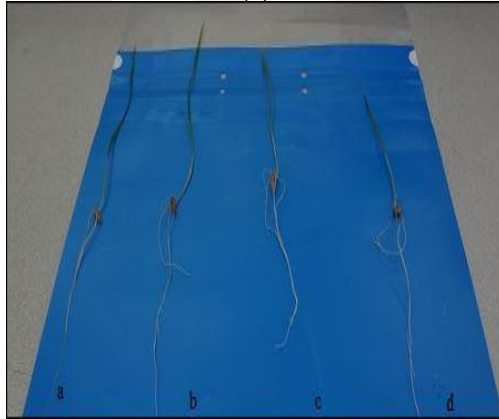
(2)



(3)



(4)



(5)

Şekil 4.31. EMS'nin farklı süre ve konsantrasyonlarında meydana gelen kök ve sürgünlerin görünüşleri.

- 1: a) 10 dakika + %0.0, b) 3 saat + %0.0, c) 6 saat + %0.0, d) 9 saat + %0.0,
 2: a) 10 dakika + %0.1, b) 3 saat + %0.1, c) 6 saat + %0.1, d) 9 saat + %0.1,
 3: a) 10 dakika + %0.2, b) 3 saat + %0.2, c) 6 saat + %0.2, d) 9 saat + %0.2,
 4: a) 10 dakika + %0.3, b) 3 saat + %0.3, c) 6 saat + %0.3, d) 9 saat + %0.3,
 5: a) 10 dakika + %0.4, b) 3 saat + %0.4, c) 6 saat + %0.4, d) 9 saat + %0.4 konsantrasyonlarda kök ve sürgün görünüşleri.

a. Kök sayısı

Kök sayısı üzerine etil metansülfonatin uygulama süresi ve konsantrasyonunun etkisi çok önemli ($P<0.01$) olmasına karşın, bu iki faktör arasındaki interaksiyon önemsiz olmuştur (Çizelge 4. 15).

En fazla kök sayısı 4.53 adet ile 10 dakikalık uygulamadan elde edilmiş, bunu azalan sıra ile 3 saat (4.11 adet), 6 saat (4.08 adet) ve 9 saatlik (4.08 adet) uygulama süreleri takip etmiştir. Bununla birlikte 3, 6 ve 9 saatlik uygulamalar arasındaki farklılıklar istatistiksel anlamda önemsiz olmuştur (Çizelge 4.16).

Ortalama dikkate alınarak konsantrasyonlara göre değerlendirilme yapıldığında, kontrol grupta 4.24 adet olan kök sayısı EMS'nin %0.2'lik konsantrasyonunda 4.25'e, %0.1'lik konsantrasyonunda 4.26'ya, %0.3'lük konsantrasyonunda ise 4.34'e yükselmiş, böylece kontrolü geçmişler, ancak bu uygulamalar arasındaki farklılıklar önemsiz olmuştur. Diğer taraftan, %0.4'lük konsantrasyonda kök sayısı çok önemli derecede azalarak 3.91'e düşmüştür (Çizelge 4.16).

Çizelge 4.15. Tohuma farklı süre ve dozlarda EMS uygulamasından sonra çim ile ilgili bazı karakterlere ait varyans analizi sonuçları.

Varyasyon Kaynağı	Kareler ortalaması									
	SD	KS	KU	SU	KOU	ÇU	KYA	KKA	SYA	SKA
Süre (saat)	3	0.97**	8.92**	7.52**	0.88**	24.14**	0.002**	0.003**	0.001**	0.003**
Konsantrasyon (%)	4	0.44**	0.59	1.33	0.25*	0.53	0.00008	0.000001	0.000094	0.001*
Süre × Konsantrasyon	12	0.03	4.44**	0.91	0.11	5.12	0.000001**	0.001	0.000001**	0.001**
Hata	60	0.06	1.14	1.20	0.09	2.88	0.00005	0.000001	0.00005	0.000001
Toplam	80									

*, p<0.05; **: p<0.01 düzeyinde önemlidir.

Çizelge 4.16. Tohuma farklı süre ve dozlarda EMS uygulamasından sonra çim ile ilgili bazı karakterlere ait veriler.

Süre (dakika/saat)	Konsantrasyon (%)	KS (adet)	KU (cm)	SU (cm)	KOU (cm)	ÇU (cm)	KYA (g)	KKA (g)	SYA (g)	SKA (g)
10 dakika	0	4.45	11.63	12.08	4.22	23.70	0.0349 ^b	0.0098	0.0763 ^a	0.0072
	0.1	4.6	10.93	12.48	3.69	23.41	0.0408 ^b	0.0113	0.0675 ^{ab}	0.0062
	0.2	4.75	10.21	12.50	3.86	22.72	0.0390 ^b	0.0171	0.0651 ^{ab}	0.0082
	0.3	4.65	12.00	11.64	3.73	23.64	0.0537 ^a	0.0065	0.0647 ^{ab}	0.0078
	0.4	4.2	10.76	12.58	3.97	23.33	0.0448 ^{ab}	0.0052	0.0562 ^b	0.0076
	Ortalama	4.53^A	11.10^A	12.25^B	3.89^{AB}	23.35^A	0.0427^B	0.0100^B	0.0660^A	0.0074^B
3	0	4.2	11.15	12.93	3.99	24.08	0.0334 ^b	0.0055	0.0658 ^a	0.0021 ^a
	0.1	4.15	11.15	13.57	4.10	24.71	0.0448 ^a	0.0049	0.0689 ^{ab}	0.0012 ^b
	0.2	4.25	10.28	13.57	4.15	23.85	0.0354 ^{ab}	0.0139	0.0627 ^{ab}	0.0013 ^b
	0.3	4.2	10.66	12.55	3.92	23.21	0.0382 ^{ab}	0.0094	0.0601 ^{ab}	0.0009 ^{bc}
	0.4	3.75	9.44	13.52	3.92	22.95	0.0320 ^b	0.0043	0.0584 ^b	0.0004 ^c
	Ortalama	4.11^B	10.53^{AB}	13.23^A	4.02^A	23.76^A	0.0368^C	0.0076^B	0.0632^{AB}	0.0012^B
6	0	4.15	10.37 ^a	12.93	3.40	23.30	0.0639 ^a	0.0250	0.0694 ^a	0.0153 ^b
	0.1	4.15	8.59 ^b	12.43	3.68	21.02	0.0377 ^b	0.0154	0.0515 ^b	0.0158 ^b
	0.2	4	9.59 ^{ab}	11.40	3.82	20.99	0.0378 ^b	0.0162	0.0531 ^b	0.0102 ^b
	0.3	4.25	10.81 ^a	11.64	3.11	22.45	0.0518 ^a	0.0660	0.0602 ^{ab}	0.0821 ^a
	0.4	3.85	10.12 ^a	12.77	3.61	22.89	0.0556 ^{ab}	0.0210	0.0668 ^a	0.0143 ^b
	Ortalama	4.08^B	9.89^{BC}	12.23^B	3.52^C	22.12^B	0.0494^A	0.0287^A	0.0603^B	0.0276^A
9	0	4.15	8.05 ^{cd}	12.01	3.98	20.07	0.0211 ^b	0.0019	0.0466	0.0004
	0.1	4.15	9.71 ^{bc}	11.12	3.79	20.83	0.0239 ^b	0.0009	0.0492	0.0003
	0.2	4	11.47 ^a	12.26	3.92	23.74	0.0411 ^a	0.0011	0.0571	0.0004
	0.3	4.25	8.70 ^d	11.70	3.67	20.42	0.0276 ^b	0.0016	0.0499	0.0009
	0.4	3.85	10.10 ^b	11.75	3.72	21.85	0.0293 ^b	0.0092	0.0546	0.0006
	Ortalama	4.08^B	9.61^C	11.77^B	3.81^B	21.37^B	0.0286^D	0.0029^B	0.0515^C	0.0005^B
Konsantrasyon Ortalama (%)	0	4.24 ^A	10.30	12.49	3.89 ^A	22.79	0.0384	0.0105	0.0645	0.0063 ^B
	0.1	4.26 ^A	10.09	12.40	3.81 ^{AB}	22.49	0.0368	0.0081	0.0593	0.0059 ^B
	0.2	4.25 ^A	10.39	12.43	3.93 ^A	22.82	0.0383	0.0121	0.0595	0.0050 ^B
	0.3	4.34 ^A	10.55	11.88	3.61 ^B	22.43	0.0428	0.0209	0.0588	0.0229 ^A
	0.4	3.91 ^B	10.10	12.65	3.80 ^{AB}	22.75	0.0404	0.0099	0.0590	0.0057 ^B
LD₅₀ değeri		2.12	5.15	6.24	1.94	11.39	0.0192	0.0052	0.0322	0.0031

¹: Aynı sütunda aynı büyük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemsizdir.

²: Her bir uygulama süresi için aynı sütunda aynı küçük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemsizdir.

b. Kök uzunluğu

Kök uzunluğu üzerine EMS'nin uygulama süresi çok önemli ($P<0.01$), konsantrasyonun etkisi önemsiz, süre $\times$ konsantrasyon interaksyonu ise çok önemli ($P<0.01$) olmuştur (Çizelge 4.15).

Uygulama süresi uzadıkça kök uzunluğu azalmıştır. Nitekim, en fazla kök uzunluğu 11.10 cm ile 10 dakikalık uygulama süresinden elde edilmiş, bunu 10.53 cm ile 3 saat, 9.89 cm ile 6 saat ve 9.61 cm ile 9 saatlik uygulama süreleri izlemiştir (Çizelge 4.16).

Konsantrasyonların ortalamalarına göre, en uzun kökler 10.55 cm ile %0.3'lük konsantrasyonda tespit edilmiş, bunu 10.39 cm ile %0.2'lik, 10.30 cm ile %0.0'lık, 10.10 cm ile %0.4'lük ve 10.09 cm ile %0.1'lik konsantrasyonlar izlemiştir. Bu verilerden de anlaşılabileceği gibi, EMS'nin %0.2 ve %0.3'lük konsantrasyonlar şeklinde uygulanması kök uzunluğunu artırmış, %0.1 ve %0.4'lük konsantrasyonlar ise azaltmıştır (Çizelge 4.16).

Kök uzunluğu EMS'nin uygulama süresinin etkisi kullanılan konsantrasyona göre farklılık göstermiştir. Bu nedenle uygulama süresi $\times$ konsantrasyonun etkisi çok önemli ($P<0.01$) olmuştur (Çizelge 4.15). En yüksek kök uzunluğu 10 dakikalık uygulama süresinde %0.0, 3 saatlik uygulamada %0.0 ve %0.1'lik konsantrasyonda, 6 saatlik uygulamada %0.3'lük konsantrasyonda ve 9 saatlik uygulamada %0.2'lik konsantrasyondan gözlenmiştir. En düşük kök uzunluğu ise 10 dakikalık uygulama süresinde %0.2'lik konsantrasyonda; 3 saatlik uygulamada %0.4'lük konsantrasyonda; 6 saatlik uygulamada %0.1'lik konsantrasyonda ve 9 saatlik uygulamada %0.0'lik konsantrasyondan elde edilmiştir (Çizelge 4.16).

c. Sürgün uzunluğu

Etil metansülfonatın uygulama süresi sürgün uzunluğunu çok önemli ($P<0.01$) derecede etkilemiş, buna karşın konsantrasyon ve süre $\times$ konsantrasyon interaksyonunun önemli

bir etkisi olmamıştır (Çizelge 4.15).

Sürelerin ortalamalarına göre, en uzun sürgünler 3 saatlik uygulamadan (13.23 cm) elde edilmiş, bunu azalan sıra ile 10 dakika (12.25 cm), 6 saat (12.23 cm) ve 9 saatlik (11.77 cm) uygulamalar izlemiştir, ancak 10 dakika, 6 ve 9 saatlik uygulamalar arasındaki farklılıklar önemsiz olmuştur (Çizelge 4.16).

Konsantrasyonların ortalamalarına göre değerlendirildiğinde, sürgün uzunluğu kontrol grupta 12.49 cm iken, EMS'nin %0.4'lük konsantrasyonunda küçük bir artışla 12.65 cm'ye yükselmiştir. Diğer konsantrasyonlar ise sürgün uzunluğunda küçük bir azalmaya sebep olmuşlar ve bunlarda sürgün uzunluğu kontrol grubun biraz gerisinde kalmıştır (Çizelge 4.16).

d. Koleoptil uzunluğu

Koleoptil uzunluğu üzerine EMS'nin uygulama süresinin etkisi çok önemli ($P<0.01$), uygulama konsantrasyonunun etkisi önemli ($P<0.05$) iken, bu iki faktör arasındaki etkileşim önemsiz olmuştur (Çizelge 4.15).

En yüksek koleoptil uzunluğu 4.02 cm ile 3 saatlik uygulama süresinde gerçekleşmiş, bunu 3.89 cm ile 10 dakika, 3.81 cm ile 9 saat ve 3.52 cm ile 6 saatlik uygulama süreleri izlemiştir (Çizelge 4.16).

Konsantrasyonların ortalamaları dikkate alınarak değerlendirildiğinde, kontrol grupta 3.89 cm olan koleoptil uzunluğunun %0.2'lik konsantrasyonda küçük bir artışla 3.93 cm'ye yükseldiği, buna karşın diğer konsantrasyonlarda koleoptil uzunluğunda azalma olduğu (%0.1'lik konsantrasyonda 3.81 cm, %0.4'lük konsantrasyonda 3.80 cm ve %0.3'lük konsantrasyonda 3.61 cm) tespit edilmiştir (Çizelge 4.16).

e. Çim uzunluğu

Etil metansülfonatın uygulama süresi çim uzunluğunu çok önemli ($P<0.01$) derecede etkilemiş, konsantrasyonun etkisi önemsiz, bu iki faktör arasındaki interaksiyon çok önemli ($P<0.01$) olmuştur (Çizelge 4.15).

Uygulama süresine göre ortalama çim uzunluğu dikkate alındığında, en fazla çim uzunluğunu 23.76 cm ile 10 dakikalık uygulamadan elde edilmiş, bunu 23.35 cm ile 3 saatlik, 22.12 cm ile 6 saatlik ve 22.37 cm ile 9 saatlik uygulamalar izlemiş, ancak 10 dakikalık ve 3 saatlik uygulamalar ve yine 6 ve 9 saatlik uygulamalar arasındaki farklılıklar önemsiz olmuştur (Çizelge 4.16).

Ortalamalar esas alınarak konsantrasyonlara göre değerlendirildiğinde, kontrolde 22.79 cm olan çim uzunluğunun %0.2'lik konsantrasyonda küçük bir artışla 22.82 cm'ye yükseldiği, buna karşın diğer tüm konsantrasyonlarda kısaldığı tespit edilmiştir. Buna göre, çim uzunluğu %0.4'lük konsantrasyonda 22.75 cm, %0.1'lik konsantrasyonda 22.49 cm ve %0.3'lük konsantrasyonda 22.43 cm olmuştur (Çizelge 4.16).

f. Kök yaş ağırlığı

Kök yaş ağırlığı üzerine EMS'nin uygulama süresi çok önemli ($P<0.01$), konsantrasyonun etkisi önemsiz, süre $\times$ konsantrasyon interaksiyonu ise çok önemli ($P<0.01$) olmuştur (Çizelge 4.15).

Fide başına en yüksek kök yaş ağırlığı 0.0449 g ile 6 saatlik uygulama süresinden elde edilmiş, bunu 0.0427 g ile 10 dakika, 0.0368 g ile 3 saat ve 0.0286 g ile 9 saatlik uygulama süreleri izlemiştir (Çizelge 4.16).

Konsantrasyonların ortalamaları dikkate alınarak incelendiğinde, en yüksek kök yaş ağırlığı 0.0428 g ile %0.3'lük konsantrasyonda tespit edilmiş, bunu 0.0404 g ile

%0.4'lük, 0.0384 g ile %0'lık (kontrol), 0.0383 g ile %0.2'lik ve 0.0368 g ile %0.1'lik konsantrasyonlar izlemiş, ancak uygulamalar arasındaki farklılıklar istatistiksel anlamda önemsiz olmuştur. Bu sonuçlara göre EMS'nin %0.3 ve %0.4'lük konsantrasyonları kök yaş ağırlığında kontrole göre küçük bir artışa sebep olmuştur (Çizelge 4.16).

Kök yaş ağırlığı EMS'nin uygulama süresinin etkisi kullanılan konsantrasyona göre farklılık göstermiştir. Bu nedenle uygulama süresi $\times$ konsantrasyonun etkisi çok önemli ($P<0.01$) olmuştur (Çizelge 4.15). En yüksek kök yaş ağırlığı 10 dakikalık uygulama süresinde %0.3'lük konsantrasyonda, 3 saatlik uygulamada %0.1'lik konsantrasyonda; 6 saatlik uygulamada %0.0'lik konsantrasyonda ve 9 saatlik uygulamada ise %0.2'lik konsantrasyonda gözlenmiştir. En düşük kök yaş ağırlığı ise 10 dakikalık uygulama süresinde %0.0'lik, 3 saatlik uygulamada %0.4'lük konsantrasyonda; 6 saatlik uygulamada %0.1'lik konsantrasyonda ve 9 saatlik uygulamada %0.0'lik konsantrasyonda elde edilmiştir (Çizelge 4.16).

g. Kök kuru ağırlığı

Kök kuru ağırlığı üzerine uygulama süresinin etkisi istatistiksel anlamda çok önemli ($P<0.01$) iken, konsantrasyonun etkisi ve süre $\times$ konsantrasyon interaksiyonu önemsiz olmuştur (Çizelge 4.15).

6 saatlik uygulamada 0.0287 gram olan kök kuru ağırlığı, 10 dakikalık uygulamada 0.0100 grama, 3 saatlik uygulamada 0.0076 grama, 8 saatlik uygulamada ise 0.0029 grama düşmüş, ancak 10 dakikalık, 6 ve 8 saatlik uygulama süreleri arasındaki farklılıklar önemsiz olmuştur (Çizelge 4.16).

Ortalamalar esas alınarak konsantrasyonlara göre değerlendirildiğinde, en yüksek kök kuru ağırlığının %0.2'lik konsantrasyonda (0.0121 g), en düşük ise %0.4'lük konsantrasyonda (0.0009 g) gerçekleştiği tespit edilmiş, ancak tüm konsantrasyonlar arasındaki farklılıklar önemsiz olmuştur (Çizelge 4.16).

h. Sürgün yaş ağırlığı

Sürgün yaş ağırlığı üzerine etil metansülfonatın uygulama süresi çok önemli ($P<0.01$), konsantrasyonun etkisi önemsiz, süre $\times$ konsantrasyon interaksiyonu ise çok önemli ($P<0.01$) olmuştur (Çizelge 4.15).

En yüksek sürgün yaş ağırlığı 0.0660 g ile 10 dakikalık uygulamada tespit edilmiş, bunu 0.0632 g ile 3 saatlik ve 0.0603 g ile 6 saatlik uygulama süreleri izlenmiştir. Diğer taraftan, bu karakter bakımından en düşük değer 0.0515 g ile 9 saatlik uygulama süresinde gerçekleşmiştir (Çizelge 4.16).

Konsantrasyonların kendi içerisindeki ortalamaları esas alındığında, sürgün yaş ağırlığı bakımından ilk sırada 0.0645 g ile kontrol grubun yer aldığı, bunu 0.0595 g ile %0.2, 0.0593 g ile %0.1 ve 0.0590 g ile %0.4'lük konsantrasyonların izlediği ve bu karakter bakımından son sırada %0.3'lük konsantrasyonun (0.0588 g) bulunduğu tespit edilmiş, ancak tüm konsantrasyonlar arasındaki farklılıklar istatistiksel anlamda önemsiz olmuştur (Çizelge 4.16).

Sürgün yaş ağırlığı EMS'nin uygulama süresinin etkisi kullanılan konsantrasyona göre farklılık göstermiştir. Bu nedenle uygulama süresi $\times$ konsantrasyonun etkisi çok önemli ($P<0.01$) olmuştur (Çizelge 4.15). En yüksek sürgün yaş ağırlığı 10 dakikalık uygulama süresinde %0.4'lük, 3 saatlik uygulamada %0.1'lik konsantrasyonda; 6 saatlik uygulamada %0.0'lik konsantrasyonda ve 9 saatlik uygulamada ise %0.2'lik konsantrasyonda gözlenmiştir. En düşük sürgün yaş ağırlığı ise 10 dakikalık uygulama süresinde %0.0'lik konsantrasyonda; 3 saatlik uygulamada %0.4'lük konsantrasyonda; 6 saatlik uygulamada %0.1'lik konsantrasyonda ve 9 saatlik uygulamada %0.0'lik konsantrasyondan elde edilmiştir (Çizelge 4.16).

i. Sürgün kuru ağırlığı

Sürgün kuru ağırlığı üzerine EMS'nin uygulama süresinin etkisi çok önemli ($P<0.01$), konsantrasyonun etkisi önemli ($P<0.05$) , süre $\times$ konsantrasyon interaksiyonu ise çok önemli ($P<0.01$) olmuştur (Çizelge 4.15).

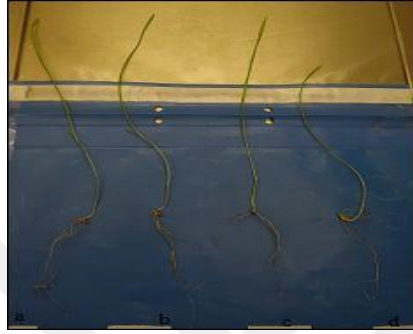
En yüksek sürgün kuru ağırlığı 0.0276 g ile 6 saatlik uygulama süresinden elde edilmiş ve bunu 0.0074 g ile 10 dakikalık uygulama, 0.0012 g ile 6 saatlik uygulama izlemiş ve bu karakter bakımından son sırada 0.0005 g ile 9 saatlik uygulama yer almıştır (Çizelge 4.16).

Konsantrasyonların ortalamaları dikkate alınarak değerlendirildiğinde, en yüksek sürgün kuru ağırlığı 0.0229 g ile %0.3'lük konsantrasyonda grupta tespit edilmiş olup, bu durum EMS'nin %0.3'lük konsantrasyonunun sürgün gelişimini teşvik ettiğini göstermektedir. %0.3'lük konsantrasyondaki bu değer diğer tüm uygulamalardakine göre oldukça yüksek olup aralarındaki farklılık önemli olmuştur. Diğer taraftan, kontrolde 0.0063 g olan sürgün kuru ağırlığı, %0.1'lik konsantrasyonda 0.0059'a, %0.4'lük konsantrasyonda 0.0057'ye ve %0.2'lik konsantrasyonda 0.0050'ye düşmüş, ancak bu üç konsantrasyon arasındaki farklılıklar önemsiz olmuştur (Çizelge 4.16).

Sürgün kuru ağırlığı EMS'nin uygulama süresinin etkisi kullanılan konsantrasyona göre farklılık göstermiştir. Bu nedenle uygulama süresi $\times$ konsantrasyonun etkisi çok önemli ($P<0.01$) olmuştur (Çizelge 4.15). En yüksek sürgün kuru ağırlığı 10 dakikalık uygulama süresinde %0.2'lik konsantrasyonda; 3 saatlik uygulamada %0.1'lik konsantrasyonda; 6 ve 9 saatlik uygulamalarda ise %0.3'lük konsantrasyonda gözlenmiştir. En düşük sürgün kuru ağırlığı ise 10 dakikalık uygulama süresinde %0.1' konsantrasyonda; 3 saatlik uygulamada %0.4'lük konsantrasyonda; 6 saatlik uygulamada %0.2'lik konsantrasyonda ve 9 saatlik uygulamada %0.1'lik konsantrasyonda elde edilmiştir (Çizelge 4.16).

3) Fide ile ilgili karakterler

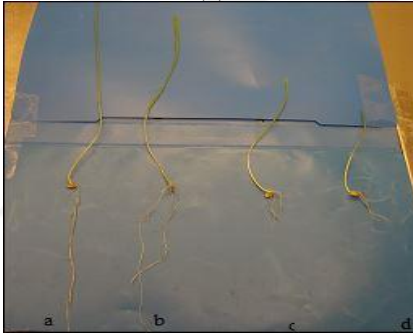
İşlem uygulanmış tohumlar, içerisinde toprak bulunan kasalara ekilmiş ve bu ortamda gelişen M₁ fidelerinde aşağıda belirtilen karakterler incelenmiştir (Şekil 4.32).



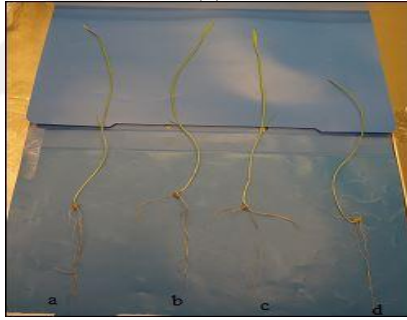
(1)



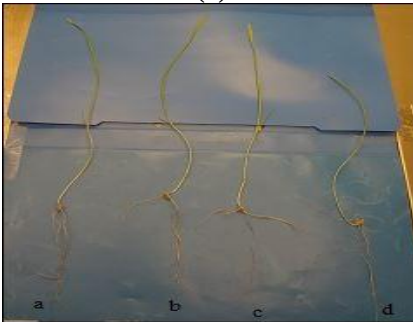
(2)



(3)



(4)



(5)

Şekil 4.32. EMS'nin farklı süre ve konsantrasyonlarda işlem uygulanmış tohumlar içerisinde toprak bulunan kasaların ekilmesi ve bu ortamda gelişen M₁ fidelerinde görünümleri.

- 1: a) 10 dakika + %0.0, b) 3 saat + %0.0, c) 6 saat + %0.0, d) 9 saat + %0.0,
- 2: a) 10 dakika + %0.1, b) 3 saat + %0.1, c) 6 saat + %0.1, d) 9 saat + %0.1,
- 3: a) 10 dakika + %0.2, b) 3 saat + %0.2, c) 6 saat + %0.2, d) 9 saat + %0.2,
- 4: a) 10 dakika + %0.3, b) 3 saat + %0.3, c) 6 saat + %0.3, d) 9 saat + %0.3,
- 5: a) 10 dakika + %0.4, b) 3 saat + %0.4, c) 6 saat + %0.4, d) 9 saat + %0.4 konsantrasyonlarda kök ve sürgün görünümleri.

a. Çıkış oranı

Çıkış oranı üzerine EMS'nin uygulama süresi ve konsantrasyonu çok önemli ($P<0.01$), bu iki faktör arasındaki interaksiyon ise önemli ($P<0.05$) olmuştur (Çizelge 4.18).

Uygulama süresinin uzaması genel anlamda (9 saat hariç) çıkış oranını düşürmüştür. Örneğin, 10 dakikalık uygulamada %97.80 olan çıkış oranı 9 saatlik uygulamada %91.80'e, 3 saatlik uygulamada %90.80'e, 6 saatlik uygulamada ise %84.40 düşmüş, ancak yalnızca 10 dakikalık uygulama ile diğerleri arasındaki farklılıklar çok önemli olmuştur (Çizelge 4.19).

Konsantrasyonların ortalamaları incelendiğinde, EMS uygulamasının çıkış oranını azalttığı görülmüştür. Örneğin kontrolde %94.50 olan çıkış oranı, %0.1'lik konsantrasyonda çok küçük bir azalma ile %94.20'ye, %0.2'lik konsantrasyonda %90.25'e, %0.3'lük konsantrasyonda %89.00'a, %0.4'lük konsantrasyonda ise 86.50'ye düşmüştür. Bu sonuçlara göre EMS'nin konsantrasyonu arttıkça çıkış oranı düşmüştür. Bununla birlikte, kontrol ile yalnızca %0.4'lük konsantrasyon arasındaki farklılık çok önemli olmuştur (Çizelge 4.19).

Çıkış oranı üzerine EMS'nin uygulama süresinin etkisi kullanılan konsantrasyona göre farklılık göstermiştir. Bu nedenle uygulama süresi $\times$ konsantrasyonun etkisi önemli ($P<0.05$) olmuştur (Çizelge 4.17). En yüksek çıkış oranı 10 dakikalık ve 9 saatlik uygulama sürelerinde tüm konsantrasyonlar arasında farklılık gözlenmemiş, 3 saatlik uygulamada %0.2'lik konsantrasyonda; 6 saatlik uygulamada %0.2'lik konsantrasyonda gözlenmiştir. En düşük çıkış oranı üzerine ise 10 dakikalık uygulama süresinde %0.4, 3 saatlik uygulamada %0.2'lik konsantrasyonda; 6 saatlik uygulamada %0.1'lik konsantrasyonda ve 9 saatlik uygulamada %0.2'lik ve %0.3'lük konsantrasyondan elde edilmiştir (Çizelge 4.18).



Çizelge 4.18. Tohuma farklı süre ve dozlarda EMS uygulamasından sonra fide ile ilgili bazı karakterlere ait varyans analizi sonuçları.

Varyasyon Kaynağı	Kareler ortalaması					
	SD	ÇO	İYU	KUZ	SUZ	FB
Süre (saat)	3	599.73**	9.38**	308.06**	198.73**	287.03**
Konsantrasyon (%)	4	190.29**	2.30**	59.86*	80.73**	267.03**
Süre × Konsantrasyon	12	121.90*	1.27**	59.31**	24.41**	113.52**
Hata	380	51.87	0.29	24.97	7.43	32.51
Toplam	400					

*, p<0.05; **: p<0.01 düzeyinde önemlidir.

Çizelge 4.19. Tohuma farklı süre ve dozlarda EMS uygulamasından sonra fide ile ilgili bazı karakterlere ait veriler.

Süre (dakika/saat)	Konsantrasyon (%)	ÇO	İYU (cm)	KUZ (cm)	SUZ (cm)	FB (cm)
10 dakika	0	100.00	3.15 ^{bc2}	14.17	30.67 ^a	44.84 ^{ab}
	0.1	100.00	3.27 ^b	14.00	29.27 ^b	43.27 ^b
	0.2	98.00	3.70 ^a	13.56	31.79 ^b	45.34 ^{ab}
	0.3	97.00	2.82 ^c	13.95	32.06 ^b	46.01 ^a
	0.4	94.00	3.26 ^b	14.06	31.11 ^b	45.17 ^{ab}
	Ortalama	97.80^A	3.24^{D1}	13.94^C	30.98^A	44.92^B
3	0	96.00 ^a	3.93	14.93	29.48 ^b	44.41 ^b
	0.1	95.00 ^a	3.85	15.95	30.81 ^{ab}	46.75 ^{ab}
	0.2	83.00 ^b	4.13	16.74	31.62 ^a	48.36 ^a
	0.3	94.00 ^a	3.83	16.50	31.73 ^a	48.23 ^a
	0.4	86.00 ^{ab}	3.90	15.92	29.65 ^b	45.57 ^{ab}
	Ortalama	90.80^B	3.92^A	16.00^B	30.66^A	46.66^A
6	0	91.00 ^{ab}	3.54	18.44 ^{ab}	27.49 ^c	45.93 ^b
	0.1	72.00 ^c	3.78	18.63 ^{ab}	30.08 ^{ab}	48.71 ^{ab}
	0.2	85.00 ^{abc}	3.75	15.58 ^b	29.60 ^b	45.18 ^b
	0.3	96.00 ^a	3.88	20.74 ^a	32.14 ^a	52.88 ^a
	0.4	78.00 ^{bc}	3.88	17.62 ^{ab}	30.16 ^{ab}	47.78 ^b
	Ortalama	84.40^B	3.76^B	18.20^A	29.89^B	48.09^A
9	0	91.00	2.77 ^c	12.54 ^c	25.57 ^c	38.11 ^a
	0.1	94.00	3.38 ^b	15.20 ^{bc}	28.09 ^{ab}	43.30 ^b
	0.2	90.00	3.55 ^b	19.68 ^a	29.82 ^a	49.50 ^a
	0.3	90.00	3.67 ^{ab}	18.50 ^{ab}	27.08 ^{bc}	45.59 ^{ab}
	0.4	94.00	3.87 ^a	16.75 ^{ab}	28.65 ^{ab}	45.40 ^{ab}
	Ortalama	91.80^B	3.45^C	16.53^B	27.84^C	44.38^A
Konsantrasyon Ortalama (%)	0	94.50 ^A	3.34 ^D	15.02 ^B	28.30 ^C	43.32 ^B
	0.1	94.25 ^A	3.57 ^{BC}	15.94 ^{AB}	29.56 ^B	45.50 ^B
	0.2	90.25 ^{AB}	3.78 ^A	16.38 ^{AB}	30.70 ^A	47.09 ^{AB}
	0.3	89.00 ^{AB}	3.55 ^C	17.42 ^A	30.75 ^A	48.17 ^A
	0.4	86.50 ^B	3.72 ^{AB}	16.08 ^{AB}	29.89 ^{AB}	45.98 ^B
LD₅₀ değeri		47.25	1.67	7.51	14.15	21.66

¹: Aynı sütunda aynı büyük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemsizdir.

²: Her bir uygulama süresi için aynı sütunda aynı küçük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemsizdir.

b. İlk yaprak uzunluğu

İlk yaprak uzunluğu üzerine mutagenin uygulama süresi ve konsantrasyonu ile bu iki faktör arasındaki interaksiyon, çok önemli ($P<0.01$) etki oluşturmuştur (Çizelge 4.18).

Ortalamalar esas alınarak uygulama süresine göre değerlendirildiğinde en fazla ilk yaprak uzunluğu 3.92 cm ile 3 saatlik uygulamadan elde edilmiş, bunu 3.76 cm ile 6 saat, 3.45 cm ile 9 saat ve 3.24 cm ile 10 dakikalık uygulamalar izlemiştir (Çizelge 4.19).

Mutagenin tüm konsantrasyonları ilk yaprak uzunluğunu artırmıştır. Çizelge 4. 19'dan görüleceği gibi, en yüksek ilk yaprak uzunluğu 3.78 cm ile %0.2'lik konsantrasyonda meydana gelmiş, bunu %0.4 (3.72 cm), %0.1 (3.57 cm) ve %0.3 (3.55 cm) uygulamalar izlemiş, son sırada ise 3.34 cm ile kontrol grup yer almıştır (Çizelge 4.19).

İlk yaprak uzunluğu üzerine EMS'nin uygulama süresinin etkisi kullanılan konsantrasyona göre farklılık göstermiştir. Bu nedenle uygulama süresi $\times$ konsantrasyonun etkisi çok önemli ($P<0.01$) olmuştur (Çizelge 4.17). En yüksek ilk yaprak uzunluğu 10 dakikalık ve 3 saatlik uygulamada sürelerinde %0.2'lik konsantrasyonda; 6 saatlik uygulamada %0.3'lük konsantrasyonda ve %0.4'lük konsantrasyonda ve 9 saatlik uygulama süresi ise %0.4'lük konsantrasyonda gözlenmiştir. En düşük ilk yaprak uzunluğu ise 10 dakikalık ve 3 saatlik uygulama sürrelerinde %0.3'lük konsantrasyonda; 6 ve 9 saatlik uygulamalarda ise %0.0 konsantrasyondan elde edilmiştir (Çizelge 4.18).

c. Kök uzunluğu

Kök uzunluğu üzerine uygulama süresinin etkisi istatistiksel anlamda çok önemli ($P<0.01$) iken, konsantrasyonun etkisi önemli ($P<0.05$), süre $\times$ konsantrasyon interaksiyonu ise çok önemli ($P<0.01$) olmuştur (Çizelge 4.18).

En fazla kök uzunluğu 18.20 cm ile 6 saatlik uygulama süresinden elde edilmiş, bunu 16.53 cm ile 9 saat, 16 cm ile 3 saat, 13.94 cm ile 10 dakikalık uygulamalar takip etmiştir. Buna göre, kök uzunluğu uygulama süresinin uzamasına veya kısalmasına paralel bir değişim göstermemiştir (Çizelge 4.19).

Konsantrasyonların ortalamaları incelendiğinde, kök uzunluğunun konsantrasyondaki artışa paralel bir değişim göstermediği görülmüştür. Nitekim, en uzun kökler 17.42 cm ile %0.3'lük konsantrasyonda tespit edilmiş, bunu azalan sıra ile %0.2 (16.38 cm) ve %0.4'lük (16.08 cm) konsantrasyonlar izlemiş, en kısa kökler ise kontrol grupta (15.02 cm) belirlenmiştir. Buradaki sonuçlardan da görüleceği gibi, mutagenin tüm konsantrasyonları kök uzunluğu artırmıştır (Çizelge 4.19).

Kök uzunluğu üzerine EMS'nin uygulama süresinin etkisi kullanılan konsantrasyona göre farklılık göstermiştir. Bu nedenle uygulama süresi $\times$ konsantrasyonun etkisi çok önemli ($P<0.01$) olmuştur (Çizelge 4.17). En yüksek kök uzunluğu 10 dakikalık uygulama süresinde %0.0'lik konsantrasyonda; 3 ve 9 saatlik uygulamada %0.2'lik konsantrasyonda ve 6 saatlik uygulama süresi ise %0.3'lük konsantrasyondan gözlenmiştir. En düşük kök uzunluğu ise 10 dakikalık ve 6 saatlik uygulama sürelerinde %0.2'lik konsantrasyonda; 3 ve 9 saatlik uygulamalarda ise %0.0'lik konsantrasyondan elde edilmiştir (Çizelge 4.18).

d. Sürgün uzunluğu

Sürgün uzunluğu üzerine EMS'nin uygulama süresi ve konsantrasyonu ile bu iki faktör arasındaki interaksiyon, çok önemli ($P<0.01$) olmuştur (Çizelge 4.18).

Uygulama süresi esas alındığında, en yüksek sürgün uzunluğu 30.98 cm ile 10 dakikalık uygulamada gerçekleşmiş, bunu 30.66 cm ile 3 saat, 29.89 cm ile 6 saat ve 27.84 cm ile 9 saatlik uygulama süreleri izlemiştir. Buna göre uygulama süresi uzadıkça sürgün uzunluğunda belirgin bir kısalma gerçekleşmiştir (Çizelge 4.19).

Ortalamalar esas alınarak konsantrasyonlara göre değerlendirildiğinde, mutagenin tüm konsantrasyonlarının sürgün uzunluğunu artırdığı tespit edilmiştir. Nitekim, kontrolde 28.30 cm olan sürgün uzunluğu %0.1'lik konsantrasyonda 29.56 cm'ye, %0.4'lük konsantrasyonda 29.89 cm'ye, %0.2'lik konsantrasyonda 30.70 cm'ye, %0.3'lük konsantrasyonda ise 30.75 cm'ye yükselmiş ve kontrol ile diğer tüm konsantrasyonlar arasındaki farklılıklar çok önemli olmuştur (Çizelge 4.19).

Sürgün uzunluğu üzerine EMS'nin uygulama süresinin etkisi kullanılan konsantrasyona göre farklılık göstermiştir. Bu nedenle uygulama süresi $\times$ konsantrasyonun etkisi çok önemli ($P < 0.01$) olmuştur (Çizelge 4.17). En yüksek sürgün uzunluğu 10 dakikalık ve yine 3 ve 6 saatlik uygulama sürelerinde %0.3'lük, 9 saatlik uygulamada %0.2'lik konsantrasyonda gözlenmiştir. En düşük sürgün uzunluğu ise 10 dakikalık uygulama sürresinde %0.1'lik konsantrasyonda; 3, 6 ve 9 saatlik uygulamalarda ise %0.0'lik konsantrasyondan elde edilmiştir (Çizelge 4.18).

e. Fide boyu

Fide boyu üzerine etil metansülfonatin uygulama süresi ve konsantrasyonu ile bu iki faktör arasındaki interaksiyon çok önemli ($P < 0.01$) olmuştur (Çizelge 4.18).

Ortalamalar esas alınarak uygulama süresine göre değerlendirildiğinde, en uzun fide boyu 48.09 cm ile 6 saatlik uygulamadan elde edilmiş, bunu 46.66 cm ile 3 saat, 44.92 cm ile 10 dakikalık uygulamalar izlemiştir. Bu karakter bakımından son sırada 44.38 cm ile 9 saatlik uygulama yer almıştır (Çizelge 4.19).

Konsantrasyonların ortalamaları dikkate alınarak değerlendirildiğinde, en uzun fide boyunun 48.17 cm ile %0.3'lük konsantrasyonda elde edildiği, bunu %0.2 (47.09 cm), %0.4 (45.98 cm) ve %0.1'lik (45.50 cm) konsantrasyonlar takip etmiştir. En kısa fide boyu 43.32 cm ile kontrol gruptan elde edilmiş, ancak bu konsantrasyon ile %0.1 ve %0.4'lük konsantrasyonlar arasındaki farklılıklar önemsiz olmuştur (Çizelge 4.19).

Fide boyu üzerine EMS'nin uygulama süresinin etkisi kullanılan konsantrasyona göre farklılık göstermiştir. Bu nedenle uygulama süresi $\times$ konsantrasyonun etkisi çok önemli ($P < 0.01$) olmuştur (Çizelge 4.17). En yüksek fide boyu 10 dakikalık ve yine 6 saatlik uygulama sürelerinde %0.3'lük konsantrasyonda; 3 ve 9 saatlik uygulamalarda %0.2'lik konsantrasyonda gözlenmiştir. En düşük fide boyu ise 10 dakikalık uygulama sürresinde %0.1'lik konsantrasyonda; 3 ve 9 saatlik uygulama sürelerinde %0.0'lik konsantrasyonda; 6 saatlik uygulamada ise %0.2'lik konsantrasyondan elde edilmiştir (Çizelge 4.18).

4) Optimum dozun (LD_{50}) tespit edilmesi

Kimyasal mutagenlerin optimum konsantrasyonunun ve uygulama süresinin belirlenmesinde LD_{50} (letal doz) kriteri esas alınmıştır. Tahıllarda LD_{50} değerinin belirlenmesinde M_1 kuşağında çimlenme oranı, çıkış oranı ve fide boyu gib karakterlerden yararlanılabilmektedir (Tosun 2015). Bu nedenle, burada söz konusu karakterler yönünden LD_{50} değeri incelenmiştir. Bu çalışmada farklı süre ve konsantrasyonlarda uygulanan EMS bir çok karakteri olumlu yönde etkilemiş, dolayısıyla kontrole göre artışa neden olmuştur. Bu nedenle araştırmada uygulanan süre ve konsantrasyonlara göre LD_{50} değeri belirlenememiştir. Normalde literatürlere göre önerilen konsantrasyon %0.3, süre ise 6 saat olup, bu denemede bu konsantrasyonun hem altı hem de üstü alınmış, ancak yinede LD_{50} değeri oluşmamıştır. Bu durumda ileride yapılacak çalışmalarda daha yüksek konsantrasyonlar uygulanarak LD_{50} değerinin tespit edilmesi önerilebilir.

4.2.1.b. Sodyum azit (NaN_3) uygulaması

1) Çimlenme ile ilgili karakterler

Tohumlar ortama konulduktan 1-10 gün sonra çimlenmeye başlamışlar ve 14 gün boyunca bu ortamda tutularak gelişmeleri sağlanmıştır.

a. Çimlenme hızı (%)

Çimlenme hızı üzerine sodyum azit uygulama süresi ve konsantrasyonu ile bu iki faktör arasındaki interaksiyon çok önemli ($P<0.01$) olmuştur (Çizelge 4.21).

Çimlenme hızı üzerine mutagenin çok belirgin bir etkisi olmuştur. Uygulama süresi uzadıkça çimlenme hızı azalmış ve en yüksek çimlenme hızı (%100) 10 dakikalık uygulamada, en düşük (%63.60) ise 3 saatlik uygulama süresinde elde edilmiştir. Diğer taraftan, %70.20 ve %63.60 hızı sırayla 2 ve 3 saatlik uygulama sürelerinde çimlenme olmuştur (Çizelge 4.22).

Ortalamalar esas alınarak konsantrasyonlara göre değerlendirildiğinde, en yüksek çimlenme hızının (%99.80) kontrolde (%0), en düşük ise (%55.50) 2 mM'lık konsantrasyonda gerçekleştiği tespit edilmiştir. Diğer taraftan, çimlenme hızı 0.5 mM'lık konsantrasyonda %99.30, 1 mM'lık konsantrasyonda %80.80, 1.5 mM'lık konsantrasyonda ise %58.80 olmuştur. Bununla birlikte, 1.5 mM'lık konsantrasyon ile 2 mM'lık konsantrasyonlar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemsiz olmuştur (Çizelge 4.22).

Çimlenme hızı üzerine sodyum azitin uygulama süresinin etkisi kullanılan konsantrasyona göre farklılık göstermiştir. Bu nedenle uygulama süresi $\times$ konsantrasyonun etkisi çok önemli ($P<0.01$) olmuştur (Çizelge 4.21). En yüksek çimlenme hızı 10 dakikalık, 2 ve 3 saatlik uygulama sürelerinde kontrol konsantrasyondan elde edilmiş, diğer taraftan 1 saatlik uygulama süresi ise 0.5 ve 1 mM'lık konsantrasyonda elde edilmiştir. En düşük çimlenme hızı ise 1 saatlik uygulamada 1.5 mM'lık konsantrasyonda; 2 ve 3 saatlik uygulamalarda 2 mM'lık konsantrasyondan belirlenmiştir (Çizelge 4.22).



Çizelge 4.21. Tohuma farklı süre ve dozlarda sodyum azit uygulamasından sonra çimlenme ile ilgili bazı karakterlere ait varyans analizi sonuçları.

Varyasyon Kaynağı	Kareler ortalaması							
	SD	ÇH	ÇG	ÇO	CHK	OÇZ	ÇHİ	ÇGİ
Süre (saat)	3	5074.66**	372.46**	2.40	4043.96**	17.58**	204.31**	2124314.12**
Konsantrasyon (mM)	4	7223.20**	305.50**	1.00	3449.06**	17.63**	176.58**	2743490.61**
Süre × Konsantrasyon	12	1136.00**	207.63**	2.06	251.03**	2.10**	14.15**	324419.44**
Hata	60	56.93	25.13	2.26	19.00	0.06	1.64	43627.18
Toplam	80							

** : p<0.01 düzeyinde önemlidir.

Çizelge 4.22. Tohuma farklı süre ve dozlarda sodyum azit uygulamasından sonra çimlenme ile ilgili bazı karakterlere ait veriler.

Süre (dakika/saat)	Konsantrasyon (mM)	ÇH (%)	ÇG (%)	ÇO (%)	ÇHK	OÇZ (gün)	ÇHİ	ÇGİ
10 dakika	0	100.00	100.00	100.00	73.11 ^a	1.38 ^d	34.41 ^a	2453.10 ^a
	0.5	100.00	100.00	100.00	60.46 ^b	1.66 ^c	31.66 ^b	1870.50 ^b
	1	100.00	100.00	100.00	61.34 ^b	1.65 ^c	31.87 ^b	1979.50 ^b
	1.5	100.00	100.00	100.00	65.99 ^{ab}	1.52 ^b	33.08 ^{ab}	1971.50 ^b
	2	100.00	100.00	100.00	61.91 ^b	1.62 ^a	31.75 ^b	2081.50 ^{ab}
	Ortalama	100.00^{A1}	100.00^A	100.00	64.56^A	1.56^D	32.55^A	2071.22^A
1	0	99.00 ^{a1}	99.0 ^a	99.00	75.30 ^a	1.33 ^d	34.70 ^a	2488.36 ^a
	0.5	100.00 ^a	100.0 ^a	100.00	42.61 ^b	2.37 ^c	27.97 ^b	2265.00 ^{ab}
	1	100.00 ^a	100.0 ^a	100.00	44.51 ^b	2.25 ^c	28.47 ^b	2011.50 ^{bc}
	1.5	49.00 ^c	100.0 ^a	100.00	28.66 ^c	3.49 ^b	23.90 ^c	1768.50 ^c
	2	59.00 ^b	94.0 ^b	98.00	22.74 ^d	4.39 ^a	22.51	947.240 ^d
	Ortalama	81.40^B	98.6^A	99.40	42.77^B	2.76^C	27.51^B	1896.12^B
2	0	100.00 ^a	100.0 ^a	100.00	66.69 ^a	1.51 ^d	33.08 ^a	2218.00 ^a
	0.5	99.00 ^a	99.0 ^a	99.00	42.64 ^b	2.35 ^c	27.02 ^b	1530.78 ^b
	1	73.00 ^b	99.0 ^a	99.00	34.91 ^c	2.91 ^b	25.68 ^b	1480.50 ^b
	1.5	44.00 ^c	93.0 ^b	99.00	22.88 ^d	4.38 ^a	22.76 ^c	1150.00 ^c
	2	35.00 ^c	99.0 ^a	100.00	21.84 ^d	4.58 ^a	22.13 ^c	1065.00 ^c
	Ortalama	70.20^C	98.0^A	99.40	37.79^C	3.14^B	26.13^C	1488.85^C
3	0	100.0 ^a	100.0 ^a	100.00	58.45 ^a	1.72 ^e	30.58 ^a	2034.00 ^a
	0.5	98.0 ^a	98.0 ^a	98.00	35.78 ^b	2.80 ^d	26.35 ^b	1907.28 ^a
	1	50.0 ^b	99.0 ^a	99.00	28.20 ^c	3.64 ^c	25.68 ^b	1192.60 ^b
	1.5	42.0 ^{bc}	90.0 ^a	100.00	20.86 ^d	4.81 ^b	23.13 ^c	1079.50 ^b
	2	28.0 ^c	65.0 ^b	99.00	16.67 ^d	6.01 ^a	21.81 ^c	719.34 ^c
	Ortalama	63.60^D	90.4^B	99.20	31.99^D	3.79^A	25.51^C	1386.54^C
Ortalama Konsantrasyon (mM)	0	99.80 ^A	99.80 ^A	99.80	68.39 ^A	1.48 ^E	33.19 ^A	2298.36 ^A
	0.5	99.30 ^A	99.30 ^{AB}	99.30	45.37 ^B	2.29 ^D	28.25 ^B	1893.39 ^B
	1	80.80 ^B	99.50 ^A	99.50	42.24 ^C	2.61 ^C	27.93 ^B	1666.02 ^C
	1.5	58.80 ^C	95.80 ^B	99.80	34.60 ^D	3.55 ^B	25.72 ^C	1492.37 ^D
	2	55.50 ^C	89.50 ^C	99.30	30.79 ^E	4.15 ^A	24.55 ^D	1203.27 ^E
LD₅₀ değeri		49.90	49.90	49.90	34.19	0.74	16.59	1149.18

1: Aynı sütunda aynı büyük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemsizdir.

2: Aynı sütunda aynı küçük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemsizdir.

b. Çimlenme gücü (%)

Çimlenme gücü üzerine mutagenin hem uygulama süresinden hem de konsantrasyondan ve bu iki faktör arasındaki interaksyon da çok önemli ($P<0.01$) derecede etkilenmiştir (Çizelge 4.21).

Ortalamalar esas alınarak uygulama süresine göre değerlendirildiğinde en yüksek çimlenme gücü %100 ile 10 dakikalık uygulamadan elde edilmiş, bunu %98.60 ile 1 saat ve %98.00 ile 2 saatlik uygulamalar izlemiştir. Bu karakter bakımından 3 saatlik uygulama %90.40 ile son sırada yer almıştır (Çizelge 4.22).

Konsantrasyonların kendi içerisindeki ortalamaları incelendiğinde, kontrolde %99.80 olan çimlenme gücünün, 1 mM'lık konsantrasyonda %99.50'ye, 0.5 mM'lık konsantrasyonda %99.30'a, 1.5 mM'lık konsantrasyonda %95.80'e, 2 mM'lık konsantrasyonda ise %89.50'ye düştüğü tespit edilmiştir (Çizelge 4.22).

Çimlenme gücü üzerine sodyum azitin uygulama süresinin etkisi kullanılan konsantrasyona göre farklılık göstermiştir. Bu nedenle uygulama süresi $\times$ konsantrasyonun etkisi çok önemli ($P<0.01$) olmuştur (Çizelge 4.21). En yüksek çimlenme gücü 10 dakikalık, 2 ve 3 saatlik uygulama sürelerinde kontrol konsantrasyondan elde edilmiş, diğer taraftan 1 saatlik uygulama süresi ise 0.5 ve 1 ve 1.5 mM'lık konsantrasyonda elde edilmiştir. En düşük çimlenme gücü ise 1 ve 3 saatlik uygulamalarda 2 mM'lık konsantrasyonda ve 2 saatlik uygulamada ise 1.5 mM'lık konsantrasyonda belirlenmiştir (Çizelge 4.22).

c. Çimlenme oranı

Çimlenme oranı üzerine etil metansülfonatin uygulama süresi ve konsantrasyonu hem de süre $\times$ konsantrasyon interaksyonu önemsiz olmuştur (Çizelge 4.21).

Çimlenme oranı üzerine uygulama süresinin belirgin bir etkisi olmamıştır. Nitekim, çimlenme oranı 10 dakikalık uygulamada %100 olmuş, bunu küçük farklılıkla 1 ve 2 saatlik (%99.40) uygulama süreleri izlemiş, son sırada ise %99.20 ile 3 saatlik uygulama yer almıştır (Çizelge 4.22).

Ortalamalar esas alınarak konsantrasyonlara göre değerlendirildiğinde, en yüksek çimlenme oranının (%99.80) kontrol (%0) ve 1.5 mM'lık konsantrasyonda, en düşük (%99.30) ise 1 ve 2 mM'lık konsantrasyonlarda gerçekleştiği tespit edilmiştir. Bununla birlikte, 0 ve 1.5 mM'lık konsantrasyonlar arasındaki farklılıkların ve yine 0.5 ve 2 mM'lık konsantrasyonlar arasındaki farklılıkların önemsiz olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.22).

d. Çimlenme hızı katsayısı

Çimlenme hızı katsayısı üzerine sodyum azitin uygulama süresi ve konsantrasyonu ile bu iki faktör arasındaki interaksiyon çok önemli ($P<0.01$) olmuştur (Çizelge 4.21).

Ortalamalar esas alınarak süreler göre değerlendirildiğinde, en yüksek çimlenme hızı katsayısı (64.56) 10 dakikalık uygulamada, en düşük (31.99) ise 3 saatlik uygulama süresinde elde edilmiştir. Diğer taraftan, çimlenme hızı katsayısı 1 saatlik uygulamada 42.77'ye, 2 saatlik uygulamada 37.79'a ve 3 saatlik uygulamada ise 31.99'a düşmüştür (Çizelge 4.22).

En yüksek çimlenme hızı katsayısı 68.39 ile kontrol grupta tespit edilmiş, bunu yüksek farklılıklarla 0.5 mM (45.37), 1 mM (42.24), 1.5 mM (34.60) ve 2 mM'lık (30.79) konsantrasyonlar takip etmiştir (Çizelge 4.22).

Çimlenme hızı katsayısı sodyum azitin uygulama süresinin etkisi kullanılan konsantrasyona göre farklılık göstermiştir. Bu nedenle uygulama süresi $\times$ konsantrasyonun etkisi çok önemli ($P<0.01$) olmuştur (Çizelge 4.21). En yüksek çimlenme hızı katsayısı 10 dakikalık, 1, 2 ve 3 saatlik uygulama sürelerinde kontrol

konsantrasyondan elde edilmiştir. En düşük çimlenme hızı katsayısı 10 dakikalık uygulama süresinde 0.5 mM, 1, 2 ve 3 saatlik uygulamalarda 2 mM'lık konsantrasyonda belirlenmiştir (Çizelge 4.22).

e. Ortalama çimlenme zamanı

Ortalama çimlenme zamanı üzerine sodyum azitin uygulama süresi ve konsantrasyonu ile bu iki faktör arasındaki interaksiyon çok önemli ($P<0.01$) olmuştur (Çizelge 4.21).

Ortalamalar esas alınarak süreler göre değerlendirildiğinde, en uzun ortalama çimlenme zamanı 3.79 gün ile 3 saatlik uygulamadan elde edilmiş, bunu 3.14 gün ile 2 saat, 2.76 gün ile 1 saat ve 1.56 gün ile 10 dakika uygulama süreleri izlemiştir Buna göre, uygulamanın süresi uzadıkça çimlenme zamanı gecikmiştir (Çizelge 4.22).

Kontrolde 1.48 gün olan ortalama çimlenme zamanı sodyum azitin konsantrasyonu arttıkça uzamıştır. Nitekim, ortalama çimlenme zamanı 0.5 mM'lık konsantrasyonda 2.29 gün, 1 mM'lık konsantrasyonda 2.61 gün, 1.5 mM'lık konsantrasyonda 3.55 gün, 2 mM'lık konsantrasyonda ise 4.15 gün olmuştur (Çizelge 4.22).

Ortalama çimlenme zamanı sodyum azitin uygulama süresinin etkisi kullanılan konsantrasyona göre farklılık göstermiştir. Bu nedenle uygulama süresi $\times$ konsantrasyonun etkisi çok önemli ($P<0.01$) olmuştur (Çizelge 4.21). En yüksek ortalama çimlenme zamanı 10 dakikalık uygulama süresinde 0.5 mM, 1, 2 ve 3 saatlik uygulamalarda 2 mM'lık konsantrasyonda belirlenmiştir. En düşük ortalama çimlenme zamanı 10 dakikalık, 1, 2 ve 3 saatlik uygulama sürelerinde kontrol konsantrasyondan elde edilmiştir (Çizelge 4.22).

f. Çimlenme hızı indeksi

Çimlenme hızı indeksi üzerine mutagenin uygulama süresi ve konsantrasyonu ile bu iki faktör arasındaki interaksiyonun etkisi çok önemli ($P<0.01$) olmuştur (Çizelge 4.21).

Uygulama sürelerinin ortalamalarına göre, çimlenme hızı indeksi 10 dakikalık uygulamada 32.55 olarak tespit edilmiş, bunu azalan sıra ile 1 saat (27.51), 2 saat (26.13) ve 3 saatlik (25.51) uygulama süreleri izlemiştir. Diğer taraftan, 2 ve 3 saatlik uygulamalar arasındaki farklılıklar önemsiz olmuştur (Çizelge 4.22).

Ortalamalar esas alınarak konsantrasyonlara göre değerlendirildiğinde, en yüksek çimlenme hızı indeksi 33.19 ile kontrol grupta tespit edilmiş, bunu 0.5 mM (28.25), 1 mM (27.93), 1.5 mM (25.72) ve 2 mM'lık (24.55) konsantrasyonlar takip etmiştir. Buna göre, sodyum azitin konsantrasyonu arttıkça çimlenme hızı indeksi azalmıştır (Çizelge 4.22).

Çimlenme hızı indeksi sodyum azitin uygulama süresinin etkisi kullanılan konsantrasyona göre farklılık göstermiştir. Bu nedenle uygulama süresi $\times$ konsantrasyonun etkisi çok önemli ($P<0.01$) olmuştur (Çizelge 4.21). En yüksek çimlenme hızı indeksi 10 dakikalık, 1, 2 ve 3 saatlik uygulama sürelerinde kontrol konsantrasyondan elde edilmiştir. En düşük çimlenme hızı indeksi 10 dakikalık uygulama süresinde 0.5 mM, 1, 2 ve 3 saatlik uygulamalarda 2 mM'lık konsantrasyonda belirlenmiştir (Çizelge 4.22).

g. Çimlenme gücü indeksi

Çimlenme gücü indeksi üzerine mutagenin uygulama süresi ve konsantrasyonu ile bu iki faktör arasındaki interaksiyon çok önemli ($P<0.01$) olmuştur (Çizelge 4.21).

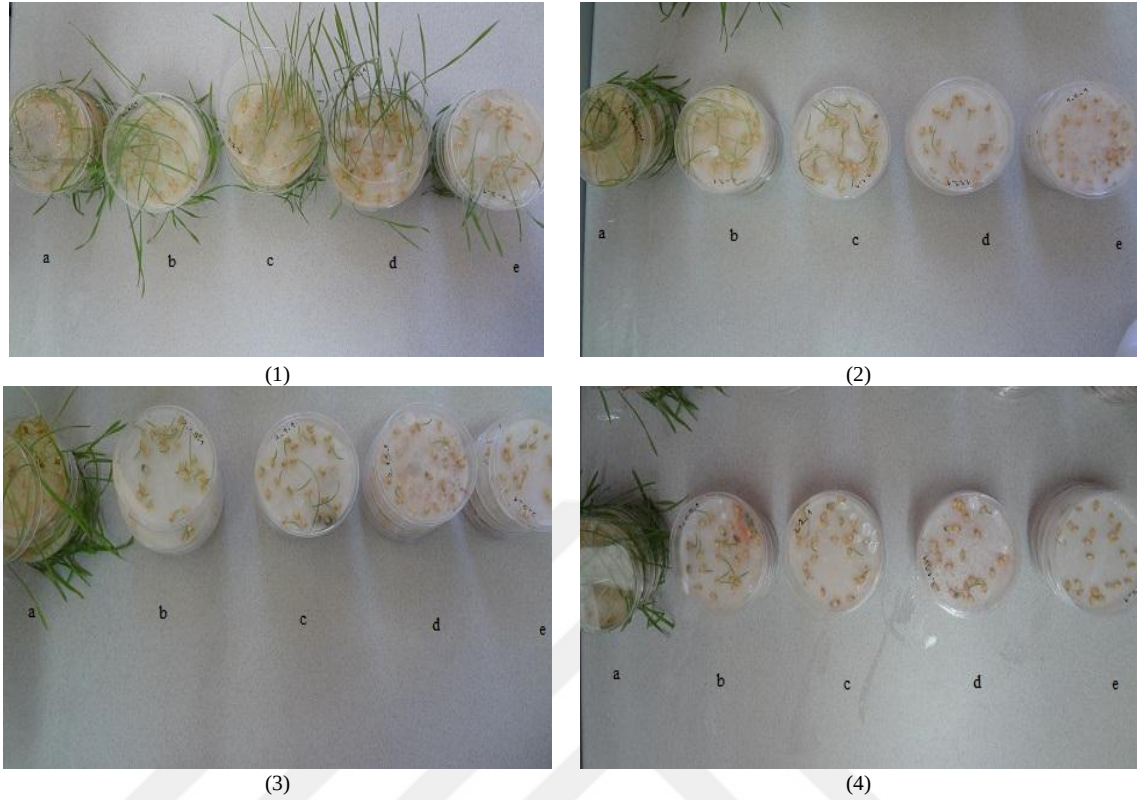
Ortalamalar esas alınarak sürelerle göre değerlendirildiğinde, en yüksek çimlenme gücü indeksi, 10 dakikalık uygulamadan (2071.22) elde edilmiş, bunu 1896.13 ile 1 saat, 1488.85 ile 2 saat ve 1386.54 ile 3 saatlik uygulama süreleri izlemiştir. Bununla birlikte, 2 ve 3 saatlik uygulama süreleri arasındaki farklılıklar istatistiksel anlamda önemsiz olmuştur. Burada sunulan verilerden de anlaşılacağı gibi, mutagenin uygulama süresinin uzaması çimlenme gücü indeksini azaltmıştır (Çizelge 4.22).

Mutagenin uygulama süresinde olduğu gibi, uygulanan konsantrasyon arttıkça çimlenme gücü indeksi azalmıştır. Nitekim, en yüksek çimlenme gücü indeksi 2298.36 ile kontrol grupta tespit edilmiş, 0.5 mM (1893.39), 1 mM (1666.02), 1.5 mM (1492.37) ve 2 mM'lık (1203.27) konsantrasyonlar takip etmiştir (Çizelge 4.22).

Çimlenme gücü indeksi sodyum azitin uygulama süresinin etkisi kullanılan konsantrasyona göre farklılık göstermiştir. Bu nedenle uygulama süresi $\times$ konsantrasyonun etkisi çok önemli ($P < 0.01$) olmuştur (Çizelge 4.21). En yüksek gücü indeksi 10 dakikalık, 1, 2 ve 3 saatlik uygulama sürelerinde kontrol konsantrasyondan elde edilmiştir. En düşük çimlenme gücü indeksi 10 dakikalık uygulama süresinde 0.5 mM, 1, 2 ve 3 saatlik uygulamalarda 2 mM'lık konsantrasyonda belirlenmiştir (Çizelge 4.22).

2) Çim ile ilgili karakterler

Tohumlar ortama konulduktan yaklaşık ikinci günün sonunda kökler meydana gelmiştir. Mutagenin uygulama süresi ve konsantrasyonu arttıkça kök oluşumunun gerçekleştiği gözlenmiştir (Şekil 4.33).



Şekil 4.33. Sodyum azitin farklı süre ve konsantrasyonlarında meydana gelen kök ve sürgünlerin görünümleri.

1: a) 10 dakika + 0 mM b) 10 dakika + 0.5 mM, c) 10 dakika + 1 mM, d) 10 dakika + 1.5 mM, e) 10 dakika + 2 mM,

2: a) 1 saat + 0 mM b) 1 saat + 0.5 mM, c) 1 saat + 1 mM, d) 1 saat + 1.5 mM, e) 1 saat + 2 mM,

3: a) 2 saat + 0 mM b) 2 saat + 0.5 mM, c) 2 saat + 1 mM, d) 2 saat + 1.5 mM, e) 2 saat + 2 mM,

4: a) 3 saat + 0 mM b) 3 saat + 0.5 mM, c) 3 saat + 1 mM, d) 3 saat + 1.5 mM, e) 3 saat + 2 mM konsantrasyonlarda kök ve sürgün görünümleri.

a. Kök sayısı

Kök sayısı üzerine sodyum azitin uygulama süresi ve konsantrasyonu ile bu iki faktör arasındaki interaksiyon çok önemli ($P < 0.01$) olmuştur (Çizelge 4.23).

En fazla kök sayısı 4.78 adet ile 10 dakikalık uygulamadan elde edilmiş, bunu azalan sıra ile 1 saat (3.79 adet), 2 saat (3.84 adet) ve 3 saatlik (3.40 adet) uygulama süreleri takip etmiştir. Bununla birlikte, 1 ve 2 saatlik uygulamalar arasındaki farklılıklar istatistiksel anlamda önemsiz olmuştur (Çizelge 4.24).

Ortalama dikkate alınarak konsantrasyonlara göre değerlendirilme yapıldığında, kontrol grupta 4.73 adet olan kök sayısı 0.5 mM'lık konsantrasyonda 4.39'a, 1 mM'lık konsantrasyonda 4.16'ya, 1.5 mM'lık konsantrasyonda ise 3.50'ye, 2 mM'lık konsantrasyonda ise 2.99'a düşmüştür. Bununla birlikte, 0.5 ve 1 mM'lık konsantrasyonlar arasındaki farklılıklar istatistiksel anlamda önemsiz olmuştur (Çizelge 4.24).

Kök sayısı üzerine sodyum azitin uygulama süresinin etkisi kullanılan konsantrasyona göre farklılık göstermiştir. Bu nedenle uygulama süresi $\times$ konsantrasyonun etkisi çok önemli ($P<0.01$) olmuştur (Çizelge 4.23). En yüksek kök sayısı 10 dakikalık uygulama süresinde 1 mM, ancak 1, 2 ve 3 saatlik uygulama sürelerinde kontrol konsantrasyondan elde edilmiştir. En düşük kök sayısı 10 dakikalık uygulama süresinde 0.5 mM'lık konsantrasyonda; 1 ve 3 saatlik uygulamalarda 2 mM'lık konsantrasyonda ve 2 saatlik uygulama süresi ise 1.5 mM'lık konsantrasyondan belirlenmiştir (Çizelge 4.24).

Çizelge 4.23. Tohuma farklı süre ve dozlarda sodyum azit uygulamasından sonra çim ile ilgili bazı karakterlere ait varyans analizi sonuçları.

Varyasyon Kaynağı	Kareler ortalaması									
	SD	KS	KU	SU	KOU	ÇU	KYA	KKA	SYA	SKA
Süre (saat)	3	6.86**	12.02**	170.85**	2.45**	206.39**	0.00093**	0.0000060**	0.00185**	0.000008**
Konsantrasyon (%)	4	7.86**	51.18**	192.93**	7.51**	275.62**	0.00086**	0.0000059**	0.00234**	0.000011**
Süre × Konsantrasyon	12	1.90**	8.38**	21.72**	1.30**	32.48**	0.00016**	0.0000006**	0.00010	0.0000005**
Hata	60	0.21	1.91	3.25	0.24	4.44	0.00002	0.00000007	0.00005	0.0000001
Toplam	80									

*, p<0.05; **: p<0.01 düzeyinde önemlidir.

Çizelge 4.24. Tohuma farklı süre ve dozlarda sodyum azit uygulamasından sonra çim ile ilgili bazı karakterlere ait veriler.

Süre (dakika/saat)	Konsantrasyon (mM)	KS (adet)	KU (cm)	SU (cm)	KOU (cm)	ÇU (cm)	KYA (g)	KKA (g)	SYA (g)	SKA (g)
10 dakika	0	4.65 ^{ab}	8.06 ^a	19.14 ^a	5.40	24.53 ^a	0.0273 ^{ab}	0.0905 ^a	0.0039	0.0046 ^a
	0.5	4.30 ^b	4.31 ^b	13.96 ^b	4.75	18.70 ^b	0.0259 ^{ab}	0.0679 ^b	0.0028	0.0034 ^b
	1	5.20 ^a	6.16 ^{ab}	14.65 ^b	5.15	19.79 ^b	0.0259 ^{ab}	0.0700 ^b	0.0018	0.0024 ^c
	1.5	4.95 ^a	4.38 ^b	14.47 ^b	5.25	19.71 ^b	0.0213 ^b	0.0647 ^b	0.0012	0.0018 ^c
	2	4.80 ^{ab}	6.20 ^{ab}	15.78 ^{ab}	5.045	20.81 ^{ab}	0.0292 ^a	0.0675 ^b	0.0013	0.0017 ^c
1	Ortalama	4.78^A	5.82^A	15.60^A	5.11^A	20.71^A	0.0259^A	0.0721^A	0.0022^A	0.0028^A
	0	4.50 ^a	5.67 ^a	18.93 ^a	6.19 ^a	25.11 ^a	0.0342 ^{ab}	0.0833 ^a	0.0018	0.0036 ^a
	0.5	4.00 ^{ab}	6.67 ^a	16.60 ^{ab}	6.059 ^a	22.65 ^{ab}	0.0352 ^a	0.0632 ^b	0.0013	0.0024 ^{bc}
	1	4.40 ^a	5.60 ^a	14.65 ^b	5.479 ^a	20.11 ^{bc}	0.0244 ^{bc}	0.0579 ^b	0.0013	0.0026 ^b
	1.5	3.65 ^b	4.10 ^{ab}	12.26 ^c	5.439 ^a	17.68 ^c	0.0159 ^c	0.0515 ^b	0.0010	0.0019 ^{cd}
2	2	2.40 ^c	2.16 ^b	5.76 ^d	3.91 ^b	9.66 ^d	0.0159 ^c	0.0387 ^c	0.0006	0.0015 ^d
	Ortalama	3.79^B	4.84^B	13.64^B	5.40^A	19.04^B	0.0251^A	0.0589^B	0.0012^B	0.0024^B
	0	5.00 ^a	7.32 ^a	16.12 ^a	6.06 ^a	22.18 ^a	0.0396 ^a	0.0832 ^a	0.0018	0.0023 ^a
	0.5	4.85 ^a	3.78 ^{bc}	10.38 ^b	5.08 ^b	15.46 ^b	0.0130 ^b	0.0509 ^b	0.0013	0.0021 ^{ab}
	1	3.70 ^b	4.58 ^b	10.23 ^{bc}	4.75 ^{bc}	14.97 ^b	0.0099 ^b	0.0560 ^b	0.0016	0.0017 ^b
3	1.5	2.75 ^c	2.85 ^c	7.75 ^{cd}	3.90 ^d	11.65 ^c	0.0112 ^b	0.0501 ^b	0.0007	0.0011 ^c
	2	2.90 ^{bc}	2.75 ^c	6.60 ^d	4.05 ^{cd}	10.65 ^c	0.0106 ^b	0.0494 ^b	0.0011	0.0011 ^c
	Ortalama	3.84^B	4.25^B	10.21^C	4.77^B	14.98^C	0.0169^B	0.0579^B	0.0013^B	0.0016^C
	0	4.75 ^a	9.38 ^a	14.63 ^a	5.71 ^a	20.34 ^a	0.0252 ^a	0.0628 ^a	0.0016	0.0029 ^a
	0.5	4.40 ^a	4.51 ^b	13.70 ^a	5.80 ^a	19.50 ^a	0.0154 ^b	0.0492 ^b	0.0014	0.0013 ^b
Ortalama Konsantrasyon (mM)	1	3.35 ^b	3.24 ^c	7.62 ^b	4.43 ^b	12.05 ^b	0.0089 ^{bc}	0.0468 ^{bc}	0.0008	0.0011 ^{bc}
	1.5	2.65 ^b	2.19 ^{cd}	6.93 ^b	3.87 ^c	10.79 ^b	0.0049 ^c	0.0468 ^{bc}	0.0005	0.0008 ^{cd}
	2	1.85 ^c	1.27 ^d	3.93 ^c	3.33 ^d	7.26 ^c	0.0040 ^c	0.0382 ^c	0.0004	0.0006 ^d
	Ortalama	3.40^C	4.12^B	9.36^C	4.63^B	13.98^C	0.0117^C	0.0487^C	0.0009^C	0.0013^D
	0	4.73 ^A	7.60 ^A	17.20 ^A	5.84 ^A	23.04 ^A	0.0316 ^A	0.0799 ^A	0.0023 ^A	0.0034 ^A
LD ₅₀ değeri	0.5	4.39 ^B	4.82 ^B	13.66 ^B	5.42 ^B	19.08 ^B	0.0224 ^B	0.0578 ^B	0.0017 ^B	0.0023 ^B
	1	4.16 ^B	4.89 ^B	11.78 ^C	4.95 ^C	16.73 ^C	0.0173 ^C	0.0577 ^B	0.0013 ^C	0.0019 ^C
	1.5	3.50 ^C	3.38 ^C	10.35 ^D	4.61 ^C	14.96 ^D	0.0133 ^D	0.0533 ^{BC}	0.0008 ^D	0.0014 ^D
	2	2.99 ^D	3.09 ^C	8.02 ^E	4.08 ^D	12.09 ^E	0.0149 ^{CD}	0.0484 ^C	0.0008 ^D	0.0012 ^D
	Ortalama	2.36	3.80	8.60	2.94	11.52	0.0158	0.0399	0.0011	0.0017

¹: Aynı sütunda aynı büyük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemsizdir.

²: Her bir uygulama süresi için aynı sütunda aynı küçük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemsizdir.

b. Kök uzunluğu

Kök uzunluğu üzerine mutagenin hem uygulama süresinden hem de konsantrasyondan ve bu iki faktör arasındaki etkileşim de çok önemli ($P<0.01$) derecede etkilenmiştir (Çizelge 4.23).

Uygulama süresi uzadıkça kök uzunluğu azalmıştır. Nitekim, en fazla kök uzunluğu 5.82 cm ile 10 dakikalık uygulama süresinden elde edilmiş, bunu 4.84 cm ile 1 saat, 4.25 cm ile 2 saat ve 4.12 cm ile 3 saatlik uygulama süreleri izlemiştir. Bununla birlikte, 1 ve 2 saatlik uygulamalar arasındaki farklılıklar istatistiksel anlamda önemsiz olmuştur (Çizelge 4.24). (Çizelge 4.24).

Konsantrasyonların ortalamalarına göre, en uzun kökler 7.60 cm ile kontrol grupta tespit edilmiş, bunu 4.89 cm ile 1 mM'lık, 4.80 cm ile 0.5 mM'lık, 3.38 cm ile 1.5 mM'lık ve 3.09 cm ile 2 mM'lık konsantrasyonlar izlemiştir. Bununla birlikte, 0.5 ve 1 mM'lık konsantrasyonlar arasındaki farklılıklar istatistiksel anlamda önemsiz olmuştur. Burada verilen bilgilerden de anlaşılacağı gibi mutagenin konsantrasyonu arttıkça kök uzunluğu azalmıştır (Çizelge 4.24).

Kök uzunluğu üzerine sodyum azitin uygulama süresinin etkisi kullanılan konsantrasyona göre farklılık göstermiştir. Bu nedenle uygulama süresi $\times$ konsantrasyonun etkisi çok önemli ($P<0.01$) olmuştur (Çizelge 4.23). En yüksek kök uzunluğu 10 dakikalık, 2 ve 3 saatlik uygulama sürelerinde kontrol konsantrasyondan elde edilmiş, ancak 1 saatlik uygulama süresi ise 0.5 mM'lık konsantrasyonda elde edilmiştir. En düşük kök uzunluğu 10 dakikalık uygulama süresinde 0.5 mM'lık konsantrasyonda; 1 ve 3 saatlik uygulamalarda 2 mM'lık konsantrasyonda ve 2 saatlik uygulama süresi ise 2 mM'lık konsantrasyonda belirlenmiştir (Çizelge 4.24).

c. Sürgün uzunluğu

Tohumlar ortama konulduktan 1-5 günün sonunda sürgünler meydana gelmiştir.

Uygulama süresi ve konsantrasyonu arttıkça sürgün oluşumu gecikmiştir. 10 dakikalık uygulama süresinde ve 0.5 ve 1 mM'lık konsantrasyonlarda sürgün çıkışı ikinci gününde, 1.5 ve 2 mM'lık konsantrasyonlarda ise üçüncü günde gerçekleşmiştir. 1 ve 2 saatlik uygulama sürelerinde, kontrol hariç tüm konsantrasyonlarda sürgün çıkışı dördüncü günde gerçekleşmiştir. 3 saatlik uygulama süresinde ise kontrolde ikinci günde, 0.5 ve 1 mM'lık konsantrasyonlarda beşinci gününde sürgünler oluşmuş, ancak 1.5 ve 2 mM'lık konsantrasyonlarda sürgün oluşmamıştır (Şekil 4.27).

Sürgün uzunluğunu üzerine sodyum azitin uygulama süresi ve konsantrasyonu ile bu iki faktör arasındaki interaksiyon çok önemli ($P<0.01$) olmuştur (Çizelge 4.23).

Sürelerin ortalamalarına göre, en uzun sürgünler 10 dakikalık uygulamadan (15.60 cm) elde edilmiş, bunu azalan sıra ile 1 saat (13.64 cm), 2 saat (10.21 cm) ve 3 saatlik (9.36 cm) uygulamalar izlemiş, ancak 2 ve 3 saatlik uygulamalar arasındaki farklılıklar önemsiz olmuştur (Çizelge 4.24).

Ortalama dikkate alınarak konsantrasyonlara göre değerlendirilme yapıldığında, kontrol grupta 17.20 cm olan sürgün uzunluğu 0.5 mM'lık konsantrasyonda 13.66 cm'ye, 1 mM'lık konsantrasyonda 11.78 cm'ye, 1.5 mM'lık konsantrasyonda 10.35 cm'ye ve 2 mM'lık konsantrasyonda ise 8.02 cm'ye düşmüştür. Buna göre sodyum azitin konsantrasyonu arttıkça sürgün uzunluğu kısalmıştır (Çizelge 4.24).

Sürgün uzunluğu üzerine sodyum azitin uygulama süresinin etkisi kullanılan konsantrasyona göre farklılık göstermiştir. Bu nedenle uygulama süresi $\times$ konsantrasyonun etkisi çok önemli ($P<0.01$) olmuştur (Çizelge 4.23). En yüksek sürgün uzunluğu 10 dakikalık, 1, 2 ve 3 saatlik uygulama sürelerinde kontrol konsantrasyondan elde edilmiştir. En düşük sürgün uzunluğu 10 dakikalık uygulama süresinde 0.5 mM'lık konsantrasyonda; 1 ve 3 saatlik uygulamalarda 2 mM'lık konsantrasyonda ve 2 saatlik uygulama süresi ise 2 mM'lık konsantrasyonda sodyum azit konsantrasyonlarından belirlenmiştir (Çizelge 4.24).

d. Koleoptil uzunluğu

Koleoptil uzunluğu mutagenin hem uygulama süresinden ve konsantrasyondan hem de bu iki faktör arasındaki interaksiyon da çok önemli ($P<0.01$) derecede etkilenmiştir (Çizelge 4.23).

Mutagenin uygulama süresi uzadıkça koleoptil uzunluğunun kısaldığı tespit edilmiştir. Nitekim, en yüksek koleoptil uzunluğu 5.11 cm ile 10 dakikalık uygulama süresinde gerçekleşmiş, bunu 5.40 cm ile 1 saat, 4.77 cm ile 2 saat ve 4.63 cm ile 3 saatlik uygulama süreleri izlemiştir (Çizelge 4.24).

Konsantrasyonların ortalamaları dikkate alınarak değerlendirildiğinde, en uzun koleoptiller 5.84 cm ile kontrol grupta tespit edilmiş, bunu 5.42 cm ile 0.5 mM'lık, 4.95 cm ile 1 mM'lık, 4.61 cm ile 1.5 mM'lık ve 4.08 cm ile 2 mM'lık konsantrasyonlar izlemiştir. Bununla birlikte, 1 ve 1.5 mM'lık konsantrasyonlar arasındaki farklılıklar istatistiksel anlamda önemsiz olmuştur (Çizelge 4.24).

Koleoptil uzunluğu üzerine sodyum azitin uygulama süresinin etkisi kullanılan konsantrasyona göre farklılık göstermiştir. Bu nedenle uygulama süresi $\times$ konsantrasyon interaksiyonunun etkisi çok önemli ($P<0.01$) olmuştur (Çizelge 4.23). En yüksek koleoptil uzunluğu 10 dakikalık, 1 ve 2 saatlik uygulama sürelerinde kontrol konsantrasyonda elde edilmiş, ancak 3 saatlik uygulamada ise 0.5 mM'lık konsantrasyonda gerçekleşmiştir. En düşük koleoptil uzunluğu 10 dakikalık uygulama süresinde 0.5 mM'lık konsantrasyonda; 1 ve 3 saatlik uygulamalarda 2 mM'lık konsantrasyonda ve 2 saatlik uygulama süresi ise 1.5 mM'lık konsantrasyonda belirlenmiştir (Çizelge 4.24).

e. Çim uzunluğu

Çim uzunluğunu üzerine etil metansülfonatin uygulama süresi ve konsantrasyonu ile bu iki faktör arasındaki interaksiyon çok önemli ($P<0.01$) olmuştur (Çizelge 4.23).

Uygulama süresine göre ortalama çim uzunluğu dikkate alındığında, en fazla çim uzunluğunu 20.71 cm ile 10 dakikalık uygulamadan elde edilmiş ve süre uzadıkça çim uzunluğunda azalma olmuştur. Buna göre çim uzunluğu 1 saatlik uygulamada 19.04 cm, 2 saatlik uygulamada 14.98 cm, 3 saatlik uygulamada ise 13.98 cm olmuştur. Bununla birlikte, 2 ve 3 saatlik uygulamalar arasındaki farklılıkların önemsiz olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.24).

Ortalama dikkate alınarak konsantrasyonlara göre değerlendirilme yapıldığında, kontrol grupta 23.04 cm olan çim uzunluğu 0.5 mM'lık konsantrasyonda 19.08 cm'ye, 1 mM'lık konsantrasyonda 16.73 cm'ye, 1.5 mM'lık konsantrasyonda 14.96 cm'ye, 2 mM'lık konsantrasyonda ise 12.09 cm'ye düşmüştür. Burada verilen bilgilerden de anlaşılacağı gibi sodyum azitin konsantrasyonu arttıkça çim uzunluğu azalmıştır (Çizelge 4.24).

Çim uzunluğunu üzerine sodyum azitin uygulama süresinin etkisi kullanılan konsantrasyona göre farklılık göstermiştir. Bu nedenle uygulama süresi $\times$ konsantrasyonun etkisi çok önemli ($P < 0.01$) olmuştur (Çizelge 4.23). En yüksek çim uzunluğunu 10 dakikalık, 1, 2 ve 3 saatlik uygulama sürelerinde kontrol konsantrasyonda elde edilmiştir. En düşük çim uzunluğunu 10 dakikalık uygulama süresinde 0.5 mM'lık konsantrasyonda; 1 ve 3 saatlik uygulamalarda 2 mM'lık konsantrasyonda ve 2 saatlik uygulama süresi ise 2 mM'lık konsantrasyonda belirlenmiştir (Çizelge 4.24).

f. Kök yaş ağırlığı

Kök yaş ağırlığı mutagenin hem uygulama süresinden ve konsantrasyonundan hem de bu iki faktör arasındaki etkileşimden çok önemli ($P < 0.01$) derecede etkilenmiştir (Çizelge 4.23).

Fide başına en yüksek kök yaş ağırlığı 0.0259 g ile 10 dakikalık uygulama süresinden elde edilmiş, bunu 0.0251 g ile 1 saat, 0.0169 g ile 2 saat ve 0.0117 g ile 3 saatlik

uygulama süreleri izlemiştir. Buna göre, uygulama süresinin uzaması kökün yaş ağırlığını azaltmıştır (Çizelge 4.24).

Konsantrasyonların ortalamaları dikkate alınarak incelendiğinde, sodyum azitin konsantrasyonu arttıkça kök yaş ağırlığının azaldığı tespit edilmiştir. Kontrol grupta 0.0316 gram olan kök yaş ağırlığı, 0.5 mM'lık konsantrasyonda 0.0224 grama, 1 mM'lık konsantrasyonda 0.0173 grama ve 1.5 mM'lık konsantrasyonda 0.0133 grama düşmüş, 2 mM'lık konsantrasyonda ise 0.0149 gram olmuştur. Bununla birlikte, 1.5 ve 2 mM'lık konsantrasyonlar arasındaki farklılık ve yine 1 ve 2 mM'lık konsantrasyonlar arasındaki farklılık önemsiz olmuştur (Çizelge 4.24).

Kök yaş ağırlığı üzerine sodyum azitin uygulama süresinin etkisi kullanılan konsantrasyona göre farklılık göstermiştir. Bu nedenle uygulama süresi $\times$ konsantrasyonun etkisi çok önemli ($P<0.01$) olmuştur (Çizelge 4.23). En yüksek kök yaş ağırlığı 10 dakikalık uygulama süresinde 2 mM'lık konsantrasyonda; 1 saatlik uygulama süresinde 0.5 mM'lık konsantrasyonda; 2 ve 3 saatlik uygulama sürelerinde kontrol konsantrasyondan elde edilmiştir. En düşük kök yaş ağırlığı 10 dakikalık uygulama süresinde 1.5 mM'lık konsantrasyonda; 1 saatlik uygulamada 1.5 ve 2 mM'lık konsantrasyonda; 2 saatlik uygulama süresi ise 1 mM'lık konsantrasyonda ve 3 saatlik uygulama süresi ise 2 mM'lık konsantrasyonda belirlenmiştir (Çizelge 4.24).

g. Kök kuru ağırlığı

Kök kuru ağırlığı üzerine mutagenin uygulama süresi ve konsantrasyonu ile bu iki faktör arasındaki interaksiyon çok önemli ($P<0.01$) olmuştur (Çizelge 4.23).

10 dakikalık uygulamada 0.022 gram olan kök kuru ağırlığı, 2 saatlik uygulamada 0.0013 grama, 1 saatlik uygulamada 0.0012 grama, 3 saatlik uygulamada ise 0.0009 grama düşmüş, ancak 1 ve 2 saatlik uygulama süreleri arasındaki farklılıklar önemsiz olmuştur (Çizelge 4.24).

Ortalamalar dikkate alınarak konsantrasyonlara göre değerlendirildiğinde, kontrol grupta 0.0023 gram olan kök kuru ağırlığı, 0.5 mM'lık konsantrasyonda 0.0017 grama, 1 mM'lık konsantrasyonda 0.0013 grama, 1.5 ve 2 mM'lık konsantrasyonlarda ise 0.0008 grama düşmüştür. Bununla birlikte, 1.5 ve 2 mM'lık konsantrasyonlar arasındaki farklılıklar istatistiksel anlamda önemsiz olmuştur (Çizelge 4.24).

Kök kuru ağırlığı üzerine sodyum azitin uygulama süresinin etkisi kullanılan konsantrasyona göre farklılık göstermiştir. Bu nedenle uygulama süresi $\times$ konsantrasyonun etkisi çok önemli ($P < 0.01$) olmuştur (Çizelge 4.23). En yüksek kök kuru ağırlığı 10 dakikalık, 1, 2 ve 3 saatlik uygulama sürelerinde kontrol konsantrasyondan elde edilmiştir. En düşük kök kuru ağırlığı 10 dakikalık uygulama süresinde 1.5 mM'lık konsantrasyonda ve 1, 2 ve 3 saatlik uygulamalarda 2 mM'lık konsantrasyonda belirlenmiştir (Çizelge 4.24).

h. Sürgün yaş ağırlığı

Sodyum azitin uygulama süresi ve konsantrasyonu sürgün yaş ağırlığını çok önemli ($P < 0.01$) derecede etkilemiş, buna karşın iki faktör arasındaki interaksiyon önemsiz olmuştur (Çizelge 4.23).

En yüksek sürgün yaş ağırlığı 0.0022 g ile 10 dakikalık uygulamada tespit edilmiş, bunu 0.0013 g ile 2 saatlik ve 0.0012 g ile 1 saatlik uygulama süreleri izlenmiştir. Diğer taraftan, bu karakter bakımından en düşük değer 0.0005 g ile 3 saatlik uygulama süresinde gerçekleşmiştir (Çizelge 4.24).

Konsantrasyonların kendi içerisindeki ortalamaları esas alındığında, sürgün yaş ağırlığı bakımından ilk sırada 0.0023 g ile kontrol grubun yer aldığı, bunu 0.0017 g ile 0.5 mM'lık, 0.0013 g ile 1 mM'lık ve 0.0008 g ile 1.5 ve 2 mM'lık konsantrasyonların izlediği tespit edilmiştir (Çizelge 4.24).

i. Sürgün kuru ağırlığı

Sürgün kuru ağırlığı mutagenin hem uygulama süresinden ve konsantrasyondan hem de bu iki faktör arasındaki etkileşimden çok önemli ($P<0.01$) derecede etkilenmiştir (Çizelge 4.23).

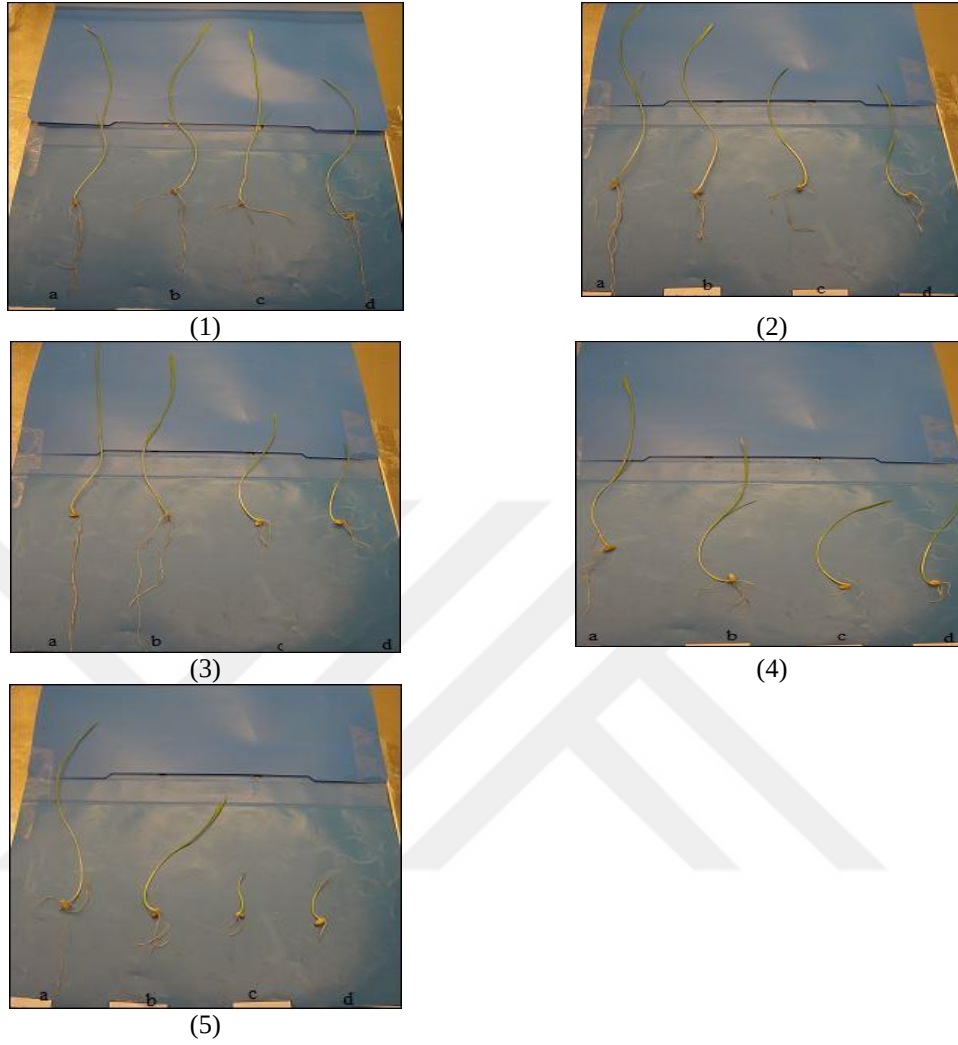
Mutagenin uygulama süresi uzadıkça sürgün kuru ağırlığı azalmıştır. Nitekim, 10 dakikalık uygulama süresinde 0.0028 gram olan sürgün kuru ağırlığı, 1 saatlik uygulamada 0.0024 grama, 2 saatlik uygulamada 0.0016 grama, 3 saatlik uygulamada ise 0.0013 grama düşmüştür (Çizelge 4.24).

Konsantrasyonların ortalamaları dikkate alınarak değerlendirildiğinde, en yüksek sürgün kuru ağırlığı 0.0034 g ile kontrol grupta tespit edilmiş olup, bunu 0.0023 g ile 0.5 mM'lık, 0.0019 g ile 1 mM'lık, 0.0014 g ile 1.5 mM'lık ve 0.0012 g ile 2 mM'lık konsantrasyonlar izlemiştir. Buna göre mutagenin konsantrasyonu arttıkça sürgün kuru ağırlığı azalmıştır. Bununla birlikte, 1.5 ve 2 mM'lık konsantrasyonlar arasındaki farklılıklar istatistiksel anlamda önemsiz olmuştur (Çizelge 4.24).

Sürgün kuru ağırlığı üzerine sodyum azitin uygulama süresinin etkisi kullanılan konsantrasyona göre farklılık göstermiştir. Bu nedenle uygulama süresi $\times$ konsantrasyonun etkisi çok önemli ($P<0.01$) olmuştur (Çizelge 4.23). En yüksek sürgün kuru ağırlığı 10 dakikalık, 1, 2 ve 3 saatlik uygulama sürelerinde kontrol konsantrasyondan elde edilmiştir. En düşük sürgün kuru ağırlığı 10 dakikalık, 1, 2 ve 3 saatlik uygulamalarda 2 mM'lık konsantrasyonda belirlenmiştir (Çizelge 4.24).

3) Fide ile ilgili karakterler

İşlem uygulanmış tohumlar, içerisinde toprak bulunan kasalara ekilmiş ve bu ortamda gelişen M₁ fidelerinde aşağıda belirtilen karakterler incelenmiştir (Şekil 4.34).



Şekil 4.34. Sodyum azitin Farklı süre ve konsantrasyonlarda işlem uygulanmış tohumlar içerisinde toprak bulunan kasaların ekilmiş ve bu ortamda gelişen M_1 fidelerinde görünümleri.

1: a) 10 dakika + 0.5 mM, b) 10 dakika + 1 mM, c) 10 dakika + 1.5 mM, d) 10 dakika + 2 mM,

2: a) 1 saat + 0.5 mM, b) 1 saat + 1 mM, c) 1 saat + 1.5 mM, d) 1 saat + 2 mM,

3: a) 2 saat + 0.5 mM, b) 2 saat + 1 mM, c) 2 saat + 1.5 mM, d) 2 saat + 2 mM,

4: a) 3 saat + 0.5 mM, b) 3 saat + 1 mM, c) 3 saat + 1.5 mM, d) 3 saat + 2 mM konsantrasyonlarda kök ve sürgün görünümleri.

a. Çıkış oranı

Çıkış oranı üzerine sodyum azit konsantrasyonlarının etkisi önemli ($P < 0.05$) iken, uygulama süresinin ve süre $\times$ konsantrasyon interaksyonunun etkisi önemsiz olmuştur (Çizelge 4.25).

Uygulama süresinin uzaması genel anlamda (1 saat hariç) çıkış oranını artmıştır. Örneğin, 1 saatlik uygulamada %89.40 olan çıkış oranı 10 dakikalık uygulamada %90.40'a, 2 saatlik uygulamada %91.60'a, 3 saatlik uygulamada ise %93.60'a yükselmiş, ancak tüm uygulama süreleri arasındaki farklılıklar önemsiz olmuştur (Çizelge 4.26).

Konsantrasyonların ortalamaları incelendiğinde, sodyum azit konsantrasyonlarının genel anlamda (2 mM'lık hariç) çıkış oranını azalttığı görülmüştür. Örneğin, kontrol ve 0.5 mM'lık konsantrasyonda %94.75 olan çıkış oranı, 1 mM'lık konsantrasyonda %91.00'e, 2 mM'lık konsantrasyonda %88.50'ye, 1.5 mM'lık konsantrasyonda ise 87.25'e düşmüştür. Bununla birlikte, kontrol ile yalnızca 0.5 ve 1 mM'lık konsantrasyonlar arasındaki farklılıklar önemsiz olmuştur (Çizelge 4.26).

Sürgün kuru ağırlığı üzerine sodyum azitin uygulama süresinin etkisi kullanılan konsantrasyona göre farklılık göstermiştir. Bu nedenle uygulama süresi $\times$ konsantrasyonun etkisi çok önemli ($P < 0.01$) olmuştur (Çizelge 4.25). En yüksek sürgün kuru ağırlığı 10 dakikalık, 1, 2 ve 3 saatlik uygulama sürelerinde kontrol konsantrasyondan elde edilmiştir. En düşük sürgün kuru ağırlığı 10 dakikalık, 1, 2 ve 3 saatlik uygulamalarda 2 mM'lık konsantrasyonda belirlenmiştir (Çizelge 4.26).

Çizelge 4.25. Tohuma farklı süre ve dozlarda sodyum azit uygulamasından sonra fide ile ilgili bazı karakterlere ait varyans analizi sonuçları.

Varyasyon Kaynağı	Kareler ortalaması					
	SD	ÇO	İYU	KUZ	SUZ	FB
Süre (saat)	3	65.26	5.58**	164.72**	98.11**	20653.52**
Konsantrasyon (mM)	4	192.50*	3.1**	207.41**	83.61**	11.13**
Süre × Konsantrasyon	12	66.1	4.08**	93.80**	23.42*	8.13**
Hata	380	63.53	0.69	25.93	11.85	1.54
Toplam	400					

*, p<0.05; **: p<0.01 düzeyinde önemlidir.

Çizelge 4.26. Tohuma farklı süre ve dozlarda sodyum azit uygulamasından sonra fide ile ilgili bazı karakterlere ait veriler.

Süre (dakika/saat)	Konsantrasyon (mM)	ÇO	İYU (cm)	KUZ (cm)	SUZ (cm)	FB (cm)
10 dakika	0	93.00	3.11 ^{a2}	15.63 ^{ab}	25.38 ^b	41.01 ^b
	0.5	88.00	2.77 ^{ab}	15.20 ^{ab}	28.70 ^a	43.90 ^{ab}
	1	89.00	3.27 ^a	17.30 ^a	28.01 ^a	45.11 ^a
	1.5	89.00	3.25 ^a	13.63 ^b	27.81 ^a	41.64 ^{ab}
	2	93.00	2.37 ^a	16.42 ^{ab}	26.80 ^{ab}	43.22 ^{ab}
	Ortalama	90.40	2.95^{B1}	15.63^C	27.34^B	42.98^C
1	0	91.00	2.65 ^c	17.09 ^b	29.18	46.26 ^b
	0.5	94.00	3.57 ^{ab}	23.41 ^a	29.08	52.49 ^a
	1	86.00	3.70 ^{ab}	22.97 ^a	30.48	50.97 ^a
	1.5	87.00	4.07 ^a	14.86 ^b	28.00	45.33 ^b
	2	89.00	3.40 ^b	14.87 ^b	29.23	44.10 ^b
	Ortalama	89.40	3.48^A	18.64^A	29.19^A	47.83^A
2	0	95.00	2.87 ^b	15.03 ^b	28.03 ^a	43.06 ^c
	0.5	98.00	3.40 ^a	19.58 ^a	29.88 ^{abc}	49.47 ^a
	1	96.00	3.65 ^a	18.00 ^{ab}	31.29 ^a	48.50 ^{ab}
	1.5	87.00	3.60 ^a	17.72 ^{ab}	30.50 ^{ab}	49.01 ^{ab}
	2	82.00	3.65 ^a	16.49 ^{ab}	28.31 ^{bc}	44.80 ^{bc}
	Ortalama	91.60	3.43^A	17.36^B	29.60^A	46.96^{AB}
3	0	100.00	3.75 ^a	18.16	26.03 ^b	44.20
	0.5	99.00	3.72 ^a	17.05	28.60 ^a	45.66
	1	93.00	3.45 ^a	16.49	29.61 ^a	47.31
	1.5	86.00	2.70 ^b	15.88	30.81 ^a	45.49
	2	90.00	2.87 ^b	14.88	29.74 ^a	44.62
	Ortalama	93.60	3.30^A	16.49^{BC}	28.96^A	45.45^B
Ortalama konsantrasyon (mM)	0	94.75 ^A	3.09 ^B	16.47 ^B	27.15 ^C	43.63 ^B
	0.5	94.75 ^A	3.36 ^A	18.81 ^A	29.06 ^{AB}	47.88 ^A
	1	91.00 ^{AB}	3.51 ^A	18.69 ^A	29.84 ^A	47.97 ^A
	1.5	87.25 ^B	3.40 ^A	15.52 ^B	29.28 ^{AB}	45.36 ^B
	2	88.50 ^B	3.07 ^B	15.66 ^B	28.52 ^B	44.18 ^B
LD₅₀ değeri		47.37	1.54	8.23	13.57	21.81

¹: Aynı sütunda aynı büyük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemsizdir.

²: Her bir uygulama süresi için aynı sütunda aynı küçük harfle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar önemsizdir.

b. İlk yaprak uzunluğu

İlk yaprak uzunluğu üzerine mutagenin uygulama süresi ve konsantrasyonu ile bu iki faktör arasındaki interaksiyon, çok önemli ($P<0.01$) etki oluşturmuştur (Çizelge 4.25).

Ortalamalar esas alınarak uygulama süresine göre değerlendirildiğinde en fazla ilk yaprak uzunluğu 3.48 cm ile 1 saatlik uygulamadan elde edilmiş, bunu 3.43 cm ile 2 saat, 3.30 cm ile 3 saat ve 2.95 cm ile 10 dakikalık uygulamalar izlemiştir. Bununla birlikte, 1, 2 ve 3 saatlik uygulamalar arasındaki farklılıklar istatistiksel anlamda önemsiz olmuştur (Çizelge 4.26).

Çizelge 4.26'dan görüleceğı gibi, 2 mM'lık konsantrasyon hariç mutagenin tüm konsantrasyonları ilk yaprak uzunluğunu artırmıştır. En yüksek ilk yaprak uzunluğu 3.51 cm ile 1 mM'lık konsantrasyonda meydana gelmiş, bunu 1.5 mM'lık (3.40 cm), 0.5 mM'lık (3.36 cm) ve 0 mM'lık (3.09 cm) uygulamalar izlemiş, son sırada ise 3.07 cm ile 2 mM'lık konsantrasyon yer almıştır (Çizelge 4.26).

İlk yaprak uzunluğu üzerine sodyum azitin uygulama süresinin etkisi kullanılan konsantrasyona göre farklılık göstermiştir. Bu nedenle uygulama süresi $\times$ konsantrasyonun etkisi çok önemli ($P<0.01$) olmuştur (Çizelge 4.25). En yüksek ilk yaprak uzunluğu 10 dakikalık uygulama süresinde 1 mM, 1 saatlik uygulamada 1.5 mM'lık konsantrasyonda; 2 saatlik uygulamada 1 ve 2 mM'lık konsantrasyonda ve 3 saatlik uygulama sürelerinde kontrol konsantrasyondan elde edilmiştir. En düşük ilk yaprak uzunluğu 10 dakikalık uygulama süresinde 2 mM'lık konsantrasyonda; 1 ve 2 saatlik uygulama süresinde 0 mM'lık konsantrasyonda ve 3 saatlik uygulamalarda 1.5 mM'lık konsantrasyonda belirlenmiştir (Çizelge 4.26).

c. Kök uzunluğu

Kök uzunluğu mutagenin hem uygulama süresinden ve konsantrasyonundan hem de bu iki faktör arasındaki interaksiyon da çok önemli ($P<0.01$) derecede etkilenmiştir (Çizelge 4.25).

En fazla kök uzunluğu 18.64 cm ile 1 saatlik uygulama süresinden elde edilmiş, bunu 17.36 cm ile 2 saat, 16.49 cm ile 3 saat, 15.63 cm ile 10 dakikalık uygulamalar takip etmiştir (Çizelge 4.26).

Konsantrasyonların ortalamaları incelendiğinde, en uzun kökler 18.81 cm ile 0.5 mM'lık konsantrasyonda tespit edilmiş, bunu azalan sıra ile 1 mM'lık (18.69 cm) ve 0 mM'lık (16.47 cm) ve 2 mM'lık (15.66 cm) konsantrasyonlar izlemiş, en kısa kökler ise 1.5 mM'lık konsantrasyonda (15.52 cm) belirlenmiştir (Çizelge 4.26).

Kök uzunluğu üzerine sodyum azitin uygulama süresinin etkisi kullanılan konsantrasyona göre farklılık göstermiştir. Bu nedenle uygulama süresi $\times$ konsantrasyonun etkisi çok önemli ($P<0.01$) olmuştur (Çizelge 4.25). En yüksek kök uzunluğu 10 dakikalık uygulama süresinde 1 mM'lık konsantrasyonda, 1 ve 2 saatlik uygulamalarda 0.5 mM'lık konsantrasyonda ve 3 saatlik sürelerinde kontrol konsantrasyonda elde edilmiştir. En düşük kök uzunluğu 10 dakikalık ve 1 saatlik uygulamalarda 1.5 mM'lık konsantrasyonda; 2 saatlik uygulama süresinde 0 mM'lık konsantrasyonda ve 3 saatlik uygulamalarda 2 mM'lık konsantrasyonda belirlenmiştir (Çizelge 4.26).

d. Sürgün uzunluğu

Sürgün uzunluğu üzerine mutagenin hem uygulama süresi hem de konsantrasyonu çok önemli ($P<0.01$), bu iki faktör arasındaki interaksiyon ise önemli ($P<0.05$) derecede etkili olmuştur (Çizelge 4.25).

Uygulama süresi esas alındığında, en fazla sürgün uzunluğu 29.60 cm ile 2 saatlik uygulamada gerçekleşmiş, bunu 29.19 cm ile 1 saat, 28.96 cm ile 3 saat ve 27.34 cm ile 10 dakikalık uygulama süreleri izlemiştir. Bununla birlikte, 1, 2 ve 3 saatlik uygulamalar arasındaki farklılıklar istatistiksel anlamda önemsiz olmuştur. Buna göre uygulama süresi ile kök uzunluğu arasında paralel bir değişim gerçekleşmemiştir (Çizelge 4.26).

Ortalamalar esas alınarak konsantrasyonlara göre değerlendirildiğinde, mutagenin tüm konsantrasyonlarının sürgün uzunluğunu artırdığı tespit edilmiştir. Nitekim, kontrolde 27.15 cm olan sürgün uzunluğu 2 mM'lık konsantrasyonda ise 28.52 cm'ye, 0.5 mM'lık konsantrasyonda 29.06 cm'ye, 1.5 mM'lık konsantrasyonda 29.28 cm'ye, 1 mM'lık konsantrasyonda 29.84 cm'ye yükselmiş ve kontrol ile diğer tüm konsantrasyonlar arasındaki farklılıklar çok önemli olmuştur (Çizelge 4.26).

Sürgün uzunluğu üzerine sodyum azitin uygulama süresinin etkisi kullanılan konsantrasyona göre farklılık göstermiştir. Bu nedenle uygulama süresi $\times$ konsantrasyonun etkisi çok önemli ($P<0.01$) olmuştur (Çizelge 4.25). En yüksek sürgün uzunluğu 10 dakikalık uygulama süresinde 0.5 mM'lık konsantrasyonda; 1 ve 3 saatlik uygulamalarda 1.5 mM'lık konsantrasyonda; 2 saatlik sürelerinde 1 mM'lık konsantrasyonda elde edilmiştir. En düşük sürgün uzunluğu 10 dakikalık ve 2 ve 3 saatlik uygulamalarda 0 mM'lık konsantrasyonda ve 1 saatlik uygulamada 1.5 mM'lık konsantrasyonda belirlenmiştir (Çizelge 4.26).

e. Fide boyu

Fide boyu üzerine sodyum azitin uygulama süresi ve konsantrasyonu ile bu iki faktör arasındaki interaksiyon çok önemli ($P<0.01$) olmuştur (Çizelge 4.25).

Ortalamalar esas alınarak uygulama süresine göre değerlendirildiğinde en uzun fide boyu 47.83 cm ile 1 saatlik uygulamadan elde edilmiş, bunu 46.96 cm ile 2 saat, 45.45

cm 3 saatlik uygulamalar izlemiştir. Bu karakter bakımından son sırada 42.98 cm ile 10 dakikalık uygulama yer almıştır (Çizelge 4.26).

Konsantrasyonların ortalamaları dikkate alınarak değerlendirildiğinde, en uzun fide boyunun 47.97 cm ile 1 mM'lık konsantrasyonda elde edilmiş, bunu 0.5 mM (47.88 cm), 1.5 mM (45.36 cm) ve 2 mM'lık (44.18 cm) konsantrasyonlar takip etmiştir. En kısa fide boyu 43.63 cm ile kontrol gruptan elde edilmiş, ancak bu konsantrasyon ile 1.5 ve 2 mM'lık konsantrasyonlar arasındaki farklılıklar önemsiz olmuştur. Bu verilerden de anlaşılabileceği gibi sodyum azit uygulaması fide boyunu artırmıştır (Çizelge 4.26).

Fide boyu üzerine sodyum azitin uygulama süresinin etkisi kullanılan konsantrasyona göre farklılık göstermiştir. Bu nedenle uygulama süresi $\times$ konsantrasyonun etkisi çok önemli ($P < 0.01$) olmuştur (Çizelge 4.25). En yüksek fide boyu 10 dakikalık ve 3 saatlik uygulama sürelerinde 1 mM'lık konsantrasyonda; 1 ve 2 saatlik uygulamalarda 0.5 mM'lık konsantrasyonda uygulamasından elde edilmiştir. En düşük fide boyu 10 dakikalık ve 2 ve 3 saatlik uygulamalarda 0 mM'lık konsantrasyonda ve 1 saatlik uygulamada 2 mM'lık konsantrasyonda belirlenmiştir (Çizelge 4.26).

4) Optimum dozun (LD_{50}) tespit edilmesi

Kimyasal mutagenlerin optimum konsantrasyonunun ve uygulama süresinin belirlenmesinde LD_{50} (letal doz) kriteri esas alınmıştır. Tahıllarda LD_{50} değerinin belirlenmesinde M_1 kuşağında çimlenme oranı, çıkış oranı ve fide boyu gibi karakterlerden yararlanılabilmektedir (Tosun 2015). Bu nedenle, burada söz konusu karakterler yönünden LD_{50} değeri incelenmiş ve araştırmada uygulanan süre ve konsantrasyonların hiç birinde LD_{50} değeri oluşmamıştır. Bu çalışmada farklı süre ve konsantrasyonlarda uygulanan sodyum azit çimlenme, çim ve fide ile ilgili bir çok karakteri olumsuz yönde etkilemiş, dolayısıyla kontrole göre azalmaya neden olmuştur. Ancak yine de araştırmada uygulanan süre ve konsantrasyonlarda LD_{50} değeri oluşmamıştır. Normalde literatürlere göre önerilen konsantrasyon 1 mM, süre ise 2 saat olup, bu denemede bu konsantrasyonun hem altı hem de üstü alınmış, ancak yinede

LD₅₀ değeri oluşmamıştır. Bu durumda, ileride yapılacak çalışmalarda daha yüksek konsantrasyonlar uygulanarak LD₅₀ değerinin tespit edilmesi önerilebilir.

4.2.2. M₂ Kuşağında Kurağa Toleranslı Genotiplerin Seçimi

Mutasyonlar genellikle resesif oldukları için açılımlar bu kuşakta ortaya çıkmakta, bu nedenle seleksiyona M₂ kuşağında başlanmıştır. Bu aşamada, daha önce hasat edilen M₂ tohumları -10 bar'lık PEG 6000 ortamında çimlendirmeye alınmış böylece erken dönemde (çimlenme dönemi) kurağa toleranslılık yönünden test edilmiş ve dolayısıyla seleksiyon yapılmıştır. Bu amaçla hem EMS hem de sodyum azit uygulamalarından elde edilmiş 20.000'er adet M₂ tohumları kullanılmıştır. Tohumlar test ortamında 15 gün süre ile bekletilmiş, bu sürenin sonunda en az 5 mm kök ve sürgün oluşturanlar seçilmiştir (Şekil 4.35). Çimlenen tohum sayısı EMS popülasyonunda 52 adet, sodyum azit popülasyonunda ise 710 adet olmuştur. Çimlenen tohumlar önce içerisinde toprak bulunan plastik viyollere aktarılmış ve bu ortamda 1 ay süre ile tutulmuşlardır. Bu sürenin ardından bitkiler tarlaya şaşırtılmış ve her bitkiden M₃ tohumları ayrı ayrı hasat edilmiş ve depolanmıştır (Şekil 4.36).



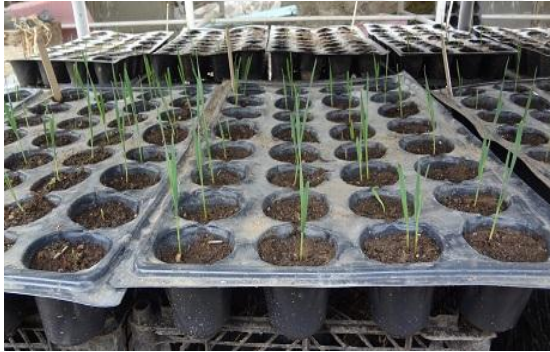
(a)



(b)

Şekil 4.35. M_2 tohumlarında çimlenme döneminde kurağa toleranslı genotiplerin seleksiyonu.

(a) EMS uygulanmış tohumların PEG 6000 ortamında 15. günde çimlenme durumu. (b) Sodyum azit uygulanmış tohumların PEG 6000 ortamında 15. günde çimlenme durumu.



(a)



(b)

Şekil 4.36. M_2 tohumlarında çimlenme döneminde kurağa toleranslı genotiplerin seleksiyon sonrasında yapılan işlemler.

(a) EMS ve sodyum azit uygulanmış tohumların PEG 6000 ortamında çimlenen tohumların viyollere ekimi. (b) Viyollerde gelişen fidelerin tarlaya şaşırtılması.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

5.1. Tartışma

Bitkilerde mutasyon ıslahı ile biyotik ve abiyotik stres faktörlerine dayanıklı veya toleranslı çeşitler geliştirilebilmektedir. Mutasyon, canlının genetik yapısında meydana gelen kalıcı değişiklikler olup hem üreme hücrelerinde hem de somatik hücrelerde meydana gelebilir. Bitkilerde çeşitli mutagenlerle somatik mutasyonların teşvik edildiği ve istenilen özelliklerin sağlandığı birçok çalışma yapılmıştır (Griffiths 1996; Franks *et al.* 2002; Collet *et al.* 2005). İstenilen özellikteki mutasyonların kendiliğinden meydana gelme sıklığı çok düşüktür. Bu nedenle, birçok ıslah çalışmasında mutasyon sıklığını artırmak amacıyla fiziksel veya kimyasal mutagenler kullanılmıştır (Ahloowalia and Maluszynski 2001; Atak *et al.* 2004; Hewawasam *et al.* 2004). Son yıllarda *in vitro* mutagenesis olarak adlandırılan, mutagenik uygulamaların *in vitro* tekniklerle kombinasyonunu kapsayan çalışmalar yapılmaya başlanmıştır (Tosun 2015).

Bu araştırmadan elde edilen verilere göre olgun embriyo kültürüne EMS'nin farklı süre ve konsantrasyonlarda uygulanması bir çok karakteri olumlu yönde etkilemiştir. Etil metansülfonatın uygulama süresi ve konsantrasyonu arttıkça genel olarak kallus oluşum oranı azalmış, ancak rejenerasyon etkinliği ve bitki sayısı bakımından uygulama süresine göre ortalamalar dikkate alındığında, en yüksek rejenerasyon etkinliği ve bitki sayısı 6 saatlik uygulamadan elde edilmiş, 4 saatlik uygulaması ise son sırada yer almıştır. Diğer taraftan, ortalamalar esas alınarak konsantrasyonlara göre değerlendirme yapıldığında, rejenerasyon etkinliğinin ve bitki sayısının sırasıyla %0.4 ve %0.3'lük konsantrasyonlarda elde edildiği ve yine kontrol uygulamasının her iki karakter bakımında son sırada yer aldığı görülmüştür.

EMS, rastgele bölgelerde (Sung 1976) yüksek sıklıkta mutasyonlara (Schy and Plewa 1989) sebep olduğu ve bunlar içerisinde kromozomal anormalliklerin sıklığı düşük olduğu için tercih edilen mutagenlerden biridir. Etil metansülfonat özellikle kallus gibi

hızlı bir şekilde bölünen ve çoğalan hücrelere uygulandığında etkili olmakta, çünkü bu sırada hücreler DNA'larını replike etmekle uğraştıklarından mutasyonların hatalı onarılma ihtimali çok yüksektir (Kilbey and Hunter 1983). EMS genellikle GC ↔ AT geçiş tipi mutasyonları uyarmaktadır (Kenganal *et al.* 2008).

Kültür bitkilerinde; özellikle dar genetik tabanlı bitkilerde ıslahçılar için etkili bir araçtır. Mutagenesis basit, ucuz, tüm bitkilere uygulanabilir ve küçük ya da büyük ölçekte kullanılabilir olması nedeniyle son yıllarda popüler olmaya başlamıştır (Luan *et al.* 2007). Aslında doku kültürünün kendisi varyasyona sebep olmakta, ancak çeşitli fiziksel veya kimyasal mutagenlerin uygulanmasıyla varyasyonu artırmak arzu edilebilir.

Gerek bu çalışmadan, gerekse daha önce yapılan diğer çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre, etil metansülfonatın farklı süre ve konsantrasyonlarda uygulanması bir çok karakteri olumlu yönde etkilemiştir. Van *et al.* (2008) tarafından soyada yapılan bir çalışmada olgunlaşmamış embriyolara farklı konsantrasyonlarda (0.0, 0.2, 0.4 ve 0.8 mM) EMS uygulanmış ve bitkiler rejenere edilmeye çalışılmıştır. Araştırmacılar, EMS'nin tüm konsantrasyonlarında embriyo oluşumu ve rejenerasyonun kontrole göre daha yüksek olduğunu belirlemişlerdir. Aynı şekilde Sharma *et al.* (2013), *Citrus jambhiri*'de farklı konsantrasyonlarda gama ışını uygulanmış tohumlardan elde ettikleri eksplantlara *in vitro* ortamda etil metansülfonat (EMS; 0.2, 0.3 ve 0.4%) ve metil metansülfonatın (MMS; 0.05, 0.1 ve 0.2%) farklı konsantrasyonlarını uygulandıktan sonra tohumları mutagensiz MS besi ortamında çimlendirmişlerdir. Fideler bu ortamda 45 gün süreyle gelişmeye bırakılmış ve daha sonra epikotiller alınmıştır. Bu epikotiller, içerisinde EMS ve MMS'nin daha önce belirtilen konsantrasyonlarını içeren rejenerasyon ortamında (MS + 0.5 mg/L BAP) 24°C' de 4 saat süre ile bekletilmişlerdir. Araştırmacılar rejenerasyonun, EMS'nin tüm konsantrasyonlarında kontrole göre daha yüksek olduğunu ve rejenerasyon potansiyeline göre hem EMS hem de MMS için en uygun konsantrasyonun %0.2 olduğunu belirlemişlerdir.

Pius *et al.* (1994) EMS'nin bir çok stres faktöründen biri olduğunu ve *in vitro* ortamda bitki rejenerasyonu üzerine uyarıcı etkiye sahip olduğunu bildirmişlerdir. Touraev *et al.* (1997) mikrospor kültüründe stres uygulamasının embriyogenesinin başlamasını uyardığını kaydetmişlerdir. Aynı şekilde Gaj (2002), EMS'nin benzer stres koşullarını uyarabileceğini ifade etmiştir. Bu nedenle, somatik embriyogenesiste EMS uygulaması kontrolden daha etkili olabilir.

Olgun embriyo kültürüne sodyum azitin (NaN_3) farklı süre ve konsantrasyonlarının etkileri bakımından bu araştırmadan elde edilen verilere göre, sodyum azit uygulaması kallus oluşumunu, rejenerasyon etkinliğini ve bitki sayısını azaltmış, bu etki özellikle yüksek konsantrasyonlarda ve uzun uygulama sürelerinde daha belirgin olmuştur.

Mutasyonların uyarılmasında en kritik faktör mutagenin konsantrasyonudur. Genel bir kural olarak, belli bir konsantrasyona kadar mutagenin konsantrasyonu arttıkça, normalde daha fazla mutasyon oluşmakta, ancak yüksek konsantrasyonlar aynı zamanda daha fazla fide hasarına ve ölüme neden olmaktadır (Jenks *et al.* 2007). Yüksek konsantrasyonlarda ortaya çıkan azalma, hücresel düzeyde gerçekleşen fizyolojik veya fiziksel düzensizliklerden kaynaklanmış olabilir. Wi *et al.* (2007), radyasyonun düşük dozunda uygulanmasının, bitki hücrelerinde hormonal sinyal ağını değiştirerek veya hücrenin antioksidatif kapasitesini artırarak büyümeyi uyarabileceğini kaydetmişlerdir. Büyümenin engellenmesine sebep olan yüksek konsantrasyon uygulaması, somatik hücre bölünmesi sırasında hücre döngüsünü G_2-M fazında bekletebilir ve/veya tüm genomda çeşitli hasarlara sebep olabilir. *In vitro* mutagen uygulamasının etkisi tohuma uygulamadan daha etkili olmuştur. Nitekim, Grant and Salamone (1994), sodyum azitin bitkiler ve hayvanlar için yüksek derecede mutagenik bir kimyasal olduğunu ve mutant kallus oluşumu bakımından kallusa uygulamanın tohuma uygulamadan daha iyi olduğunu bildirmişlerdir.

Stevia rebaudiana bitkisinde sodyum azit ve kolçisinin tohum çimlenmesi ve kallus oluşumu üzerine etkilerini belirlemek amacıyla yapılan bir denemede (Pande and Khetmalas 2012), tohum ve yaprak eksplantları sodyum azitin ve kolçisinin farklı

konsantrasyonlarına (%0-0.25) 12 ve 24 saat süreyle maruz bırakılmışlardır. Çalışmada mutagenlerin konsantrasyonları artıkça ve uygulama süresi uzadıkça kallus oluşumunun geciktiği tespit edilmiştir. Sodyum azitin kültür ortamındaki meristematik hücreler üzerine görülebilen etkisi kallus oluşumunu veya çoğalmasını engellemektir. Bu durum, hücre döngüsünün S fazında genom ayrılması ve çoğalmasını engelleme etkisinden kaynaklanabilir. Ayrıca, uyarılmış bazı mutant biyokimyasallar elektron zinciri gibi solunum zincirlerinin engellenmesine sebep olabilirler (Johnsen *et al.* 2002).

Kallusa etil metansülfonat farklı sürelerde uygulandığında, ortalamalar esas alınarak en yüksek rejenerasyon etkinliği ve bitki sayısı 6 saatlik uygulamadan, en düşük ise 4 saatlik uygulamadan elde edilmiştir. Diğer taraftan, ortalamalar esas alınarak konsantrasyonlara göre değerlendirme yapıldığında, en yüksek rejenerasyon etkinliği ve bitki sayısı kontrol grubunda en düşük ise 80 mM'lık konsantrasyonda olduğu görülmüştür. Bu araştırmada rejenerasyon etkinliği ve bitki sayısı üzerine mutagenin uygulama süresi ve konsantrasyonu çok önemli derecede etki oluşturmuştur.

Yapılan literatür tarama çalışmalarında, EMS ve sodyum azit mutagenlerinin buğdayda kallusa uygulandığı herhangi bir makaleye rastlanmamıştır. Dolayısıyla bu araştırma bu konuda ilk çalışma olarak düşünülebilir.

Büyüme ve çoğalmanın %50 oranında azalması (LD_{50}) uygun mutagen konsantrasyonunun belirlenmesinde önemli bir ölçüt olup, uygulamanın konsantrasyonu ve süresi değiştirilerek bu konsantrasyon ayarlanabilir (Predieri 2001; Kodym and Afza 2003). Hofmann *et al.* (2004) soya süspansiyon kültüründe yaşama oranının EMS'nin konsantrasyonuna göre değiştiğini ve bu oranın 1 mM'lık EMS'de %74 iken, 30 mM'lık EMS'de %43 olduğunu kaydetmişlerdir.

Fasulyede EMS ve N-nitröz-N'-etil üre (ENU) mutagenlerinin kallus gelişimi üzerine etkilerini araştırmak amacıyla yapılan bir çalışmada (Svetleva and Crino, 2005) 7 günlük steril bitkilerden elde edilen yaprak petiol eksplantlarından gelişen kalluslar kullanılmıştır. Her iki mutagen eksplantlara 2.5×10^{-2} ve 6.2×10^{-3} M konsantrasyonlarda

15, 30, 60 ve 90 dakika süreyle uygulanmıştır. Uygulama süresi kallus gelişimini etkilemiş ve her iki mutagen için 30 dakikalık uygulamanın yapıldığı ortamda gelişen kalluslar en yüksek ağırlıkta olmuştur. Buna karşın, 90 dakikalık uygulama kalluslarının kahverengileşmesine ve gelişmenin engellenmesine sebep olmuştur. Araştırmacılar, genel olarak ENU'nun EMS'den daha güçlü etki oluşturduğunu ve kallus gelişimi üzerine alt kültür sayısının mutagenik uygulamadan daha yüksek etkiye sahip olduğunu kaydetmişlerdir.

Bu araştırmada kallusa sodyum azitin uygulama süresi rejenerasyon etkinliğini ve rejener bitki sayısını çok önemli derecede etkilemiş, en yüksek rejenerasyon etkinliği ve rejener bitki sayısı 1 saatlik uygulamadan elde edilmiştir. Sodyum azitin uygulama süresi uzadıkça ve konsantrasyonu arttıkça her iki karakterde düşüşler ortaya çıkmış ve 4 saatlik uygulamada tüm konsantrasyonlarda herhangi bir rejenerasyon gerçekleşmemiştir.

Mutasyon ıslahında genellikle konsantrasyon ve konsantrasyon oranı arttıkça mutasyon sıklığının arttığı kabul edilmektedir. Bununla birlikte, işlem uygulanmış dokuların canlılığı ve böyle dokuların rejener bitki oluşturma kapasiteleri konsantrasyon ve konsantrasyon oranı arttıkça azalmakta, bu durumda arzu edilen mutasyonlar istenmeyen mutasyonları beraberinde getirme riski bulunmaktadır (Bhagwat and Duncan 1998).

Sodyum azitin kültür ortamındaki meristematik hücreler üzerine görülebilen etkisi kallus oluşumunu veya çoğalmasını engellemektir. Bu durum, hücre döngüsünün S fazında DNA replikasyonunu engelleme etkisinden kaynaklanabilir. Ayrıca, uyarılmış bazı mutant biyokimyasallar elektron zinciri gibi solunum zincirlerinin engellenmesine sebep olabilirler (Johnsen *et al.* 2002).

Kallus aşamasındaki hücreler dış koşullara aşırı derecede duyarlı olup, hücrede mutasyon oluşturan azidoalanin olarak adlandırılan mutagenik etmen üretirler. Bu kimyasal mutagen bitki hücrelerinde son derece mutagenik etmen olan amino asit

analoğu L-azidoalanine ($\text{N}_3\text{-CH}_2\text{-CH(NH)}_2\text{-COOH}$) metabolize edilir. Bunun oluşumunun O-asetilserin sülfhidrilaz enzimine bağlı olduğu belirlenmiştir (La and Mongold 1987). Buradan, sodyum azitin mutagenitesinin bir çok fiziksel ve fizyolojik parametreye bağlı olduğu sonucuna varılabilir. Bu nedenle, söz konusu mutagen tarafından üretilen mutagenite değişkendir. Sodyum azitin mutagenik etkisinin azit bileşiğinin organik metabolitini üretmesiyle ortaya çıktığı kabul edilmektedir (Owais and Kleinhofs 1988).

Stevia rebaudiana bitkisinde yapılan bir çalışmada (Pande and Khetmalas 2012) sodyum azit ve kolçisin uygulamasının tohum çimlenmesi ve kallus oluşumu üzerine etkileri incelenmiştir. Eksplant olarak kullanılan tohumlar ve yaprak parçaları sodyum azit ve kolçisinin değişen konsantrasyonlarına (%0-0.250) oda sıcaklığında 12 ve 24 saat süreyle maruz bırakılmışlardır. Mutagenlerin konsantrasyonu arttıkça çimlenme oranı azalmıştır. Ayrıca, yaprak eksplantlarının; her iki mutagene maruz bırakılma süresi kallus oluşumunu ve gelişimini etkilemiştir. Araştırmacılar, mutagenlerin konsantrasyonu arttıkça kallus oluşumunun geciktiğini bildirmişlerdir.

Pamukta somatik embriyoların çimlenmesi ve somatik embriyo kökenli bitkiciklerin canlılık oranı üzerine sodyum azitin farklı konsantrasyonlarının etkilerini araştıran Ganesan and Jayabalan (2004) sodyum azitin işlem uygulanmış somatik embriyoların kök sayısını (5.5 adet) ve kök uzunluğunu (39.5 cm) kontrole (sırasıyla 1.2 adet ve 4.2 cm) göre önemli ölçüde arttığını belirlemişlerdir. Yine 10 mM sodyum azit uygulanmış olgun somatik embriyolarda çimlenme oranının %44.6'dan %50.9'a yükseldiği bildirilmiştir.

EMS'nin uygulama süresinin çimlenme hızı, çimlenme gücü, çimlenme oranı ve çimlenme oranı indeksi üzerine etkisi önemsiz iken, çimlenme ile ilgili diğer karakterler üzerine etkisi çok önemli olmuştur. Buna karşın, çimlenme ile ilgili tüm karakterler üzerine konsantrasyonun etkisi önemsiz olmuştur. EMS 6 saatlik süreyle uygulandığında, çimlenme hızı, çimlenme gücü ve çimlenme oranı kontrole ve diğer uygulama sürelerine göre küçük bir artışa neden olmuştur. Diğer taraftan EMS'nin hem

tüm konsantrasyonları çimlenme hızı, çimlenme gücü, çimlenme oranı, çimlenme hızı katsayısı, çimlenme hızı indeksi ve çimlenme gücü indeksi ile ilgili karakterlerde azalmaya, ortalama çimlenme zamanının ise uzamasına sebep olmuştur.

EMS'nin tohumu uygulama süresi uzadıkça çimle ilgili karakterlerde genel olarak bir düşüşe sebep olduğu görülmekle birlikte, sürgün uzunluğu, koleoptil uzunluğu ve çim uzunluğunun 3 saatlik uygulama süresinde kök yaş ağırlığının, kök kuru ağırlığının ve sürgün kuru ağırlığının 6 saatlik uygulama süresinde kontrole göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Diğer taraftan, konsantrasyonların ortalamalarına göre değerlendirme yapıldığında; kök sayısı ve kök uzunluğunun %0.1, %0.2 ve %0.3'lük konsantrasyonlarda; koleoptil uzunluğunun ve çim uzunluğunun %0.2'lik konsantrasyonda; kök yaş ağırlığı, kök kuru ağırlığı ve sürgün kuru ağırlığının %0.3'lük konsantrasyonda kontrole göre daha fazla olduğu görülmüştür.

Jatropha curcas'ta yapılan bir çalışmada Dhakshanamoorthy *et al.* (2010) kuru tohumlara gama ışınları ve EMS (%1, 2, 3, 4) uygulanmış ve çimlenme oranı, kök uzunluğu, sürgün uzunluğu, fide boyu, bitki boyu ve diğer bazı karakterler yönünden değerlendirmeler yapılmıştır. Araştırmacı, EMS'nin %1'lik konsantrasyonunun tohumların çimlenme oranını artırdığını, buna karşın %4'lük konsantrasyonunun azalttığını bildirmiş ve ayrıca yüksek konsantrasyonun (%4) incelenen tüm karakterler için engelleyici etki gösterdiğini kaydetmiştir.

EMS'nin hem uygulama süresi hem de konsantrasyonunun incelenen fide karakterlerinden hemen tamamı (kök uzunluğu için önemli) üzerine etkisi çok önemli olmuştur. Uygulama süresinin uzaması genel olarak çıkış oranının azalmasına neden olmuştur. İlk yaprak uzunluğu, kök uzunluğu ve fide boyu (9 saat hariç) tüm uygulama sürelerinde kontrole göre daha yüksek olmuştur. Konsantrasyonlara göre değerlendirildiğinde, uygulanan konsantrasyon arttıkça çıkış oranının azaldığı görülmüştür. Buna karşın ilk yaprak uzunluğu, koleoptil uzunluğu, sürgün uzunluğu ve fide boyu EMS'nin tüm konsantrasyonlarında kontrole göre daha yüksek olmuştur.

Bu çalışmada farklı süre ve konsantrasyonlarda uygulanan EMS bir çok karakteri olumlu yönde etkilemiş, dolayısıyla kontrole göre artışa neden olmuştur. Bu nedenle araştırmada uygulanan süre ve konsantrasyonlara göre LD₅₀ değeri belirlenememiştir. Normalde literatürlere göre önerilen konsantrasyon %0.3, süre ise 6 saat olup, bu denemede bu konsantrasyonun hem altı hem de üstü alınmış, ancak yinede LD₅₀ değeri oluşmamıştır. Bu durumda ileride yapılacak çalışmalarda daha yüksek konsantrasyonlar uygulanarak LD₅₀ değerinin tespit edilmesi önerilebilir.

Sakin (1998) tarafından makarnalık buğday (*Triticum durum* Desf.) Gediz-75 ve Sofu çeşitlerinde yapılan bir çalışmada gama ışını ve EMS'nin M₁ ve M₂ bitkileri üzerindeki etkileri belirlenmiştir. Araştırmacı, EMS'yi %0,1, %0,2, %0,3 ve %0,4'lük konsantrasyonlar halinde uygulamıştır. Araştırmada sonuçlarına göre; iki makarnalık buğday çeşidinde, M₁ ve M₂ bitkilerinde incelenen karakterler üzerinde mutagenlerin farklı etkiler meydana getirdiği ve bu etkilerin çeşitlere göre değiştiği belirlenmiştir. Araştırmacı, gama ışını ve EMS uygulamasının, M₁ bitkilerinde incelenen özellikler üzerinde olumsuz etkiler meydana getirdiğini ve bu etkilerin, konsantrasyon arttıkça daha da belirgin bir şekilde ortaya çıktığını kaydetmiştir. Araştırmacı, en uygun EMS konsantrasyonunun Gediz-75 için %0.4, Sofu çeşidi için ise %0.3 olduğunu belirlemiştir.

Buğdayda tohum çimlenmesi ve çimlenme ile ilgili bazı karakterler üzerine EMS uygulamasının etkisini belirlemek amacıyla Bahar and Akkaya (2009) tarafından yapılan bir denemede 3 farklı EMS (0.1, 0.2, ve %0.3) konsantrasyonu uygulanmıştır. Bu uygulamaların tohum çimlenmesi, koleoptil oluşumu, ilk yaprak oluşumu, kök uzunluğu, koleoptil uzunluğu, fide boyu, fide büyüme oranı, ilk yaprak uzunluğu, kök ve sürgün yaş ve kuru ağırlıkları üzerine olan etkileri incelenmiştir. Araştırmacılar, EMS uygulamasının, değerlendirilen tüm karakterler üzerine etkili olduğunu ve EMS konsantrasyonları arasındaki farklılığın istatistiksel olarak önemli olduğunu kaydetmişlerdir. Denemede, EMS'nin konsantrasyonu arttıkça incelenen tüm özelliklerin azaldığı tespit edilmiştir.

Çeltik (*Oryza sativa* L.) tohumlarına EMS'nin %0.25, %0.50, %0.75, %1.00, %1.25, %1.50 ve %2.00'lik konsantrasyonlarının uygulandığı bir çalışmada, EMS uygulamasının tohum çimlenmesini, fide boyunu, kök uzunluğunu ve tarla koşullarında çıkışı kontrole göre azalttığı tespit edilmiştir (Talebi *et al.* 2012). Araştırmacılar M₁ kuşağında farklı fiziksel ve kimyasal mutagenlerin etkilerini belirlemek için fide boyunun iyi bir ölçüt olarak kullanılabileceğini ve fide boyu ile fiziksel veya kimyasal mutagenin konsantrasyonu arasında doğrusal bir ilişki bulunduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca, denemede kimyasal mutagenin konsantrasyonu arttıkça kök uzunluğunun azaldığı belirlenmiştir.

Bu araştırmada elde edilen bulgulara benzer olarak kaba limonda birincil kök uzunluğu kontrolde 5.8 cm iken, EMS'nin %0.2, %0.3, ve %0.4'lük konsantrasyonlarında sırasıyla 6.3, 6.1 ve 5.9 cm olmuştur. Yine, düşük konsantrasyonlarda EMS'nin uyarıcı etkisi kök, sürgün ve fide uzunluğunda da gözlenmiştir. EMS'nin bu uyarıcı etkisinin, oksin gibi büyüme hormonunun aktivasyonunu artırarak hücrelerin bölünme hızını artırmasına bağlı olabileceği ifade edilmiştir (Zaka *et al.* 2004). Benzer bulgular muzda da elde edilmiştir (Omar *et al.* 1989). EMS ve MMS gibi kimyasal mutagenler uygulandığında çimlenme oranındaki aşamalı azalma fide büyümesinde de tespit edilmiştir (Sharma *et al.* 2013).

Tohumlara uygulanan sodyum azitin hem uygulama süresi hem de konsantrasyonu çimlenme oranı dışındaki çimlenme ile ilgili tüm karakterleri çok önemli derecede etkilemiştir. Uygulama süresi uzadıkça çimlenme hızı, çimlenme gücü, çimlenme oranı, çimlenme hızı katsayısı, çimlenme hızı indeksi ve çimlenme gücü indeksinin azaldığı, buna karşın ortalama çimlenme zamanının uzadığı tespit edilmiştir. Aynı şekilde, çimlenme ile ilgili karakterlerde olduğu gibi çimle ilgili karakterler de sodyum azitin hem uygulama süresinden hem de konsantrasyonundan çok önemli derecede etkilenmiştir. Genel olarak, uygulama süresi uzadıkça ve konsantrasyon arttıkça çimle ilgili karakterlerin tamamı azalmıştır. Fide ile ilgili karakterlerin tamamı sodyum azitin hem uygulama süresinden hem de konsantrasyonundan çok önemli derecede etkilenmiştir. Genel olarak, ilk yaprak uzunluğu, koleoptil uzunluğu, sürgün uzunluğu

ve fide boyu 1 saatlik uygulama süresinde diğer sürelerle göre daha yüksek, buna karşın çimlenme oranı daha düşük olmuştur. Konsantrasyon ortalamaları yönünden değerlendirildiğinde, 0.5, 1.0 ve 1.5 mM'lık konsantrasyonların çıkış oranı hariç diğer karakterlerde genel olarak artışa sebep oldukları belirlenmiştir. Buna karşın, sodyum azitin hemen tüm konsantrasyonları çıkış oranının düşmesine neden olmuştur.

Bu çalışmada farklı süre ve konsantrasyonlarda uygulanan sodyum azit çimlenme, çim ve fide ile ilgili bir çok karakteri olumsuz yönde etkilemiş, dolayısıyla kontrole göre azalmaya neden olmuştur. Ancak yine de araştırmada uygulanan süre ve konsantrasyonlarda LD₅₀ değeri oluşmamıştır. Normalde literatürlere göre önerilen konsantrasyon 1 mM, süre ise 2 saat olup, bu denemede bu konsantrasyonun hem altı hem de üstü alınmış, ancak yinede LD₅₀ değeri oluşmamıştır. Bu durumda, ileride yapılacak çalışmalarda daha düşük konsantrasyonlar uygulanarak LD₅₀ değerinin tespit edilmesi önerilebilir.

Sodyum azit kültür bitkilerinde en güçlü kimyasal mutagenlerden biridir. Mutagenisitesi azit bileşiğinin organik metabolitinin üretimiyle gerçekleşmektedir (Owais ve Kleinhofs, 1988, Khan et al., 2009). Sodyum azit, mutasyon oluşturabilmek için hücrelerde mutagenik etmenin, muhtemelen azidoalanine metabolize edilmesi gerekir (Owais et al., 1983). Bu metabolitin arpada ve bakterilerde aminoasit analogu 1-azidoalanin (N₃-CH₂-CH(NH)₂-COOH) olduğu belirlenmiştir. Bunun üretimi O-asetilserin sülfhidrilaz enzimine bağlıdır. Bu enzim azido alanine veya 1-sisteini oluşturmak için sırasıyla , azit (N₃) veya süfitin (S₂) O-asetilserin ile kondensasyonunu katalizlerler (Khan and Goyal 2009).

Mutasyonların uyarılmasında en kritik faktör mutagenin konsantrasyonudur. Genel bir kural olarak, belli bir konsantrasyona kadar mutagenin konsantrasyonu arttıkça, normalde daha fazla mutasyon oluşmakta, ancak yüksek konsantrasyonlar aynı zamanda daha fazla fide hasarına ve ölüme neden olmaktadır (Jenks *et al.* 2007). Yüksek konsantrasyonlarda ortaya çıkan azalma, hücresel düzeyde gerçekleşen fizyolojik veya fiziksel düzensizliklerden kaynaklanmış olabilir.

Mutagenik uygulamalar sonucunda ortaya çıkan tohum çimlenmesindeki azalma, tohum çimlenmesi için gerekli fizyolojik ve biyolojik süreçlerin (enzim aktivitesi de dahil) gecikmesine veya engellenmesine ve mitotik süreçlerin engellenmesine bağlı olabilir (Mensah *et al.* 2007). Sodyum azitin çimlenme üzerine engelleyici etkisi, oksidatif fosforilasyonu engelleyen sitokrom oksidazın güçlü inhibitörleri olan azit anyonlarından kaynaklanabilir (Kleinhofs and Sander 1975). Ayrıca bu, proton pompasının potansiyel inhibitörü olup, mitokondriyel zar potansiyelini değiştirir (Zhang 2000). Bu etkiler hep birlikte ATP'nin biyosentezini engelleyebilirler, böylece elverişli ATP miktarı azalır ve bu durum çimlenme hızının yavaşlamasına ve çimlenme oranının azalmasına sebep olabilir. Çünkü, tüm canlı hücreler biyolojik reaksiyonları gerçekleştirebilmek için ATP molekülünden temin edilen enerjiye ihtiyaç duyarlar. Düşük enerji düzeyinde hücre içerisinde biyolojik reaksiyonların hızı azalmaktadır (Khan and Goyal 2009). Kleinhofs *et al.* (1978b), yüksek konsantrasyonların genetik ve fizyolojik aktivitede düzensizliğe sebep olarak hücrelerin ölümüne neden olabileceklerini kaydetmişlerdir. Cheng and Gao (1988) arpa tohumlarına sodyum azit uygulamışlar ve çimlenme oranının önemli derecede azaldığının tespit etmişlerdir.

Sadashiv *et al.* (2012), mutagenik uygulamalar sonrasında gerçekleşen tohum çimlenmesindeki azalmaların; genetik, sitolojik ve metabolik süreçlerde ortaya çıkan değişikliklerin etkisine bağlı olabileceğini bildirmiştir. Tohum çimlenmesindeki düşüş, temelde mutagenlerin tohumların metabolik aktivitelerine müdahale etmelerinden kaynaklanabilir (Sjodin 1962). Sinha and Godward (1972), tohum çimlenme oranında ve canlılıktaki azalmanın sebebinin fizyolojik düzeydeki bozukluklardan ve kromozomal hasarlardan kaynaklanabileceğini ifade etmişlerdir. Çimlenme süresince görev alan enzimlerin oluşumundaki düzensizlikler, özellikle kimyasal mutagenik uygulamaların sebep olduğu fizyolojik etkilerden biri olabilir (Kulkarni 2011).

Mutagen uygulamalarından sonra tohumların çimlenme oranında gözlemlenen düşüşler nokta mutasyonlarına veya genetik materyaldeki diğer hasarlara bağlı olabilir. Böyle hasarlar solunum oranında ve enerji üretiminde azalmaya ve nihayetinde tohum çimlenmesinde düşüşe sebep olabilirler (Sadashiv *et al.* 2012).

De Micco *et al.* (2011) tohum çimlenmesindeki azalmanın mitotik döngüdeki ve hücrelerin metabolik yollarındaki anormalliklerle ilişkili olduğunu bildirmişlerdir. Bitki canlılığındaki azalma ise sitogenetik hasara ve fizyolojik düzensizliklere atfedilmiştir (Sato and Gaul 1967). Yine, Srivastava *et al.* (2001) buğdayda fide canlılığındaki azalmanın, mutagenlerin hücrelerin farklı metabolik yollar üzerine olan engelleyici etkisinden kaynaklanabileceğini önermişlerdir.

Sodyum azit uygulanmış tohumlarda çimlenmedeki gecikmenin, enzim aktivitesini de kapsayan tohum çimlenmesi için gerekli fizyolojik ve biyolojik süreçlerin gecikmesine veya engellenmesine (Chrispeels and Varner 1967), hormonal dengesizliğe (Ananthaswamy *et al.* 1971) ve mitotik süreçlerin engellenmesine (Sato and Gaul 1967) bağlı olabileceği ifade edilmiştir. Azit iyonu hücrede enzimler ve DNA ile interaksiyon göstererek mutasyonun oluşmasında önemli rol oynar.

İşlem uygulanmış popülasyonlarda fide boyundaki azalma oksin düzeyindeki varyasyondan (Goud and Nayar 1968), birkaç enzimin spesifik aktivitesindeki değişimden (Cherry *et al.*, 1962) ve tohumda veya fidede uyarılmış fizyolojik hasardan (Ignacimuthu and Babu 1988) kaynaklanabilir. Sparrow and Evans (1961) fide gelişimindeki azalmanın temel sebebinin kromozomal hasar ve hücre bölünmesinin engellenmesi olduğunu kaydetmişlerdir. Aynı şekilde Blixt (1969), fide gelişiminin engellenmesinin biyokimyasal süreçleri kontrol eden genlerde oluşan büyük hasara veya akut kromozomal anormalliklerin ya da her ikisine bağlı olarak gerçekleşebileceğini bildirmiştir.

Bu araştırmada M₂ kuşağında erken dönemde (çimlenme de) kurağa toleranslı genotipleri belirlemek ve seleksiyon yapmak için polietilen glikol (PEG 6000) kullanılmıştır. PEG'in moleküler ağırlığı ozmotik potansiyeli etkileyecek kadar küçük, ancak bitki tarafından absorbe edilemeyecek kadar büyüktür, bu nedenle bitki dokularına hızlı bir şekilde penetre etmesi beklenmez (Carpita *et al.* 1979). PEG ya bitki tarafından absorbe edilmeden ortamın su potansiyelini düşürerek veya fitotoksik etki göstererek etkili olabilmektedir (Ebrahim *et al.* 2006; Rai *et al.* 2011).

Fidelerin erken gelişim döneminde kurağa dayanıklılık yönünden yapılacak seleksiyonlarda kuraklığı uyarmak için PEG gibi kimyasallar ortamda sıklıkla kullanılmaktadır. Lagerwerff *et al.* (1961) besin solüsyonu kültürünün ozmotik potansiyelini modifiye etmek için PEG'in kullanılabileceğini ve böylece bitkilerde deneysel protokollere uygun nispeten kontrollü bir şekilde su eksikliğinin temin edilebileceğini bildirmişlerdir (Money 1989; Zhou 1997).

Araştırma sonucunda PEG konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak çimlenme oranı uzalmıştır. Araştırmada elde edilen bulgulara benzer olarak (Hossein Pour vd. 2013) buğday bitkisinde yapmış oldukları çalışmada PEG konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak çimlenme oranının ve çimlerin gelişiminin azaldığı tespit edilmiştir. Yine, Alam *et al.* (2002), çeltik bitkisinde yapmış oldukları çalışmada PEG konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak çimlenme oranı ve çimlerin gelişiminin azaldığını belirlemişlerdir. Yoncada yapılan başka bir çalışmada (Zeid and Shedeed 2006) artan PEG konsantrasyonunun çimlenme oranında, hipokotil uzunluğunda, kök ve sürgün taze ve kuru ağırlığında azalmalara neden olduğu saptanmıştır.

5.2. Sonuç ve Öneriler

Bu araştırmadan elde edilen verilere göre olgun embriyo kültürüne etil metansülfonatın (EMS) farklı süre ve konsantrasyonlarda uygulanması bir çok karakteri olumlu yönde etkilemiştir. Etil metansülfonatın uygulama süresi ve konsantrasyonu arttıkça genel olarak kallus oluşum oranı azalmış, ancak rejenerasyon etkinliği ve bitki sayısı bakımından uygulama süresine göre ortalamalar dikkate alındığında, en yüksek rejenerasyon etkinliği ve bitki sayısı 6 saatlik uygulamadan elde edilmiş, 4 saatlik uygulaması ise son sırada yer almıştır. Diğer taraftan, ortalamalar esas alınarak konsantrasyonlara göre değerlendirme yapıldığında, rejenerasyon etkinliğinin ve bitki sayısının sırasıyla %0.4 ve %0.3'lük konsantrasyonlarda elde edildiği ve yine kontrol uygulamasının her iki karakter bakımından son sırada yer aldığı görülmüştür. LD₅₀ değeri hem rejenerasyon etkinliği hem de bitki sayısı için EMS'nin %0.1'lik konsantrasyonunun 8 saat süre ile uygulandığı muameleden elde edilmiştir.

Olgun embriyo kültürüne sodyum azitin (NaN_3) farklı süre ve konsantrasyonlarının etkileri bakımından bu araştırmadan elde edilen verilere göre, sodyum azit uygulaması kallus oluşumunu, rejenerasyon etkinliğini ve bitki sayısını azaltmış, bu etki özellikle yüksek konsantrasyonlarda ve uzun uygulama sürelerinde daha belirgin olmuştur. LD_{50} kriterine göre optimum konsantrasyonunun ve uygulama süresinin rejenerasyon etkinliği için 2 mM'lık konsantrasyonun 3 saat süreyle uygulanmasından, bitki sayısı için ise 4 mM'lık konsantrasyonun 1 saat süre ile uygulanmasından elde edilmiştir.

Bu araştırmada rejenerasyon etkinliği ve bitki sayısı üzerine mutagenin uygulama süresi ve konsantrasyonu çok önemli derecede etki oluşturmuştur. Kallusa etil metansülfonat farklı sürelerde uygulandığında, ortalamalar esas alınarak en yüksek rejenerasyon etkinliği ve bitki sayısı 6 saatlik uygulamadan, en düşük ise 4 saatlik uygulamadan elde edilmiştir. Diğer taraftan, ortalamalar esas alınarak konsantrasyonlara göre değerlendirme yapıldığında, en yüksek rejenerasyon etkinliği ve bitki sayısı kontrol grubunda en düşük ise 80 mM'lık konsantrasyonda olduğu görülmüştür. Kallusa etil metansülfonatın uygulanması durumunda LD_{50} kriterine göre bitki sayısı esas alındığında optimum konsantrasyonun ve uygulama süresinin 50 mM'lık konsantrasyonun 8 saat süre ile uygulanması olduğu tespit edilmiştir.

Bu araştırmada kallusa sodyum azitin uygulama süresi rejenerasyon etkinliğini ve rejenere bitki sayısını çok önemli derecede etkilemiş, en yüksek rejenerasyon etkinliği ve rejenere bitki sayısı 1 saatlik uygulamadan elde edilmiştir. Sodyum azitin uygulama süresi uzadıkça ve konsantrasyonu arttıkça her iki karakterde düşüşler ortaya çıkmış ve 4 saatlik uygulamada tüm konsantrasyonlarda herhangi bir rejenerasyon gerçekleşmemiştir. Sodyum azitin kallusa uygulanması durumunda LD_{50} değerine göre optimum konsantrasyonun ve uygulama süresinin hem rejenerasyon etkinliği hem de bitki sayısı için 1 mM'lık konsantrasyonunun 1 saat süre ile uygulandığı muamele olduğu belirlenmiştir.

Bu çalışmada farklı süre ve konsantrasyonlarda uygulanan EMS çimlenme, çim ve fide ile ilgili bir çok karakteri olumlu yönde etkilemiş, dolayısıyla kontrole göre artışa neden

olmuştur. Bu nedenle araştırmada uygulanan süre ve konsantrasyonlara göre LD₅₀ değeri belirlenememiştir. Buna göre ileride yapılacak çalışmalarda daha yüksek konsantrasyonlar uygulanarak LD₅₀ değerinin tespit edilmesi önerilebilir.

Farklı süre ve konsantrasyonlarda uygulanan sodyum azit çimlenme, çim ve fide ile ilgili bir çok karakteri olumsuz yönde etkilemiş, dolayısıyla kontrole göre azalmaya neden olmuştur. Ancak yine de araştırmada uygulanan süre ve konsantrasyonlarda LD₅₀ değeri oluşmamıştır. Bu durumda, ileride yapılacak çalışmalarda daha düşük konsantrasyonlar uygulanarak LD₅₀ değerinin tespit edilmesi önerilebilir.

M₂ tohumları -10 bar'lık PEG 6000 ortamında çimlendirmeye alınmış, böylece erken dönemde (çimlenme dönemi) kurağa toleranslılık yönünden test edilmiş ve seleksiyon yapılmıştır. Çimlenen tohum sayısı sodyum azit popülasyonunda (710 adet), EMS popülasyonuna (52 adet) göre daha fazla olmuştur.

KAYNAKLAR

- Abdul-Baki, A.A. and Anderson, J.D., 1970. Viability and leaching of sugars from germinating barley. *Crop Science*, 10 (1), 31-34.
- Aberathne, W., Hewawasam, W. and Bandara, D., 2004. New phenotypes of *Crossandra infundibuliformis* var. Danica through *in vitro* culture and induced mutations.
- Adamu, A. and Aliyu, H., 2007. Morphological effects of sodium azide on tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Science World Journal*, 2 (4).
- Adamu, A., Oluranju, P., Bate, J. and Ogunlade, O., 2002. Radio sensitivity and effective dose determination in groundnut (*Arachis hypogaea* L.) irradiated with gamma-rays. *J. Agric. Environ*, 3, 17-84.
- Ahloowalia, B., 1991. Somatic embryos in monocots, Their genesis and genetic stability. *Revue de Cytologie et de Biologie Végétales, Le Botaniste*, 14 (3-4), 223-235.
- Ahloowalia, B., 1998. *In-vitro* techniques and mutagenesis for the improvement of vegetatively propagated plants. *Somaclonal Variation and Induced Mutations in Crop Improvement*. Springer, 293-309.
- Ahloowalia, B. and Maluszynski, M., 2001. Induced mutations—A new paradigm in plant breeding. *Euphytica*, 118 (2), 167-173.
- Ahloowalia, B., Maluszynski, M. and Nichterlein, K., 2004. Global impact of mutation-derived varieties. *Euphytica*, 135 (2), 187-204.
- Akgun, I. and Tosun, M., 2004. Agricultural and Cytological Characteristics of M^h t Perennial Rye (*Secale montanum* Guss.) as Effected by the Application of Different Doses of Gamma Rays. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 7 (5), 827-833.
- Akkaya, A., 1993. Fosforlu gübre miktar ve uygulama yöntemlerinin kışlık buğdayda verim ve bazı verim unsurlarina etkisi. *Journal of the Faculty of Agriculture*, 24 (2).
- Alam, M.Z., Stuchbury, T. and Naylor, R.E.L., 2002. Effect of NaCl and PEG induced osmotic potentials on germination and early seeding growth of rice cultivars differing in salt tolerance. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 5 (11), 1207-1210.
- Ali A, Naz S, Alam S S and Iqbal J., 2007. In vitro induced mutation for screening of red rot (*Colletotrichum falcatum*) in sugarcane (*Saccharum officinarum*). *Pakistan Journal of Botany*. 39(6): 1979-1994.
- Alston, J.M., 2004. Horticultural biotechnology faces significant economic and market barriers. *California Agriculture*, 58 (2).
- Amarnath, S. and Prasad, A., 1998. Induced variability in homozygous and heterozygous genotypes of tobacco. *The Indian Journal of Genetics and Plant Breeding*, 58 (1), 69-77.
- Ananthaswamy, H., Vakil, U. and Sreenivasan, A., 1971. Biochemical and physiological changes in gamma-irradiated wheat during germination. *Radiation Botany*, 11 (1), 1-12.
- Anonim, 2009. Tahıl istatistikleri. , <http://www.tuik.gov.tr>.

- Ariraman, M., Gnanamurthy, S., Dhanavel, D., Bharathi, T. and Murugan, S., 2014. Mutagenic effect on seed germination, seedling growth and seedling survival of pigeon pea (*Cajanus cajan* (L.) Millsp). International Letters of Natural Sciences, Vol. 21, pp 41-49.
- Arora, R., Maherchandani, N. and Uppal, S., 1989. Modulation of gamma irradiation effects in wheat by growth regulators. Annals of Biology Ludhiana, 5 (2), 109-113.
- Arunyanart, S. and Soontronyatara, S., 2002. Mutation induction by γ and X-ray irradiation in tissue cultured lotus. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 70 (1), 119-122.
- Atak, Ç., Alikamanoğlu, S., Açık, L. and Canbolat, Y., 2004. Induced of plastid mutations in soybean plant (*Glycine max* L. Merrill) with gamma radiation and determination with RAPD. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 556 (1), 35-44.
- Auerbach, C. and Robson, J., 1946. "Chemical Production of Mutations," 157., 302. p, Nature,.
- Auti, S., 2005. Mutational Studies in mung (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). University of Pune, Pune (MS), India. 10.1007/978-1-4613-0433-3-23.
- Aydın, M., 2010. Bazı Ekmeklik Ve Makarnalık Buğday Çeşitlerinin Olgun Embriyo Kültürüne Tepkilerinin Belirlenmesi., Atatürk Üniversitesi,, Fen Bilimleri Enstitüsü, 109. pp.
- Aydin, M., Tosun, M. and Haliloglu, K., 2011. Plant regeneration in wheat mature embryo culture. African Journal of Biotechnology, 10 (70), 15749-15755.
- Babaoğlu, M., Yorgancılar, M. and Akbudak, M., 2001. Doku kültürü: Temel laboratuvar teknikleri (Plant tissue culture: Basic laboratory techniques). Bitki Biyoteknolojisi: Doku Kültürü ve Uygulamaları (Biotechnology of Plant: Plant Tissue Culture and Application). Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları-Konya-pp, 1-35.
- Bahaa El Den, J., 1993. Development of a new barley line by induced mutation [*Hordeum vulgare*]. Rachis (ICARDA).
- Bahar, B. and Akkaya, M.S., 2009. Effects of EMS treatment on the seed germination in wheat. Journal of Applied Biological Sciences, 3 (1), 53-58.
- Barakat, M. and El-Sammak, H., 2011. *In vitro* Mutagenesis, Plant Regeneration and Characterization of Mutants Via RAPD Analysis in Baby's Breath'*Gypsophila paniculata* L.' 5(2):214-222.
- Barshile, J., 2006. Studies on effect of mutagenesis employing EMS, SA and GR in Chickpea (*Cicer arietinum* L.), Ph. D. Thesis. www.scipress.com/ilns.30.1.
- Başer, İ., Bilgin, O., Korku, K. and Balkan, A., 2007. Makarnalık buğdayda mutasyon ıslahı ile bazı kantitatif karakterlerin geliştirilmesi. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarım Bilimleri Dergisi, 13 (4), 346-353.
- Bashir, S., Wani, A.A. and Nawchoo, I.A., 2013. Mutagenic sensitivity of Gamma rays, EMS and Sodium azide in *Trigonella Foenum-Graecum* L. Science Research Reporter, 3 (1), 20-26.
- Berenschot, A.S., Zucchi, M.I., Tulmann-Neto, A. and Quecini, V., 2008. Mutagenesis in *Petunia x hybrida* Vilm. and isolation of a novel morphological mutant. Brazilian Journal of Plant Physiology, 20 (2), 95-103.

- Bhagwat, B. and Duncan, E., 1998. Mutation breeding of banana cv. Highgate (*Musa spp.*, AAA Group) for tolerance to *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense using chemical mutagens. *Scientia horticulturae*, 73 (1), 11-22.
- Bhat, T.A., Sharma, M. and Anis, M., 2007. Diethylsulphate and Sodium Azide in Broad Bean (*Vicia faba* L.). *Asian Journal of Plant Sciences*, 6 (7), 1051-1057.
- Bhosale, U., Hallale, B. and Dubhashil, S., 2013. M₁ generation studies in urd bean (*Vigna mungo* (L.) Hepper). *Advances in Applied Science Research*, 4 (3), 95-97.
- Bidabadi, S.S., Meon, S., Wahab, Z., Subramaniam, S. and Mahmood, M., 2012. Induced mutations for enhancing variability of banana (*Musa spp.*) shoot tip cultures using ethyl methanesulphonate (EMS), 6 (3), 391-401.
- Bilgin, İ.B.K.K.O., 2005. Mutagen Uygulamasının Makarnalık Buğdaylarda (*T. durum Thell*) M₁ Generasyonundaki Varyasyona Etkisi. *JOTAF/Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 2 (1), 60-72.
- Blixt, S., 1969. Studies of induced mutations in peas. xxv. genetically conditioned differences in radiation sensitivity, *Agriculture Horticulture*, 27 (3 and 4), 78-100
- Blum, A., 1989. 11 Breeding methods for drought resistance. *Plants under stress: biochemistry, physiology and ecology and their application to plant improvement*, 39, 197.
- Briggs, F.N. and Knowles, P.F., 1967. *Introduction to plant breeding*. chapman-reinhold 426 p, Inc. Reinhold Publishing Corporation.
- Carpita, N., Sabularse, D., Montezinos, D. and Delmer, D.P., 1979. Determination of the pore size of cell walls of living plant cells. *Science*, 205 (4411), 1144-1147.
- Caruso, G., Cavaliere, C., Foglia, P., Gubbiotti, R., Samperi, R. and Laganà, A., 2009. Analysis of drought responsive proteins in wheat (*Triticum durum*) by 2D-PAGE and MALDI-TOF mass spectrometry. *Plant Science*, 177 (6), 570-576.
- Castillo, A., Cistue, L., Valles, M., Sanz, J., Romagosa, I. and Molina-Cano, J.L., 2001. Efficient production of androgenic doubled-haploid mutants in barley by the application of sodium azide to anther and microspore cultures. *Plant Cell Reports*, 20 (2), 105-111.
- Chakravarty, B. and Sen, S., 2001. Enhancement of regeneration potential and variability by γ -irradiation in cultured cells of *Scilla indica*. *Biologia Plantarum*, 44 (2), 189-193.
- Cheng, X. and Gao, M., 1988. Biological and genetic effects of combined treatments of sodium azide, gamma rays and EMS in barley. *Environmental and Experimental Botany*, 28 (4), 281-288.
- Chopra, V., 2005. Mutagenesis: Investigating the process and processing the outcome for crop improvement. *Current Science*, 89 (2), 353-359.
- Chrispeels, M.J. and Varner, J., 1967. Gibberellic acid-enhanced synthesis and release of α -amylase and ribonuclease by isolated barley and aleurone layers. *Plant Physiology*, 42 (3), 398-406.
- Çiftçi, C.Y. and Şenay, A., 2005. Makarnalık buğdayda (*Triticum durum* desf.) gama ışını ve EMS'in farklı dozlarının ayrı ayrı ve birlikte uygulanmasının M₂ bitkilerindeki etkileri. *Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 14 (1-2).

- Collet, S.A.O., Collet, M.A. and Machado, M.F.P.S., 2005. Differential Gene Expression for Isozymes in Somatic Mutants of *Vitis Vinifera* L. (*Vitaceae*). *Biochemical Systematics and Ecology*, 33, 691-703.
- Das, A., Gosal, S., Sidhu, J. and Dhaliwal, H., 2000. Induction of mutations for heat tolerance in potato by using *in vitro* culture and radiation. *Euphytica*, 114 (3), 205-209.
- De Micco, V., Arena, C., Pignalosa, D. and Durante, M., 2011. Effects of sparsely and densely ionizing radiation on plants. *Radiation and Environmental Biophysics*, 50 (1), 1-19.
- De Oliveira Collet, S.A., Collet, M.A. and Maria de Fátima, P., 2005. Differential gene expression for isozymes in somatic mutants of *Vitis vinifera* L. (*Vitaceae*). *Biochemical Systematics and Ecology*, 33 (7), 691-703.
- Deane, C., Fuller, M. and Dix, P., 1995. Selection of hydroxyproline-resistant proline-accumulating mutants of cauliflower (*Brassica oleracea* var. botrytis). *The Methodology of Plant Genetic Manipulation: Criteria for Decision Making*. Springer, 329-334.
- Del Campo, A. and Coletto, R., 1999. Induction chromosomal aberrations during replication phase (S) by sodium azide in root meristems of *Allium cepa*, L. *Ciencia-Maracaibo*, 7, 118-125.
- Delbreil, B. and Jullien, M., 1994. Evidence for *in vitro* induced mutation which improves somatic embryogenesis in *Asparagus officinalis* L. *Plant Cell Reports*, 13 (7), 372-376.
- Deng, X.P., Shan, L., Inanaga, S. and Inoue, M., 2005. Water-saving approaches for improving wheat production. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85 (8), 1379-1388.
- Dhakshanamoorthy, D., Selvaraj, R. and Chidambaram, A., 2010. Physical and chemical mutagenesis in *Jatropha curcas* L. to induce variability in seed germination, growth and yield traits. *Romanian Journal of Biology*, 55 (2), 113-125.
- Dilday, R., Mgonja, M., Amonsilpa, S., Collins, F. and Wells, B., 1990. Plant Height vs. Mesocotyl and Coleoptile Elongation in Rice: Linkage or Pleiotropism? *Crop Science*, 30 (4), 815-818.
- Dita, M.A., Rispail, N., Prats, E., Rubiales, D. and Singh, K.B., 2006. Biotechnology approaches to overcome biotic and abiotic stress constraints in legumes. *Euphytica*, 147 (1-2), 1-24.
- Divanlı, T., 2003. Bezelye (*Pisum Sativum* L.) de mutasyon islahı ve *in vitro* kültürü uygulamaları, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara Üniversitesi, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı, 109 pp.
- Dobres, M.S., 2008. Barriers to genetically engineered ornamentals: an industry perspective. *Floriculture, ornamental and plant biotechnology*. Global Science Books, UK, 1-115.
- Ebrahim, M.K., Ibrahim, I.A., Emara, H.A. and Komor, E., 2006. Impact of polyethylene glycol-induced water stress on growth and development of shoot tip cultures from different banana (*Musa* spp.) cultivars. *The Journal of Applied Horticulture*, 8 (1), 53-57.

- El-Sayed, O., Rizkalla, A. and Sabri, S., 2007. *In vitro* mutagenesis for genetic improvement of salinity tolerance in wheat. Research Journal of Agriculture and Biological Sciences, 4 (5), 377-383.
- Elkoca, E., 1997. Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.)'de Tuza dayanıklılık üzerine bir araştırma (Yüksek Lisans Tezi). Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Errabii, T., Gandonou, C.B., Essalmani, H., Abrini, J., Idaomar, M. and Skali-Senhaji, N., 2006. Growth, proline and ion accumulation in sugarcane callus cultures under drought-induced osmotic stress and its subsequent relief. African Journal of Biotechnology, 5 (16).
- FAO/IAEA, 2012. Programme,, <http://mvgs.iaea.org>.
- Fehr, W.R., 1993. Mutation breeding. In: Theory and Technique, Principles of cultivar development. NY, U.S.A, Macmillian Publishing Comp, 287-303.
- Franks, T., Botta, R., Thomas, M. and Franks, J., 2002. Chimerism in grapevines: implications for cultivar identity, ancestry and genetic improvement. Theoretical and Applied Genetics, 104 (2-3), 192-199.
- Fujii, T. and Tano, S., 1986. Mutagenic activities of EMS on somatic (M_1) and recessive (M_2) mutations in the soybean test system. Environmental and experimental botany, 26 (2), 191-195.
- Gaj, M.D., 2001. Direct somatic embryogenesis as a rapid and efficient system for *in vitro* regeneration of *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 64 (1), 39-46.
- Gaj, M.D., 2002. Stimulation of somatic embryo formation by mutagens and darkness in culture of immature zygotic embryos of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Plant Growth Regulation, 37 (1), 93-98.
- Ganesan, M. and Jayabalan, N., 2004. Evaluation of haemoglobin (*Erythrogen*): for improved somatic embryogenesis and plant regeneration in cotton (*Gossypium hirsutum* L. cv. SVPR 2). Plant Cell Reports, 23 (4), 181-187.
- Gill, K., Bains, K. and Chand, K., 1974. Differential response of mutagens in inducing genetic variation in metrical traits in barley. Z. Pflanzenzucht. 71; 117-123.
- Girija, M. and Dhanavel, D., 2009. Mutagenic effectiveness and efficiency of gamma rays, ethyl methane sulphonate and their combined treatments in cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp). International Journal of Molecular, 4, 68-75.
- Goud, J. and Nayar, K., 1968. Effect of irradiation on seedlings of methi. Mysore journal of agricultural sciences, 11, 53-55.
- Grant, W.F. and Salamone, M.F., 1994. Comparative mutagenicity of chemicals selected for test in the International Program on Chemical Safety's collaborative study on plant systems for the detection of environmental mutagens. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 310 (2), 187-209.
- Griffiths, A., J, F, Miller J. H, Susuki D, Lewontin R. C, Gelbart W. M 1996. Gene Mutation. W.H. Freeman and Company, New York, 181- 210.
- Hassan, N.S., Shaaban, L.D., Hashem, E. and Seleem, E.E., 2004. *In vitro* selection for water stress tolerant callus line of *Helianthus annuus* L. cv. Myak. International Journal of Agriculture and Biology, 6, 1-13.
- Haughn, G. and Somerville, C., 1986. Selection of herbicide resistance at the whole plant level, American Chemical Society Symposium Series.

- He, J., Hu, Y., Li, W.-C. and Fu, F.-L., 2009. Drought tolerant mutant induced by gamma-ray and sodium azide from maize calli. *Maize Genetics Cooperation Newsletter* (83), 53-55.
- Henikoff, S. and Comai, L., 2003. Single-nucleotide mutations for plant functional genomics. *Annual Review of Plant Biology*, 54 (1), 375-401.
- Henry, Y., Nato, A. and De Buyser, J., 1998. Genetic fidelity of plants regenerated from somatic embryos of cereals. *Somaclonal Variation and Induced Mutations in Crop Improvement*, 65-80.
- Hewawasam, W.D.C.J., Bandara D. C. and Aberathne W. M., 2004. New phenotypes of *Crossandra infundibuliformis* var. Danica through *in vitro* culture and induced mutations. *Tropical Agriculture Research*, 16, 253-270.
- Hildebrand, D., Liu W, Deng, W, Garyburn, WS and G.B.C., 1991. Progress in biotechnological approaches in the improvement of seed quality. *Plant Biotechnology and the Oils and fats Industry*, ed., Ed: W.R.e. Rattray JMB. American Oil Chem Press, 13.
- Hofmann, N., Raja, R., Nelson, R. and Korban, S., 2004. Mutagenesis of embryogenic cultures of soybean and detecting polymorphisms using RAPD markers. *Biologia Plantarum*, 48 (2), 173-177.
- Hossain, Z., Mandal, A., Datta, S. and Biswas, A., 2006. Development of NaCl-Tolerant Strain in *Chrysanthemum morifolium* Ramat. Through *in vitro* Mutagenesis. *Plant Biology*, 8 (4), 450-461.
- Hossein Pour, A., Aydın, M., Tosun, M. and Haliloğlu, K., 2013. Buğdayda kuraklık ve putresin uygulamasının tohum çimlenmesi üzerine etkileri, Türkiye X. Tarla Bitkileri Kongresi, Konya, 528-533.
- Ibrahim, R., Mondelaers, W. and Debergh, P.C., 1998. Effects of X-irradiation on adventitious bud regeneration from *in vitro* leaf explants of *Rosa hybrida*. *Plant cell, tissue and organ culture*, 54 (1), 37-44.
- Ignacimuthu, S. and Babu, C., 1988. Radiosensitivity of the wild and cultivated *Urd* and *Mung Beans*. *The Indian Journal of Genetics and Plant Breeding*, 48 (3), 331-342.
- Jabeen, N. and Mirza, B., 2002. Ethyl methane sulfonate enhances genetic variability in *Capsicum annuum*. *Asian Journal of Plant Sciences*, 1 (4), 425-428.
- Jain, S. and Maluszynski, M., 2004. Induced mutations and biotechnology in improving crops. *In vitro*, 170-202.
- Jain, S.M., 2000. *In Vitro* Mutagenesis in Banana (*Musa* spp.) Improvement. Helsinki Finland Acta Horticulture, Department of Applied Biology University of Helsinki
- Jain, S.M., 2001. Tissue culture-derived variation in crop improvement. *Euphytica*, 118 (2), 153-166.
- Jain, S.M., 2005. Major mutation-assisted plant breeding programs supported by FAO/IAEA. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 82 (1), 113-123.
- Jamil, M. and Khan, U.Q., 2002. Study of genetic variation in yield components of wheat cultivar Bukhtwar-92 as induced by gamma radiation. *Asian Journal of Plant Sciences*. 1, 579-580.
- Jeng, T., Tseng, T., Wang, C., Chen, C. and Sung, J., 2003. Starch biosynthesizing enzymes in developing grains of rice cultivar *Tainung 67* and its sodium azide-induced rice mutant. *Field Crops Research*, 84 (3), 261-269.

- Jeng, T., Tseng, T., Wang, C., Chen, C. and Sung, J., 2006. Yield and grain uniformity in contrasting rice genotypes suitable for different growth environments. *Field Crops Research*, 99 (1), 59-66.
- Jenks, M.A., Hasegawa, P.M., Jain, S.M. and Foolad, M., 2007. *Advances in molecular breeding toward drought and salt tolerant crops*. Springer. Pp 797.
- Johnsen, A.R., Bendixen, K. and Karlson, U., 2002. Detection of microbial growth on polycyclic aromatic hydrocarbons in microtiter plates by using the respiration indicator WST-1. *Applied and Environmental Microbiology*, 68 (6), 2683-2689.
- Joseph, S., Girish, T., Nair, S. and Vasudevan, K., 1999. Induction and recovery of acyanogenic mutants in cassava. *Tropical tuber crops in food security and nutrition*. Oxford and IBH, New Delhi, 124-127.
- Kaeppler, S.M., Kaeppler, H.F. and Rhee, Y., 2000. Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. *Plant Molecular Biology*, 43 (2-3), 179-188.
- Kasumi, M., Takatsu, Y., Manabe, T. and Hayashi, M., 2001. The effects of irradiating gladiolus (*Gladiolus x grandiflora hort.*) cormels with gamma rays on callus formation, somatic embryogenesis and flower color variations in the regenerated plants. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 1, 126 - 128.
- Kaya, A., 2006. Çukurova'nın taban ve kıraç koşullarında bazı ekmeklik buğday genotiplerinin morfolojik ve teknolojik özelliklerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. 82 Pp.
- Kaya, M.D., Okçu, G., Atak, M., Çıkılı, Y. and Kolsarıcı, Ö., 2006. Seed treatments to overcome salt and drought stress during germination in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *European Journal of Agronomy*, 24 (4), 291-295.
- Kenganal, M., Hanchinal, R.R. and Nadaf, H.L., 2008. Ethyl methane sulphonate (EMS) induced mutation and selection for salt tolerance in sugarcane *in vitro*. *Indian Journal of Plant Physiology*, 13 (4), 405 -410.
- Khan, I., Hassan, G., Khan, M. and Khan, I., 2004. Efficacy of some new herbicidal molecules on grassy and broadleaf weeds in wheat-II. *Pakistan Journal of Weed Science Research*, 10, 405-4012.
- Khan, M.R., Qureshi, A.S., Hussain, S. and Ibrahim, M., 2005. Genetic variability induced by gamma irradiation and its modulation with gibberellic acid in M₂ generation of chickpea (*Cicer arietinum* L.), *Pakistan Journal of Botany*, 37 (2), 285.
- Khan, S. and Goyal, S., 2009. Improvement of mungbean varieties through induced mutations. *African Journal of Plant Science*, 3, 174-180.
- Khawale, R.N., Singh, S.K. and Yerramilli, V., 2007. Molecular marker-assisted selection of *in vitro* chemical mutagen-induced grapevine mutants, *Current Science*, 92, 1056-1060.
- Kilbey, B. and Hunter, F., 1983. Factors affecting mutational yield from EMS exposures of yeast (*S. cerevisiae*). *Mutation Research Letters*, 122 (1), 35-38.
- Kiruki, S., Onok, L. and Limo, M., 2006. Azide-based mutagenesis suppresses *Striga hermonthica* seed germination and parasitism on maize varieties. *African Journal of Biotechnology*, 5 (10).
- Kita, Y., Nishizawa, K., Takahashi, M., Kitayama, M. and Ishimoto, M., 2007. Genetic improvement of the somatic embryogenesis and regeneration in soybean and transformation of the improved breeding lines. *Plant Cell Reports*, 26 (4), 439-447.

- Kleinhofs, A., Warner, R., Murhlbauer, F. and Nilan, R., 1978a. Induction and selection of specific gene mutations in *Hordeum* and *Pisum*. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 51 (1), 29-35.
- Kleinhofs, A.W., Owais, M. and Nilan, R.A., 1978b. Azide Mutation Research. 55, 165-195.
- Kleinhofs, W. and Sander, C., 1975. Azide mutagenesis in Barley, Third Barley Genetics Symp. Garching, Proceedings of Symp, Pp. 113-122.
- Kodym, A. and Afza, R., 2003. Physical and chemical mutagenesis. *Plant functional genomics*. Springer, 189-203.
- Kulkarni, G., 2011. Effect of mutagen on pollen fertility and other parameters in horsegram (*Macrotyloma uniflorum* (Lam.) Verdc). *Biology Science discovery*, 2 (1), 146-150.
- Kulkarni, V., Ganapathi, T., Suprasanna, P. and Bapat, V., 2007. *In vitro* mutagenesis in banana (*Musa* spp.) using gamma irradiation. *Protocols for micropropagation of woody trees and fruits*. Springer, 543-559.
- Kumar, A. and Mishra, M., 2004. Gamma rays irradiation under dry, pre and post soaked condition on yield and its attributes in M 2 populations of urdbean (*Vigna mungo* (L.) Hepper). *Plant Science*, 17, 475-478.
- Kumar, J.S. and Selvaraj, R., 2003. Mutagenic effectiveness and efficiency of gamma rays and ethyl methane sulphonate in sunflower (*Helianthus annus* L.). *Madras Agriculture Journal*, 90, 574-576.
- Kumar, K., 2009. Development of salt tolerance in 'Rough Lemon' (*Citrus jambhiri* Lush.) through *in vitro* mutation breeding, Punjab Agricultural University, Ludhiana, India. Pp 165.
- Kumar, K., Gill, M., Kaur, H., Choudhary, O. and Gosal, S., 2010. *In vitro* mutagenesis and somaclonal variation assisted salt tolerance in rough lemon'(*Citrus jambhiri* lush.). *European Journal of Horticultural Science*, 233-238.
- La, V.J. and Mongold, J., 1987. Structure activity relationship of the azide metabolite, azidoalnine. *Salmonella typhimurium*. *Mutation Research*, 177, 27-33.
- Lagerwerff, J., Ogata, G. and Eagle, H.E., 1961. Control of osmotic pressure of culture solutions with polyethylene glycol. *Science*, 133 (3463), 1486-1487.
- Laneri, U., Franconi, R. and Altavista, P., 1989. Somatic mutagenesis of *Gerbera jamesonii* hybr.: irradiation and *in vitro* culture, I International Symposium on *In Vitro* Culture and Horticultural Breeding 280, pp. 395-402.
- Larher, F., Leport, L., Petrivalsky, M. and Chappart, M., 1993. Effectors for the osmoinduced proline response in higher plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 31 (6), 911-922.
- Latado, R.R., Adames, A.H. and Neto, A.T., 2004. *In vitro* mutation of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) with ethylmethanesulphonate (EMS) in immature floral pedicels. *Plant cell, tissue and organ culture*, 77 (1), 103-106.
- Lee, H.-S., Kim, Y.-W. and Park, E. H., 1998. Introduction, Development, and Characterization of Supernodulating Soybean Mutant-Shoot Factor Regulation of Nodule Development in Supernodulating Soybean Mutant. *Korean Journal of Crop Science*, 43 (1), 28-31.

- Lee, I.S., Kim, D.S., Lee, S.J., Song, H.S., Lim, Y.P. and Lee, Y.I., 2003. Selection and characterizations of radiation-induced salinity-tolerant lines in rice. *Breeding Science*, 53 (4), 313-318.
- Lee, Y., Lee, I.S. and Lim, Y.P., 2002. Variations in sweetpotato regenerates from gamma-ray irradiated embryogenic callus. *J Plant Biotechnol*, 4, 163-170.
- Li, D., Barclay, I., Jose, K., Stefanova, K. and Appels, R., 2008. A mutation at the Ala122 position of acetohydroxyacid synthase (AHAS) located on chromosome 6D of wheat: improved resistance to imidazolinone and a faster assay for marker assisted selection. *Molecular Breeding*, 22 (2), 217-225.
- Ling, A.P.K., Chia, J.Y., Hussein, S. and Harun, A.R., 2008. Physiological responses of *Citrus sinensis* to gamma irradiation. *World Applied Sciences Journal*, 5 (1), 12-19.
- Lopez, C., Banowetz, G., Peterson, C. and Kronstad, W., 2001. Differential Accumulation of a 24-kd Dehydrin Protein in Wheat Seedlings Correlates with Drought Stress Tolerance at Grain Filling. *Hereditas*, 135 (2-3), 175-181.
- Lu, G., Zhang, X., Zou, Y., Zou, Q., Xiang, X. and Cao, J., 2007. Effect of radiation on regeneration of Chinese narcissus and analysis of genetic variation with AFLP and RAPD markers. *Plant Cell, Tissue and Organ culture*, 88 (3), 319-327.
- Luan, Y.-S., Zhang, J., Gao, X. R. and An, L. J., 2007. Mutation induced by ethylmethanesulphonate (EMS), *in vitro* screening for salt tolerance and plant regeneration of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 88 (1), 77-81.
- Maguire, J.D., 1962. Speed of germination aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Science*, 2 (2), 176-177.
- Manzanilla-Ramirez, M., Robles-Gonzalez, M., Guzman-Gonzalez, S., Medina-Urrutia, V. and Litz, R., 2001. Radio sensitivity of somatic embryogenic masses of mango cv. Ataulfo (*Mangifera indica* L.). *Hortscience*, 36, 535.
- Mensah, J., Obadoni, B., Akomeah, P., Ikhajagbe, B. and Ajibolu, J., 2007. The effects of sodium azide and colchicine treatments on morphological and yield traits of sesame seed (*Sesame indicum* L.). *African Journal of Biotechnology*, 6 (5).
- Michel, B.E. and Kaufmann, M.R., 1973. The osmotic potential of polyethylene glycol 6000. *Plant Physiology*, 51 (5), 914-916.
- Mitra, J., 2001. Genetics and genetic improvement of drought resistance in crop plants. *Current Science Bangalore*, 80 (6), 758-763.
- Mohamed, M.-H., Harris, P. and Henderson, J., 2000. *In vitro* selection and characterisation of a drought tolerant clone of *Tagetes minuta*. *Plant Science*, 159 (2), 213-222.
- Molina-Cano, J., Simiand, J., Sopena, A., Perez-Vendrell, A., Dorsch, S., Rubiales, D., Swanson, J. and Jahoor, A., 2003. Mildew-resistant mutants induced in North American two-and six-rowed malting barley cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*, 107 (7), 1278-1287.
- Mondal, S., Badigannavar, A., Kale, D. and Murty, G., 2007. Induction of genetic variability in a disease-resistant groundnut breeding line. *Barc Newsletter*, 285, 237.
- Money, N.P., 1989. Osmotic pressure of aqueous polyethylene glycols relationship between molecular weight and vapor pressure deficit. *Plant Physiology*, 91 (2), 766-769.

- Mshembula, B., Mensah, J. and Ikhajiagbe, B., 2012. Comparative assessment of the mutagenic effects of sodium azide on some selected growth and yield parameters of five accessions of cowpea–*Tvu-3615*, *Tvu-2521*, *Tvu-3541*, *Tvu-3485* and *Tvu-3574*. Archives of Applied Science Research, 4 (4), 1682-1691.
- Murashige, T. and Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15 (3), 473-497.
- Muthusamy, A., 2001. *In vivo* and *in vitro* mutagenesis in *Gossypium hirsutum* L. for crop improvement, Ph.D. thesis, Bharathidasan University, Tiruchirappalli, Pp 165.
- Muthusamy, A., Vasanth, K., Sivasankari, D., Chandrasekar, B. and Jayabalan, N., 2007. Effects of mutagens on somatic embryogenesis and plant regeneration in groundnut. Biologia Plantarum, 51 (3), 430-435.
- Nakata, Y., Ueno, M., Kihara, J., Ichii, M., Taketa, S. and Arase, S., 2008. Rice blast disease and susceptibility to pests in a silicon uptake-deficient mutant *Isi1* of rice. Crop Protection, 27 (3), 865-868.
- Namasivayam, P., 2007. Acquisition of embryogenic competence during somatic embryogenesis. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 90 (1), 1-8.
- Ndou, V.N., 2012. Chemical mutagenesis of wheat for herbicide resistance, University of KwaZulu-Natal, Pietermaritzburg, Pp 121.
- Nonomura, T., Ikegami, Y., Morikawa, Y., Matsuda, Y. and Toyoda, H., 2001. Induction of Morphologically Changed Petals from Mutagen-treated Apical Buds of Rose and Plant Regeneration from Varied Petal-derived Calli. Plant Biotechnology, 18 (3), 233-236.
- Novak, F.J. and Micke, A., 1987. *In vitro* mutants technology for crop improvement in developing countries. Society for the Advancement of Breeding 19, 82-85.
- Okubara, P.A., Anderson, P.A., Ochoa, O.E. and Michelmore, R.W., 1994. Mutants of downy mildew resistance in *Lactuca sativa* (lettuce). Genetics, 137 (3), 867-874.
- Oliver, R., Yang, C., Hu, G., Raboy, V. and Zhang, M., 2009. Identification of PCR-based DNA markers flanking three low phytic acid mutant loci in barley. Journal of Plant Breeding and Crop Science, 1, 087-093.
- Omar, M., Novak, F. and Brunner, H., 1989. *In vitro* action of ethylmethanesulphonate on banana shoot tips. Scientia Horticulturae, 40 (4), 283-295.
- Owais, W. and Kleinhofs, A., 1988. Metabolic activation of the mutagen azide in biological systems. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 197 (2), 313-323.
- Öztürk, A., 2011. Ekmeklik buğday genotiplerinin erken gelişme dönemlerindeki kuraklığa dayanıklılık yönünden karakterizasyonu. Tubitak.
- Padavai, P. and Dhanavel, D., 2004. Effect of EMS, DES and Colchicine treatment in soybean. Crops Research, 28 (1), 2.
- Palanivel, S., 1998. *In vitro* studies on groundnut (*Arachis hypogaea* L.) for crop improvement. Ph.D. thesis, Bharathidasan University, Tiruchirappalli.
- Pan, X., Wang, G., Chen, J. and Wei, X., 2003. Elevated growth redundancy and size inequality in spring wheat populations mulched with clear plastic film. The Journal of Agricultural Science, 140 (02), 193-204.
- Pande, S. and Khetmalas, M., 2012. Biological effect of sodium azide and Colchicine on seed germination and callus induction in *Stevia rebaudiana*. Asian Journal of Experimental Biological Sciences, 3 (1), 93-98.

- Peredo, E.L., Revilla, M.Á. and Arroyo-García, R., 2006. Assessment of genetic and epigenetic variation in hop plants regenerated from sequential subcultures of organogenic calli. *Journal of Plant Physiology*, 163 (10), 1071-1079.
- Pius, J., George, L., Eapen, S. and Rao, P., 1994. Evaluation of somaclonal and mutagen induced variation in finger millet. *Plant Breeding*, 112 (3), 239-243.
- Poehlman, J.M., 1994. *Breeding field crops*. Ames ,Iowa, USA, Iowa State University pres.
- Prabha, R., Dixit, V. and Chaudhary, B., 2010. Comparative spectrum of sodium azide responsiveness in plants, *American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences*, 8:779–783.
- Predieri, S., 2001. Mutation induction and tissue culture in improving fruits. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 64 (2-3), 185-210.
- Predieri, S. and Di Virgilio, N., 2007. *In vitro* mutagenesis and mutant multiplication. *Protocols for micropropagation of woody trees and fruits. Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits*, 323-333.
- Qin, H.-M., Wang, Y.-Q. and Hou, C.-X., 2011. Effect of ethyl methane sulfonate (EMS) in *in vitro* mutation on anther-derived embryos in loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.). *African Journal of Agricultural Research*, 6 (11), 2450-2455.
- Rai, M.K., Kalia, R.K., Singh, R., Gangola, M.P. and Dhawan, A., 2011. Developing stress tolerant plants through *in vitro* selection an overview of the recent progress. *Environmental and Experimental Botany*, 71 (1), 89-98.
- Rascio, A., Russo, M., Mazzucco, L., Platani, C., Nicastro, G. and Di Fonzo, N., 2001. Enhanced osmotolerance of a wheat mutant selected for potassium accumulation. *Plant Science*, 160 (3), 441-448.
- Rauf, M., Munir, M., ul Hassan, M., Ahmad, M. and Afzal, M., 2007. Performance of wheat genotypes under osmotic stress at germination and early seedling growth stage. *African Journal of Biotechnology*, 6 (8), Pp. 971-975.
- Rines, H., 1985. Sodium azide mutagenesis in diploid and hexaploid oats and comparison with ethyl methanesulfonate treatments. *Environmental and Experimental Botany*, 25 (1), 7-16.
- Roychowdhury, R. and Tah, J., 2011. Chemical mutagenic action on seed germination and related agro-metrical traits in M₁ *Dianthus* generation. *Current Botany*, 2 (8), 19-23.
- Sadashiv, S.T., Paul, B.N., Kumar, S., Chandra, A., Dhananjai, S. and Negi, M.P., 2012. Over expression of resistin in adipose tissue of the obese induces insulin resistance. *World Journal of Diabetes*, 3 (7), 135.
- Saif-Ur-Rasheed, M., Asad, S., Zafar, Y. and Waheed, R., 2001. Use of radiation and *in vitro* techniques for development of salt tolerant mutants in sugarcane and potato. *In vitro techniques for selection of radiation induced mutations adapted to adverse environmental conditions*, National Institute for Biotechnology and Genetic Engineering, 61-74.
- Sakin, M., 1998. The Effects of Different Gamma Ray and EMS Doses on M₁ and M₂ Generations in Durum Wheat (*Triticum durum* Desf.), PhD Thesis. Gaziosmanpasa University, Graduate School of Natural and Applied Science, Department of Field Crops. Tokat, Turkey.
- Sakthivelu, G., Devi, M.A., Giridhar, P., Rajasekaran, T., Ravishankar, G., Nedev, T. and Kosturkova, G., 2008. Drought-induced alterations in growth, osmotic

- potential and *in vitro* regeneration of soybean cultivars. General and Applied Plant Physiology, 34 (1-2), 103-112.
- Saleem, M., Mukhtar, Z., Cheema, A. and Atta, B., 2005. Induced mutation and *in vitro* techniques as a method to induce salt tolerance in Basmati rice (*Oryza sativa* L.). International Journal of Environmental Science and Technology, 2 (2), 141-145.
- SAS, I., 2002. (Cary, United States) SAS user's guide: Statistics.
- Sato, M. and Gaul, H., 1967. Effect of EMS on Fertility in Barley. Rad. Bot, 7 (7-10.).
- Schy, W.E. and Plewa, M.J., 1989. Molecular dosimetry studies of forward mutation induced at the *yg2* locus in maize by ethyl methanesulfonate. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 211 (2), 231-241.
- Senapati, N., Misra, R. and Muduli, K., 2008. Induced macromutation in blackgram *Vigna mungo* (L.) Hepper. Legume Research an International Journal, 31 (4), 243-248.
- Şenay, A. and Çiftçi, C.Y., 2005a. Makarnalık buğdayda (*Triticum durum* desf.) gama ışını ve EMS'nin farklı dozlarının ayrı ayrı ve birlikte uygulanmasının M₁ bitkilerinin ilk gelişme dönemindeki etkileri, Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi, Pp. 23.
- Şenay, A. and Çiftçi, C.Y., 2005b. Makarnalık buğdayda (*Triticum durum* desf.) gama ışını ve EMS'nin farklı dozlarının ayrı ayrı ve birlikte uygulanmasının M₁ bitkilerinin ilk gelişme dönemindeki etkileri, Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi, Pp. 32.
- Sharma, B., 2002. Induced polygenic variability in different groups of mutagenic damage in lentil (*Lens culinaris* Medik.). Indian Journal of Genetics and Plant Breeding, 62 (2), 135-139.
- Sharma, L.K., Manisha, K., M. I. S, G. and Bali S. K, 2013. Germination and Survival of Citrus Jambhiri Seeds and Epicotyls After Treating With Different Mutagens Under *In Vitro* Conditions, Middle East Journal of Scientific Research, 16 (2), 250-255.
- Singh, R. and Kole, C., 2005. Effect of mutagenic treatment with EMS on germination and some seedling parameters in mungbean, Crop Research-Hisar-, 30 (2), 236.
- Singh, V., Singh, M. and Lal, J., 2000. Gamma ray and EMS induced genetic variability for quantitative traits in urdbean (*Vigna mungo* L. Hepper). Indian Journal of Genetics and Plant Breeding, 60 (1), 89-96.
- Sinha, S. and Godward, M., 1972. Radiation studies in *Lens culinaris*, Ranchi Univ., India, 32, Pp 331- 339.
- Sjodin, J., 1962. Some observations in X₁ and X₂ of *Vicia faba* L, after treatment with different mutagens. Hereditas, 48 (4), 565.
- Skoric, D., Jovic, S., Sakac, Z. and Lec ic, N., 2008. Genetic possibilities for altering sunflower oil quality to obtain novel oils, This article is one of a selection of papers published in the special issue Bridging the Gap: Where Progress in Cardiovascular and Neurophysiologic Research Meet. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology, 86 (4), 215-221.
- Solanki, I. and Phogat, D., 2005. Chlorophyll mutation induction and mutagenic effectiveness and efficiency in macrosperma lentil (*Lens culinaris* Medik.). National Journal of Plant Improvement, 7 (2), 81-84.

- Solanki, I. and Sharma, B., 1999. Induction and isolation of morphological mutations in different mutagenic damage groups in lentil (*Lens culinaris* Medik.). Indian Journal in Genetics 59 (4), 479-485.
- Spano, G., N. Di Fonzo, C. Perrotta, C. Platani, G. Ronga, D. W. Lawlor, J. A. Napier and P. R. Shewry, 2003. Physiological characterization of stay green mutants in durum wheat. Journal of Experimental Botany, 54 (386), 1415-1420.
- Sparrow, A.H. and Evans, H., 1961. Nuclear factors affecting radiosensitivity. The influence of nuclear size and structure, chromosome complement, and DNA content, Brookhaven Symposia in Biology, Pp. 76-100.
- Srivastava R. K., Sandhu A.S. and Gosal S.S., 2001. Effect of in vitro mutagenesis on plant regeneration in Citrus aurantifolia. Mutation Breed. News Letter. 45:48-50
- Sung, Z.R., 1976. Mutagenesis of cultured plant cells. Genetics, 84 (1), 51-57.
- Suzuki, Y., Sano, Y., Ise, K., Matsukura, U., Aoki, N. and Sato, H., 2008. A rice mutant with enhanced amylose content in endosperm without affecting amylopectin structure. Breeding science, 58 (3), 209-215.
- Svetleva, L. and Crino P, 2005. Effect of ethyl methanesulfonate (EMS) and N-nitroso-N-ethyl urea (ENU) on callus growth of common bean. Journal of Central European Agriculture, 6 (1), 59-64.
- Swanson, E., Herrgesell, M., Arnoldo, M., Sippell, D. and Wong, R., 1989. Microspore mutagenesis and selection: Canola plants with field tolerance to the imidazolinones. Theoretical and Applied Genetics, 78 (4), 525-530.
- Szarejko, I. and Forster, B., 2007. Doubled haploidy and induced mutation. Euphytica, 158 (3), 359-370.
- Talebi, A.B., Talebi, A.B. and Shahrokhifar, B., 2012. Ethyl methane sulphonate (EMS) induced mutagenesis in Malaysian rice (cv. MR219) for lethal dose determination. American Journal of Plant Sciences, 3, 1661-1665.
- Thapa, C., 2004. Effect of acute exposure of gamma rays on seed germination and seedling growth of Pinus kesiya Gord and P. wallichiana AB Jacks. Our Nature, 2 (1), 13-17.
- Till, B.J., Colbert, T., Tompa, R., Enns, L.C., Codomo, C.A., Johnson, J.E., Reynolds, S.H., Henikoff, J.G., Greene, E.A. and Steine, M.N., 2003. High-throughput TILLING for functional genomics. Plant Functional Genomics, 205-220.
- Toker, C., Uzun, B., Canci, H. and Ceylan, F.O., 2005. Effects of gamma irradiation on the shoot length of Cicer seeds. Radiation Physics and Chemistry, 73 (6), 365-367.
- Tosun, M., 2015. Mutasyon Islahı. Ziraat Fakültesi Ders Yayınları, Atatürk Üniversitesi.
- Touraev, A., Stöger, E., Voronin, V. and Heberle-Bors, E., 1997. Plant male germ line transformation. The Plant Journal, 12 (4), 949-956.
- Van den Bulk, R., Löffler, H., Lindhout, W. and Koornneef, M., 1990. Somaclonal variation in tomato: effect of explant source and a comparison with chemical mutagenesis. Theoretical and Applied Genetics, 80 (6), 817-825.
- Van Harten, A.M., 1998. Mutation breeding: theory and practical applications. Cambridge University Press.
- Van, K., Jang, H.J., Jang, Y.-E. and Lee, S.-H., 2008. Regeneration of plants from EMS-treated immature embryo cultures in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]. J Crop Sci Biotech, 11, 119-126.

- Venegas-Calcrón, M., Martínez-Force, E. and Garcés, R., 2008. Lipid characterization of a wrinkled sunflower mutant. *Phytochemistry*, 69 (3), 684-691.
- Venkatachalam, P., Geetha, N., Jayabalan, N. and Saravanababu, S., 1999. Effect of gamma rays and ethyl methane sulphonate on *in vitro* regeneration in groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *Plant Tissue Culture*, 9, 113-120.
- Verhoeven, J.T.J., Jansen, C., Willems, T., Kox, L., Owens, R. and Roenhorst, J., 2004. Natural infections of tomato by Citrus exocortis viroid, Columnea latent viroid, Potato spindle tuber viroid and Tomato chlorotic dwarf viroid. *European Journal of Plant Pathology*, 110 (8), 823-831.
- Wang, P. and Yu, B., 1991. Preliminary study on gamma-rays chronic radiation for growing plants in soybean. *Soybean Genet. Newsletter.*, 18:82-85.
- Wen, J.G. and Liang, H.G., 1995. Effect of KCN and NaN_3 pretreatment on the cyanide resistant respiration in tobacco callus. *Acta Botanica Sinica*, 37, 711-717.
- Wi, S.G., Chung, B.Y., Kim, J. S., Kim, J.-H., Baek, M. H., Lee, J.-W. and Kim, Y.S., 2007. Effects of gamma irradiation on morphological changes and biological responses in plants. *Micron*, 38 (6), 553-564.
- Wilcox, J., Cavins, J. and Nielsen, N., 1984. Genetic alteration of soybean oil composition by a chemical mutagen. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 61 (1), 97-100.
- Zaka, R., Chenal, C. and Misset, M., 2004. Effects of low doses of short-term gamma irradiation on growth and development through two generations of *Pisum sativum*. *Science of the Total Environment*, 320 (2), 121-129.
- Zeid, I. and Shedeed, Z., 2006. Response of alfalfa to putrescine treatment under drought stress. *Biologia Plantarum*, 50 (4), 635-640.
- Zhang, B., 2000. Regulation of plant growth regulators on cotton somatic embryogenesis and plant regeneration, *Biochemistry* 39:1567.
- Zhou, X., 1997. Plant growth regulators. *Plant Physiol, Commun*, 33 (6), 480-481.
- Zimmerman, J.L., 1993. Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. *The Plant Cell*, 5 (10), 1411.

ÖZGEÇMİŞ

Arash HOSSEIN POUR, 1985 yılında İran'ın Maku şehrinde doğdu. 2003 yılında Maku İmam Khomeyni Lisesi'ni bitirdi. 2004 yılında kazandığı Khoy Azad Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü'nden 2008 yılında mezun oldu. Aynı yılda kazandığı aynı Üniversitenin Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümün'de 2010 yılında yüksek lisansını bitirdi. 2011 yılında Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarla Bitkileri Anabilim dalında doktora programına başladı. Uluslararası ve ulusal hakemli dergilerde makaleler ve ulusal kongre ve sempozyumlarda bildiriler yayınladı.