

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TARLA BİTKİLERİ ANABİLİM DALI**

**ÇAYIR ÜÇGÜLÜNDE (*Trifolium pratense* L.) İN VİTRO
MUTASYON UYGULAMALARININ M1
GENERASYONUNDA TUZ TOLERANSINA ETKİLERİ**

**Hazırlayan
Onur OKUMUŞ**

**Danışman
Prof. Dr. Satı UZUN**

Yüksek Lisans Tezi

**Ocak 2022
KAYSERİ**

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TARLA BİTKİLERİ ANABİLİM DALI**

**ÇAYIR ÜÇGÜLÜNDE (*Trifolium pratense* L.) İN VİTRO
MUTASYON UYGULAMALARININ M1
GENERASYONUNDA TUZ TOLERANSINA ETKİLERİ
(Yüksek Lisans Tezi)**

**Hazırlayan
Onur OKUMUŞ**

**Danışman
Prof. Dr. Satı UZUN**

**Bu çalışma, Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
FLY-2020-10559 kodlu proje ile desteklenmiştir.**

**Ocak 2022
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Onur Okumuş

YÖNERGEYE UYGUNLUK

“Çayır Üçgülünde (*Trifolium pratense* L.) İn Vitro Mutasyon Uygulamalarının M1 Generasyonunda Tuz Toleransına Etkileri” adlı Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Hazırlayan

Onur OKUMUŞ

Danışman

Prof. Dr. Satı UZUN

Tarla Bitkileri ABD Başkanı

Prof. Dr. Satı UZUN

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın her aşamasında beni bilgi ve tecrübesiyle yönlendiren ve yardımlarını esirgemeyerek gerek akademik ortamda gerekse beşeri ilişkilerde engin fikirleriyle yetiştirme ve gelişmeye katkıda bulunan sayın danışman hocam Prof. Dr. Satı UZUN'a, beni akademik hayata yönlendiren ve her daim destek olan sayın hocalarım Prof. Dr. Mehmet BİLGİN ve Prof. Dr. Mehmet KARACA'ya (Akdeniz Üniversitesi), lisans hayatım boyunca bilgi ve birikimlerini bizlerle paylaşan başta sayın hocalarım Dr. Öğr. Üyesi Güray AKDOĞAN, Dr. Berk BENLİOĞLU ve Dr. Uğur ÖZKAN olmak üzere tüm Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Öğretim üyelerine, çalışmalarım boyunca desteklerini esirgemeyen Arş. Gör. Ahmet SAY ve Arş. Gör. Özlem AKBAŞ'a (Ege Üniversitesi), tüm laboratuvar imkanlarını benimle paylaşan sayın hocam Dr. Öğr. Üyesi Oğuzhan UZUN'a ve yüksek lisans öğrencileri Emircan AKPARLAR, Oğuz EROL ve Abdulselam ÖTLÜ'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Değerli katkıları için jüri üyelerim sayın Prof. Dr. Semiha ERİŞEN (Yıldız Teknik Üniversitesi) ve sayın Dr. Öğr. Üyesi Hamdi ÖZAKTAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Ve son olarak bana hep güvenen, her kararında arkamda duran, maddi ve manevi desteklerini biran olsun esirgemeyen babam Bilal OKUMUŞ, annem Esengül OKUMUŞ, abim Fatih OKUMUŞ ve dedem Osman UÇAR'a teşekkürlerimi borç bilirim.

Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Birimine (FLY-2020-10559) destekleri için teşekkür ederim.

Onur OKUMUŞ

Ocak 2022 Kayseri

ÇAYIR ÜÇGÜLÜNDE (*Trifolium pratense* L.) İN VİTRO MUTASYON UYGULAMALARININ M1 GENERASYONUNDA TUZ TOLERANSINA ETKİLERİ

Onur OKUMUŞ

**Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü
Yüksek Lisans Tezi, Ocak 2022
Danışman: Prof. Dr. Satı UZUN**

ÖZET

Bu çalışma kapsamında çayır üçgülünde (*Trifolium pratense* L.) in vitro koşullarda etil metan sülfonat (EMS) uygulamalarının tuz toleransı üzerine etkileri incelenmiştir. Bu amaçla öncelikle Dadaş ve Tavlaş çayır üçgülü çeşitlerinin rejenerasyon potansiyelleri belirlenmiştir. İki çeşide ait kotiledon boğumlar thidiazuron (TDZ), 6-benzilaminopurin (BAP) ve α -naftelenasetik asit (NAA)'nın farklı kombinasyon ve konsantrasyonlarını içeren MS besin ortamında kültüre alınmıştır. Sürgün oluşturan eksplant yüzdesi, eksplant başına sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu birlikte değerlendirildiğinde en yüksek değerler 0.25 veya 0.5 mg/L TDZ içeren MS besin ortamlarından elde edilmiştir. Elde edilen sürgünlerde en yüksek kök oluşumu ve kök uzunluğu ise 0.5 mg/L indol-3-bütrik asit (IBA) veya indol-3-asetik asit (IAA) içeren MS besin ortamlarında saptanmıştır. EMS'nin çimlenme ve fide büyümesi üzerine etkisini belirlemek amacıyla tohumlar 6 saat ön ıslatma sonrasında %0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1 ve 1.2 EMS dozlarında 6 saat bekletildikten sonra MS besin ortamına ekilmiştir. EMS uygulamasının çimlenme yüzdesi, sürgün ve kök uzunluğu ile fide yaş ve kuru ağırlığına etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Artan EMS dozlarına bağlı olarak çimlenme yüzdesi ve fide büyüme karakterlerinde önemli düşüşler belirlenmiştir. Farklı EMS dozlarının çayır üçgülü çeşitlerinde tuz toleransına etkilerini belirlemek amacıyla 6 saat ön ıslatmadan sonra tohumlar 6 saat süreyle %0, 0.4, 0.6 ve 0.8 EMS içerisinde bekletilerek MS besin ortamında çimlenmeye bırakılmıştır. Gelişen fidelerde kotiledon boğumlar izole edilerek kontrol, 6, 8 ve 10 g/L NaCl içeren MS besin ortamında kültüre alınmıştır. Deneme sonucunda artan tuz dozlarına bağlı olarak sürgün oluşturan eksplant yüzdesi, eksplant başına sürgün sayısı, sürgün uzunluğu, yaş ve kuru ağırlık, klorofil a, b ve toplam klorofil değerleri düşüş göstermiştir. Kontrole göre yüksek EMS dozlarında (%0.6 ve 0.8) sürgün oluşturan eksplant yüzdesinde, eksplant başına sürgün sayısında, klorofil a, b ve toplam klorofil miktarlarında azalış, iyon sızıntısında bir artış belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: EMS, *in vitro* rejenerasyon, mutasyon, *Trifolium pratense*, tuz stresi

THE EFFECTS OF IN VITRO MUTATION ON SALINITY TOLERANCE OF RED CLOVER (*Trifolium pratense* L.) IN M1 GENERATION

Onur OKUMUŞ

Erciyes University, Graduate School of Natural and Applied Sciences

Master Thesis, January 2022

Supervisor: Prof. Dr. Satı UZUN

ABSTRACT

Present thesis was conducted to investigate the effects of ethyl methane sulphonate (EMS) treatments on salt tolerance of red clover (*Trifolium pratense* L.) under *in vitro* conditions. Initially, the regeneration potentials of Dadaş and Tavlaş red clover cultivars were determined. The cotyledon nodes of two cultivars were cultured in MS medium containing different combinations and concentrations of thidiazuron (TDZ), 6-benzylaminopurine (BAP) and α -naphthalene acetic acid (NAA). In terms of regeneration frequency, number of shoots per explant and shoot lengths, the highest values were obtained from MS medium containing 0.25 or 0.5 mg/L TDZ. The highest root formation and root length of the resultant shoots were obtained from the MS medium containing 0.5 mg/L indole-3-butyric acid (IBA) or indole-3-acetic acid (IAA). To determine the effect of EMS on germination and seedling growth, seeds were planted in MS medium after 6 hours of pre-soaking and kept at 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1 and 1.2 % EMS doses for 6 hours. The effects of EMS doses on germination percentage, shoot and root length and seedling fresh and dry weights were found to be significant. Significant decreases were observed in germination percentage and seedling growth parameters with increasing EMS doses. To determine the effects of different EMS doses on salt tolerance of red clover cultivars, after 6 hours of pre-soaking, the seeds were kept in 0, 0.4, 0.6 and 0.8% EMS for 6 hours and germinated in MS medium. The cotyledon nodes of the developing seedlings were isolated and cultured in MS medium containing 0 (control), 6, 8 and 10 g/L NaCl. At the end of the experiments, significant decreases were seen in regeneration frequency, number of shoots per explant, shoot length, fresh and dry weight, chlorophyll a, b and total chlorophyll values with increasing salt doses. As compared to the control, at high EMS doses (0.6% and 0.8%), a decrease was seen in regeneration frequency, number of shoots per explant, chlorophyll a, b and total chlorophyll content and an increase was seen in ion leakage.

Keywords: EMS, *in vitro* regeneration, mutation, *Trifolium pratense*, salinity tolerance

İÇİNDEKİLER

ÇAYIR ÜÇGÜLÜNDE (*Trifolium pratense* L.) İN VİTRO MUTASYON UYGULAMALARININ M1 GENERASYONUNDA TUZ TOLERANSINA ETKİLERİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK	ii
YÖNERGEYE UYGUNLUK.....	iii
ONAY	iv
TEŞEKKÜR.....	v
ÖZET.....	vi
ABSTRACT.....	vii
İÇİNDEKİLER	viii
KISALTMALAR ve SİMGELER	x
TABLolar LİSTESİ.....	xi
ŞEKİLLER LİSTESİ	xiv
GİRİŞ	1

1. BÖLÜM

GENEL BİLGİLER ve LİTERATÜR ÇALIŞMASI

2. BÖLÜM

MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Araştırma Yeri	12
2.2. Materyal.....	12
2.2.1. Bitki Materyali	12
2.3. Yöntem	12
2.3.1. İn Vitro Rejenerasyon ve Köklendirme	12
2.3.2. Tohuma EMS Uygulamaları	15
2.3.3. Tohuma EMS Uygulaması ve NaCl İçeren Ortamda Rejenerasyon.....	15
2.3.4. Çalışmada Kullanılan Besi Ortamları ve Bitki Büyüme Düzenleyicileri....	16
2.3.5. Verilerin Değerlendirilmesi.....	18

3. BÖLÜM

BULGULAR

3.1. Çayır Üçgülünde İn Vitro Sürgün Rejenerasyonu	19
3.2. Sürgünlerin İn Vitro Köklendirilmesi.....	23
3.3. Tohuma EMS Uygulamaları	25
3.3.1. Çimlenme Yüzdesi.....	25
3.3.2. Sürgün ve Kök Uzunlukları	26
3.3.3 Fide Yaş ve Kuru Ağırlıkları	27
3.4. Tohuma EMS Uygulaması ve NaCl İçeren Ortamda Rejenerasyon.....	28
3.4.1. Sürgün Oluşturan Eksplant Yüzdesi.....	29
3.4.2 Eksplant Başına Sürgün Sayısı ve Ortalama Sürgün Uzunluğu	30
3.4.3 Yaş ve Kuru Ağırlık.....	34
3.4.4. Klorofil a ve Klorofil b.....	39
3.4.5. Toplam Klorofil.....	41
3.4.6. İyon Sızıntısı	42

4. BÖLÜM

TARTIŞMA-SONUÇ ve ÖNERİLER

KAYNAKLAR	48
ÖZGEÇMİŞ.....	54

KISALTMALAR VE SİMGELER

µg	: mikrogram
BAP	: 6- benzilaminopurin
cm	: santimetre
EMS	: Etil metan sülfonat
F	: F değeri
g	: gram
IAA	: İndol asetik asit
IBA	: İndol-3-butrik asit
K.T.	: Kareler Toplamı
L	: litre
mg	: miligram
mm	: milimetre
MS	: Murashige ve Skoog basal besin ortamı
NAA	: Naftalin asitik asit
NaCl	: Sodyum klorür
S.D.	: Serbestlik derecesi
TDZ	: Thidiazuron

TABLolar LİSTESİ

Tablo 2.1.	Farklı TDZ, BAP ve NAA konsantrasyonları ve kombinasyonları.....	14
Tablo 2.2.	MS besin ortamının içeriği	17
Tablo 2.3.	Çalışmada kullanılan bitki büyüme düzenleyicilerin sterilizasyon yöntemi ve kullanılan çözücü	17
Tablo 3.1.	Dadaş ve Tavlaş çayır üçgülü çeşitlerinde farklı sitokinin ve oksin konsantrasyon ve kombinasyonlarının sürgün oluşturan eksplant yüzdesi, eksplant başına sürgün sayısı ve ortalama sürgün uzunluğuna etkisine ait varyans analizi.....	20
Tablo 3.2.	Dadaş ve Tavlaş çayır üçgülü çeşitlerinin farklı sitokinin ve oksin konsantrasyon ve kombinasyonlarında sürgün oluşturan eksplant yüzdeleri.....	21
Tablo 3.3.	Dadaş ve Tavlaş çayır üçgülü çeşitlerinin farklı sitokinin ve oksin konsantrasyon ve kombinasyonlarında eksplant başına sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu değerleri.....	22
Tablo 3.4.	Çayır üçgülü çeşitlerinde farklı oksin dozlarının kök oluşturan sürgün yüzdesi ve kök uzunluğuna etkisine ait varyans analizi	23
Tablo 3.5.	Çayır üçgülü çeşitlerinin farklı oksin dozlarında kök oluşturan sürgün yüzdeleri ve kök uzunlukları.....	25
Tablo 3.6.	Çayır üçgülü çeşitlerinde farklı EMS konsantrasyonlarının çimlenme yüzdesine etkisine ait varyans analizi	26
Tablo 3.7.	Çayır üçgülü çeşitlerinin farklı EMS konsantrasyonlarında çimlenme yüzdeleri (%).....	26
Tablo 3.8.	Çayır üçgülü çeşitlerinde farklı EMS konsantrasyonlarının sürgün ve kök uzunluklarına etkisine ait varyans analiz sonuçları	27
Tablo 3.9.	Çayır üçgülü çeşitlerinin farklı EMS konsantrasyonlarında sürgün ve kök uzunluk değerleri (cm).....	27
Tablo 3.10.	Çayır üçgülü çeşitlerinde farklı EMS konsantrasyonlarının fide yaş ve kuru ağırlıklarına etkisine ait varyans analiz sonuçları	28
Tablo 3.11.	Çayır üçgülü çeşitlerinin farklı EMS konsantrasyonlarında fide yaş ve kuru kuru ağırlık değerleri (mg)	28
Tablo 3.12.	Çayır üçgülü çeşitlerinde farklı EMS ve tuz dozlarının sürgün oluşturan eksplant yüzdesine etkisine ait varyans analizi.....	29

Tablo 3.13. Çayır üçgülü çeşitlerinin farklı EMS ve tuz dozlarında sürgün oluşturan eksplant yüzdeleri (%)	30
Tablo 3.14. Çayır üçgülü çeşitlerinin farklı tuz dozlarında sürgün oluşturan eksplant yüzdeleri	30
Tablo 3.15. Çayır üçgülü çeşitlerinde farklı EMS ve tuz dozlarının eksplant başına sürgün sayısı ve ortalama sürgün uzunluğuna etkisine ait varyans analizi.....	31
Tablo 3.16. Çayır üçgülü çeşitlerinin farklı EMS ve tuz dozlarında eksplant başına sürgün sayıları.....	32
Tablo 3.17. Çayır üçgülü çeşitlerinin farklı tuz dozlarında eksplant başına sürgün sayıları.....	32
Tablo 3.18. Çayır üçgülü çeşitlerinin farklı EMS ve tuz dozlarında ortalama sürgün uzunlukları	33
Tablo 3.19. Çayır üçgülü çeşitlerinin farklı EMS dozlarında sürgün uzunlukları	33
Tablo 3.20. Çayır üçgülü çeşitlerinde farklı EMS ve tuz dozlarının sürgün oluşturan eksplant başına yaş ve kuru ağırlığa etkisine ait varyans analizi.....	34
Tablo 3.21. Çayır üçgülü çeşitlerinin farklı EMS ve tuz dozlarında sürgün oluşturan eksplant başına yaş ağırlıkları.....	35
Tablo 3.22. Çayır üçgülü çeşitlerinin farklı EMS dozlarında sürgün oluşturan eksplant başına yaş ağırlıkları.....	35
Tablo 3.23. Çayır üçgülü çeşitlerinin farklı EMS ve tuz dozlarında sürgün oluşturan eksplant başına kuru ağırlıkları.....	36
Tablo 3.24. Çayır üçgülü çeşitlerinin farklı EMS dozlarında sürgün oluşturan eksplant başına kuru ağırlıkları.....	37
Tablo 3.25. Çayır üçgülü çeşitlerinde farklı EMS ve tuz dozlarının klorofil a ve klorofil b üzerine etkisine ait varyans analizi	39
Tablo 3.26. Çayır üçgülü çeşitlerinin farklı EMS ve tuz dozlarında klorofil a ve b miktarları.....	40
Tablo 3.27. Çayır üçgülü çeşitlerinde farklı EMS ve tuz dozlarının toplam klorofil miktarı üzerine etkisine ait varyans analizi.....	41
Tablo 3.28. Çayır üçgülü çeşitlerinin farklı EMS ve tuz dozlarında toplam klorofil miktarları.....	42

Tablo 3.29. Çayır üçgülü çeşitlerinde farklı EMS ve tuz dozlarının iyon sızıntısı miktarı üzerine etkisine ait varyans analizi.....	43
Tablo 3.30. Çayır üçgülü çeşitlerinin farklı EMS ve tuz dozlarında iyon sızıntısı miktarları.....	43



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1.	Ortamların hazırlanması	13
Şekil 2.2.	Eksplantların ortamlara aktarılması	13
Şekil 2.3.	Kotiledon boğum eksplantı	14
Şekil 2.4.	Klorofil analizi için hazırlanan örnekler ve spektrofotometrede okuma işlemi.....	16
Şekil 3.1.	Sürgünlerin in vitro köklendirilmesi.....	24
Şekil 3.2.	Köklenen sürgünlerin torf içeren ortamda gelişimleri	24
Şekil 3.3.	Dadaş çeşidinde farklı EMS ve Tuz dozlarında gelişen eksplantlar.....	37
Şekil 3.4.	Tavlaş çeşidine farklı EMS ve Tuz dozlarında gelişen eksplantlar	38

GİRİŞ

Çayır üçgülü (*Trifolium pratense* L.) dünyada yoncadan sonra en fazla yetiştirilen serin mevsim baklagil yem bitkisidir (Chao vd., 2018). Avrupa, Batı Asya ve Kuzeybatı Afrika'nın doğal bitkisidir (Egan vd., 2019). ABD, Orta ve Batı Asya, Yeni Zelanda ve Özellikle Avrupa'da geniş alanlarda tarımı yapılmaktadır (Geren vd., 2009; 353). Anadolu da çayır üçgülü formları bakımından zengindir (Tan ve Serin, 2013;101). Kısa ömürlü çok yıllık 60-80 cm'ye kadar boylanabilen dik gelişme gösteren otsu bir yem bitkisidir. Yaprakları üç yapraktan oluşmaktadır, çiçek topluluk şekli kömeç şeklinde olup, kömeçler dalların uç kısmında bulunur, taç yaprakların rengi pembe-kırmızıdır, meyveleri çok küçük yapıya sahiptir ve içerisinde genellikle bir tohum bulunur (Tan ve Serin, 2013;102).

Dik gelişen, bol yapraklı, yumuşak gövdeli bir tür olan çayır üçgülü kuru ot üretimi için çok iyi bir bitkidir. Ayrıca yaşlı taban meraların yenilenmesi ve yeni taban mera tesislerinde de kullanılmaktadır (Tan ve Serin, 2013;102-112). Yüksek verimli, yüksek protein içeriği ve besin değeri ile kaliteli bir yem bitkisi olması yanında bir baklagil bitkisi olarak *Rhizobium* bakterileri ile ortak yaşam kurarak azot fiksasyonu da yapabilmektedir (Vega vd., 2015). Toprak verimliliğinin korunmasında önemli bir yeri vardır (Açıkgöz, 2001;68)

Bitkilerde stres; büyüme ve gelişmeyi olumsuz etkileyen dış etkenler olarak tanımlanmakta olup, biyotik ve abiyotik stres faktörleri olmak üzere iki ana başlık altında toplanmaktadır (Larcher, 1995). Abiyotik stresler içerisinde yer alan tuzluluk tarımsal verimlilik ve sürdürülebilirlik üzerindeki olumsuz etkileri nedeniyle küresel bir sorundur. Dünya üzerinde yaklaşık 800 milyon hektar tuzdan etkilenen alan bulunmaktadır (397 milyon ha tuzluluk; 434 milyon ha sodiklik; Munns, 2005). Toprak tuzluluğu dünyanın kurak ve yarı kurak bölgelerinde %50'den fazla verim kayıplarına neden olmaktadır (Naeem vd., 2020). Bu alanlardaki bitki büyümesi üzerindeki olumsuz

etki tuzun neden olduğu ozmotik etki, iyon toksisitesi, oksidatif stres ve besin elementi eksikliğinden kaynaklanmaktadır (Naeem vd., 2020). Bu etkiler metabolik süreçlerde değışikliğe, hücre büyümesinin azalmasına ve membran hasarının hızlanmasına neden olmaktadır (Naeem vd., 2020). Sonuç olarak tuz stresi tarımsal üretimde bitki gelişimini engelleyerek önemli verim kayıplarına neden olmaktadır. Tuzlu topraklarda kaliteli ve verimli üretim için tuza toleranslı bitkilerin geliştirilmesi büyük önem taşımaktadır.

Kalıtsal yapıda meydana gelen ani ve kalıcı değışmeler mutasyon olarak bilinmektedir. Bitki ıslahında yeni varyasyonlar oluşturmak amacıyla etil metan sülfonat (EMS), metil metan sülfonat, etilemin, nitroetil üretil, ethidium bromit gibi kimyasal mutajenler ile x-ışınları, α -ışınları, β -ışınları, γ -ışınları, UV ışınları ve nötron ışınları gibi fiziksel mutajenler çok uzun yıllardan beri kullanılmaktadır (Baydar, 2021; 241). Her mutajenin farklı bir mutasyon oluşturma mekanizması bulunmaktadır. Kimyasal mutajenler, uygulaması basit ve standart laboratuvar koşullarında uygulanabilme özelliğı nedeniyle bazı araştırmacılar tarafından tercih edilmektedir (Spencer-Lopez vd. 2018). EMS, potansiyel mutajenik etkisi ve kullanım kolaylığı nedeniyle bitkilerde en yaygın kimyasal mutajenlerden birisidir (Spencer-Lopez vd. 2018). FAO/IAEA Mutant Varyete Veri Tabanı'nda kimyasal mutajenler içerisinde EMS, 108 adet çeşit ile ilk sırada yer almaktadır (<https://mvd.iaea.org>; Aralık 2021). EMS esas olarak G/C'den A/T'ye transversiyonlar şeklinde rastgele nokta mutasyonlarına neden olmakta ve mutasyonlar hem kodlanmayan hem de kodlanan bölgelerde meydana gelebilmektedir (Lethin vd., 2020). Bu mutasyonlar, gen ekspresyonunun yukarı veya aşağı regülasyonu, mRNA stabilitesinin değıştirilmesi veya amino asit değışiklikleri, sonlandırma kodonları veya nadiren çerçeve kayması mutasyonları meydana getirerek protein yapısında değışikliklere yol açabilmektedir (Lu vd., 2018; Lethin vd., 2020).

Mutasyon ıslahında en önemli problem çok geniş bir varyasyon havuzundan istenen varyantların seçiminin çok fazla iş gücü ve zaman istemesidir. Ancak son yıllarda doku kültürü teknikleri bu problemleri gidermek amacıyla kullanılmaktadır. İn vitro kültürler hem kısa sürede kontrollü koşullar altında seleksiyona hem de seçilen mutantların hızlı şekilde çoğaltılmasına olanak sağlamaktadır (Nikam vd., 2014; Kumar and Kumari, 2021). Birçok bitki türünde doku kültürü yöntemleri ve mutajenler kullanılarak tuza toleranslı hücre hatları ve bitkiler geliştirilmektedir (Luan vd., 2007; Nikam vd., 2014; Bolivar-Gonzales vd., 2018; Abdelnour-Esquivel vd., 2020). Mutasyon ıslahı

alışmaları in vitro teknikler ile entegre edilerek oldukça yüksek frekanslarda farklı mutantlar elde edilebilmektedir (Baydar, 2021; 246). Mutasyon başarısı, seçilen mutasyonun türüne ve çeşidine bitkinin uygulanan kısmına, uygulama dozuna ve süresine göre değişmektedir (Baydar, 2021; 241). Çayır lnde farklı genotiplerin tuz stresine tepkilerini belirlemek amacıyla (Onal-Asci 2011; Vahdati vd., 2012; Tolan vd., 2017; Sharavdorj vd., 2021) bazı çalışmalar olmasına rağmen, EMS uygulamaları ile EMS uygulamalarının tuz toleransına etkileri ile ilgili çalışmalara kaynak araştırmasında rastlanmamıştır. Bu nedenle bu çalışma kapsamında ayır lnde (Dadaş ve Tavlaş) farklı dozlarda EMS uygulamalarının tuz toleransına etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla ayır l çeşitlerinde öncelikle in vitro bitki rejenerasyonu için uygun protokolün oluşturulması, daha sonra çeşitlere ait tohumlara uygulanan uygun EMS dozları ile çeşitlerin EMS'ye tepkilerinin belirlenmesi ve son olarak belirlenen EMS ve NaCl dozlarında çeşitlerin tepkilerinin incelenmesi hedeflenmiştir.

1. BÖLÜM

GENEL BİLGİLER ve LİTERATÜR ÇALIŞMASI

Çayır üçgülü (*Trifolium pratense* L.) dünyada yoncadan sonra en fazla yetiştirilen serin mevsim baklagil yem bitkisidir (Chao vd., 2018). Abiyotik stres faktörlerinden biri olan toprak tuzluluğu bitkisel üretimde önemli verim kayıplarına neden olmaktadır (Naeem vd., 2020). Diğer yem bitkilerinde olduğu gibi çayır üçgülünde de tuzluluk bitki büyümesini sınırlandırmakta ve verimi düşürmektedir (Sharavdorj vd., 2021). Tuzlu topraklarda kaliteli ve verimli üretim için tuza toleranslı bitkilerin geliştirilmesi büyük önem taşımaktadır (Nikam vd., 2014). Mutasyon ıslahı çalışmaları in vitro teknikler ile entegre edilerek oldukça yüksek frekanslarda farklı mutantlar elde edilebilmekte ve bu mutantlar farklı stres faktörlerine karşı değerlendirilebilmektedir (Nikam vd., 2014; Baydar, 2021; 241s;). Bu bölümde in vitro bitki rejenerasyonu, tuzluluk ve mutasyon uygulamaları ile ilgili farklı yıllarda çeşitli araştırmacılar tarafından yürütülen çalışmalar özetlenmiştir.

Akbay ve Ünver (1986), Tokat 157/37 iki sıralı arpa çeşidinde tohumlar % 0.01, 0.02, 0.03 ve 0.04 dozlarında 30 °C’de 8 saat süreyle EMS ile muamele edilmiş ve 12 saat süreyle yıkanmıştır. Uygulama sonucunda M₁ bitkilerinde EMS dozlarındaki artışın, M₁ bitkilerinde çıkış oranı, ilk yaprak uzunluğu, fide boyu ve kök uzunluğu bakımından önemli farklılıklar oluşturduğunu saptamışlardır.

Wang ve Holl (1988), *T. pratense*’nin Altaswede (2n=2x=14) ve Norseman (2n=4x=28) çeşitlerinde in vitro rejenerasyon ve somaklonal varyasyon oranını incelemişlerdir. Rejenerasyon sonucu elde edilen bitkilerde önemli miktarda somaklonal varyasyon gözlemlenmiştir.

Vogel ve Natarajan (1995), EMS'nin DNA'yı alkilleyerek guaninin sitozin yerine timin ile baz çifti oluşturmaya sebep olduğunu ve sonuç olarak G:C baz çifti A:T'ye dönüşerek mutasyonu meydana getirdiğini ifade etmişlerdir.

Çöçü vd. (2003), 8 ayrı fiğ çeşitlerinde adventif sürgün rejenerasyonu elde etmek için yürüttükleri çalışmada, kotiledon eksplantlarını farklı oranlarda büyüme düzenleyicileri içeren (BAP, NAA) MS ortamlarında kültüre almışlardır. Sonuç olarak en yüksek sürgün rejenerasyonunu 4 mg/L BAP ve 0.25 mg/L NAA içeren ortamdan Kubilay çeşidinden elde etmişlerdir. En fazla eksplant başına düşen sürgün sayısını ise Sarıelçi çeşidinden 2 mg/L BAP ve 0.25 mg/L NAA içeren ortamda saptamışlardır. Kök oluşturan sürgün oranlarına bakıldığında en yüksek kök oluşturan sürgün oranı 2.5 mg/L IBA dozunda belirlemişlerdir.

Carrillo vd. (2004), çayır üçgülünde direkt organogenez protokolü oluşturmak amacıyla yapmış oldukları çalışmada, eksplant kaynağı (vejetatif bitkinin uç veya yan meristemleri), kültür ortamı ve bitki büyüme düzenleyicilerinin etkisi incelemişlerdir. Sonuç olarak yan meristemlerin uç meristemlere göre düşük seviyede kontaminasyon ve daha iyi bir gelişim gösterdiklerini saptamışlardır. L2 ortamı, çalışılan çeşitler için B5 ve MS ortamına göre daha iyi sonuçlar gözlemlemişler ve L2 ortamı 0.003 mg/L 4-amino-3,5,6-trichloropicolinic asit ve 1.0 mg/L 6-benzilamino pürin ilave edildiğinde daha iyi sonuç almışlardır. Geliştirilen prosedür ıslah programında üçgül hatlarını çoğaltmak ve virüsten arı bitki elde etmek amacıyla kullanılabileceğini belirlemişlerdir.

Kendirli vd. (2005), Türkiye'deki çorak alanların yaklaşık %74'ünün tuzlu topraklardan oluştuğunu ifade etmektedir.

Yıldız vd. (2006), keten bitkisinde yapmış oldukları çalışmada yaygın olarak kullanılan TDZ, BAP ve NAA'nın farklı konsantrasyonlarının hipokotil eksplantlarında rejenerasyon kabiliyetlerinin etkisine bakmışlardır. Sonuç olarak en yüksek değerler 1 mg/L BAP ortamında gözlemlemişlerdir ve artan TDZ dozlarının bitki rejenerasyon kabiliyetlerinde önemli azalmalara sebep olduğunu ve 1 mg/L TDZ'nin in vitro keten kültüründe tek başına kullanılması gerektiğini belirlemişlerdir.

Luan vd. (2007), tatlı patatesten EMS mutasyonu ile in vitro ortamda tuza dayanıklı mutantlar geliştirmişlerdir. Öncelikle yaprak eksplantlarından geliştirdikleri kallusları

%0.5 EMS ile 0, 1, 1.5, 2, 2.5 ve 2 saat süreyle muamele etmişlerdir. Daha sonra kalluslar 200 mM NaCl içeren ortamda 5 defa alt kültüre alınmış ve seçilen kalluslar rejenerasyon için somatik embriyo oluşturma ortamına aktarılmıştır. İki ve 2.5 saat %0.5 EMS uygulamalarından 3 adet mutant bitki elde etmişler ve bu mutantların tuz toleransını incelemişlerdir. Deneme sonucunda mutantların kontrol bitkilerinden tuza daha dayanıklı olduğunu belirlemişlerdir.

Bahar ve Akkaya (2009), Gerek 79 buğday çeşidinde mutajen kaynağı olarak EMS'nin farklı doz uygulamalarında; bitkilerin köklenme kabiliyetlerini, büyümelerini ve çimlenme yeteneklerini değerlendirmiş ve en uygun EMS dozunu saptamışlardır. Bu amaçla tohumlar % 0.1, %0.2 ve %0.3'lük dozlarda EMS'ye tabi tutmuşlardır. Denemede çimlenme, koleoptil çıkışı, ilk yaprak çıkışı, kök uzunluğu, koleoptil uzunluğu, gövde uzunluğu, fide büyüme oranı, ilk yaprak uzunluğu, kök ve sürgün yaş ağırlığı ile kuru ağırlığı ve kök-sürgün oranı parametrelerini incelemişlerdir. Artan EMS dozlarıyla beraber tüm incelenen parametreler arasında en çok kök sürgün oranında azalma olduğunu belirlemişlerdir. Bunun yanı sıra tohum çimlenmesi için en uygun EMS dozunu % 0.3 olarak belirlemişlerdir.

Çölgeçen ve Toker (2008), çayır üçgülünde yapmış oldukları çalışmada farklı oranlarda BAP ve NAA bitki büyüme düzenleyicileri içeren MS ve PC-L2 ortamları kullanılarak in vitro organogenez çalışılmış olup, bu ortamlara ekplant olarak hipokotil, kotiledon, apikal meristemler, epikotil ve genç yapraklardan elde ettikleri dokuları aktarmışlar. Yapılan çalışma sonucunda en iyi sürgün rejenerasyonu apikal meristem eksplantlarının kullanıldığı 2 mg dm⁻³ BAP ve 1mg dm⁻³ NAA içeren PC-L2 ortamlarından elde edilmiştir. Kalluslardan elde ettikleri bu sürgünlerin %94.4'ü 1 mg dm⁻³ NAA içeren PC-L2 ortamında başarılı bir şekilde köklendirilip tarlaya aktarıldığını rapor etmişlerdir.

Kumar vd. (2010), in vitro mutagenез ile ticari bir narenciye anacı olan Rough Lemon'da (*Citrus jambhiri* Lush.) tuz toleransını sağlamak amacıyla 45 ve 60 günlük kalluslara direk ya da önce sıvı ortamda çalkalanarak % 0.1, 0.2, 0.3 ve 0.4 dozlarında EMS ve MMS uygulanmıştır. EMS ve MMS uygulamalarında 45 günlük kalluslar için %0.1 uygun doz olurken 60 günlük kallus uygulamalarında rejenerasyon elde

edilememiştir. Elde edilen mutantların ve somaklonların in vitro seçimi için optimum tuz konsantrasyonu ≥ 25 mM NaCl olarak bildirilmişlerdir.

Vahdati vd. (2012), *Trifolium repens* ve *Trifolium pratense*'de (1 çeşit ve yerli genotip) 4 farklı tuzluluk seviyesinin (0, 75, 150, 225 mM NaCl) etkilerini incelediği çalışmada; yaprak alanı, yaprak nispi su içeriği, elektrolit sızıntısı, kök ve sürgün uzunluğu ile kök ve sürgün taze ve kuru ağırlıklarını incelemişlerdir. Çeşitlerde ölçülen özellikler için en yüksek değerler, ticari *T. pratense* çeşidinde elde edilmiş, ardından elektrolit sızıntısı ve taze kök ağırlığı dışında sırasıyla *T. pratense* yerli genotipi ve *T. repens* gelmiştir. Ancak bu türler üzerindeki tuzluluk etkisi, doğrusal olarak artmış ve yaprak alanı en çok etkilenen özelliklerden olmuştur. Genellikle *Trifolium* türleri, özellikle yüksek seviyelerde tuzluluk stresine duyarlılık göstermiştir.

Balık ve Akat (2012), bitkilerde mutajen kaynağı olarak en yaygın kullanılan kimyasal mutajen EMS olduğunu, DNA'da bulunan bazlara alkil gruplarını ekleyerek DNA'nın şekillerini ve baz eşleşme özelliklerini değiştiren EMS'nin çoğunlukla nokta mutasyonlarına ve bir kromozom parçasının kaybına neden olabileceğini belirtmişlerdir.

Koyuncu (2012), yapmış olduğu çalışmada Türkiye' de yetiştirilen 13 makarnalık buğday (*Triticum durum* Desf.) çeşidinin in vitro şartlarda tuza toleranslarını değerlendirmek amacıyla embriyolara kallus oluşumu ile birlikte farklı dozlarda NaCl uygulamıştır. Çeşitleri kallus oluşumu, kallus ağırlığı ve rejenere kallus sayısı parametrelerine göre değerlendirmiş ve artan tuz konsantrasyonlarında bütün parametrelerdeki değerlerin azaldığını ve çeşitler arasında istatistik olarak önemli farklılıkların bulunduğunu belirtmiştir. Çeşitlerin kallus oluşturma oranlarının artan tuz dozları ile paralel olarak azaldığını, azalan kallus oluşumu ile kallus ağırlığının da doğrusal olarak düştüğünü ve yüksek NaCl dozlarında kallusların rejenerasyon kabiliyetlerini yitirdiğini saptamıştır.

Adlinge vd. (2014), *Vigna mungo* 'da in vitro ortamda rejenerasyon kabiliyetine bakmak amacıyla yapmış oldukları çalışmada, izole edilen kotiledonlardan 2 mg/L BAP ortamında kallus geliştirmişler ve 4-6 hafta sonra kotiledonların BAP, IAA, NAA, Kinetin ve adenin sülfat içeren ortamlarda rejenerasyon kabiliyetlerini incelemişlerdir. Sonuç olarak 8 hafta süreyle bekletilen kotiledon eksplantlarında en iyi rejenerasyon ortamı 4 mg/L kinetin içeren ortamda belirlenmiştir.

Zhao vd. (2013), yerfistığında in vitro ortamda tuza dayanıklı mutant bitkiler elde etmek amacıyla olgun yerfistığı tohumlarından elde ettiği embriyonik eksplantları 4 hafta süreyle 4 mg/L PYM (Pingyangmycin) içeren somatik embriyo indükleme ortamda beklettikten sonra canlı somatik embriyoları önce 15 mg/L daha sonra 20 mg/L NaCl içeren çimlendirme ortamlarına aktarmışlardır. Tuz seleksiyonu sonucunda 30 bitki dış koşullara aktarılmış ve 26 bitkiden tohum elde edilmiştir. M₃ generasyonunda 18 tuza dayanıklı seçilmiş bitki ile ana materyal olarak kullanılan Huayu 22'nin tohumları %0.7 NaCl solüsyonunda 7 gün süreyle çimlendirilmiştir. Tuz stresi altında 5 mutant genotipin çimlenme oranı ana materyal olan Huayu 22'den yüksek bulunmuştur. Sonuç olarak PYM tabanlı oluşturulan mutasyonun in vitro çalışmalarla kombinasyonu sonucunda tuza dayanıklı mutant yerfistığı genotiplerini geliştirme ve belirleme bakımından çok etkili olduğunu ifade etmişlerdir.

Piwowarczyk vd. (2016), mürdümük (*Lathyrus sativus* L.) bitkisinin tuzluluk stresinde fizyolojik ve moleküler mekanizmasını gözlemlemek için, dört farklı mürdümük genotipini in vitro doku kültürü şartlarında yetiştirmişlerdir. Agarlı besin ortamına sırasıyla 0, 50, 100 ve 200 mM NaCl ilave etmiş ve fide gelişim dönemlerini gözlemlemişlerdir. 0 ve 50mM tuz seviyesi, çimlenme ve fide gelişimini önemli ölçüde etkilemezken, 200mM tuz konsantrasyonu, çimlenme ve fide gelişimini önemli ölçüde azaltmıştır. Ayrıca kuru ağırlık ve fide boylarında tuz konsantrasyonu arttıkça önemli düşüşler gözlemlemişlerdir.

Tolan vd. (2017), çalışmalarında çayır üçgülü (*Trifolium pratense* L.) genotiplerinde çimlenme ve fide gelişimi üzerine farklı NaCl konsantrasyonlarının etkilerini belirlemek amacıyla kurdukları çalışmada çimlenme yüzdesi, ortalama çimlenme süresi, çıkış yüzdesi, ortalama çıkış süresi, sürgün ve kök uzunluğu, fide yaş ve kuru ağırlığı ile fidede kuru maddede sodyum, potasyum ve klor oranlarını incelemişlerdir. Çalışma sonuçlarına göre çayır üçgülü genotiplerinde artan tuz konsantrasyonlarında çimlenme yüzdesi, çıkış yüzdesi, sürgün uzunluğu, kök uzunluğu ve fide yaş ağırlığı değerlerinde düşüş gözlemlenirken ortalama çimlenme süresi, ortalama çıkış süresi ve kuru maddedeki Na ve Cl değerlerinde artış olduğu sonucuna ulaşmışlardır.

Bolivar-Gonzalez vd. (2018), kahve bitkisinde embriyonik hücre süspansiyonlarına sodyum azid ve EMS uygulamalarının tuz toleransına etkilerini incelemişlerdir. Bu

amaçla embriyonik süspansiyon kültürleri 0, 2.5, 5 ve 10 mM sodyum azid ve 0, 185.2, 370.5 ve 741 mM EMS ile muamele edilmiştir. Araştırma sonuçlarına göre sodyum azid ve EMS uygulamaları kontrole göre embriyonik süspansiyon kültürlerinde canlılığı önemli ölçüde düşürmüştür. LD 50 dozu sodyum azid için 5 mM 15 dakika ve EMS için 185.2 mM 120 dakika olarak saptanmıştır. Sodyum azid ve EMS ile muamele edilen embriyonik süspansiyon hücreleri 0, 50, 100, 150, 250 ve 300 mM NaCl içeren ortamda kültüre alınmış ve 50 mM NaCl seleksiyon dozu olarak tespit edilmiştir. Araştırmada bitki gelişimi ve aminoasit içeriğinin NaCl stresinden etkilendiği ve bazı mutantların kontrole göre daha uzun sürgün boyu ve daha yüksek aminoasit içeriğine sahip olduğu belirlenmiştir.

Khursheed vd. (2018), Baklada yapmış oldukları çalışmada iki farklı çeşit; Vikrant ve PRT-12 çeşitlerini kullanmışlardır. Genetik olarak saf olan bu çeşitlere %0.01, 0.02, 0.03 ve 0.04 dozlarında EMS ile 100, 200, 300 ve 400 Gy Gama ışınıyla muamele etmişlerdir. Çalışma sonucunda EMS'nin gama ışınına göre daha etkili mutasyon kaynağı olduğunu ancak yaralanmanın EMS dozlarında daha belirgin olduğunu saptamışlardır.

Masoabi vd. (2018), şeker kamışında etil metan sülfonat uygulamasının kuraklık stresi üzerine etkisini incelemiştir. Araştırma sonucunda 20 mM ve daha düşük konsantrasyonlarda EMS uygulamalarının in vitro bitki rejenerasyonunda genomik mutasyonları indüklemek için yararlı olacağı belirlenmiştir. NCo310 şeker kamışı çeşidinden elde edilen kalluslar 16 mM EMS ile mutasyona uğratıldıktan sonra ve % 20 (w/v) PEG 6000 içeren ortamda seleksiyona alınmış ve 18 bitki seçilmiştir. Araştırmada in vitro seçilmiş hatlar, kuraklık toleransını doğrulamak için ön sera saksı denemelerine tabi tutulmuş ve saksı denemeleri sonucunda NCo310 çeşidinden daha iyi yedi hat belirlenmiştir.

Altındal ve Altındal (2018), Palancı-I ayçiçeği çeşidinde yapmış oldukları çalışmada, %1, 1.5 ve 2 dozunda EMS uygulamışlar ve 4 farklı NaCl (0, 1.25, 2.5 ve 5.0 g/L) besi ortamında 4 hafta in vitro koşullarda kültüre almışlardır. Çalışma sonucunda bitki boyu, yaş ve kuru ağırlık, kök uzunluğu, yaprak eni ve boyu, klorofil ve prolin incelenen özelliklerde artan tuz dozları ve EMS dozlarının etkisini istatistik olarak önemli bulmuşlardır. Artan NaCl konsantrasyonlarında prolin içeriği hariç diğer incelenen

parametrelerde azalma tespit etmişlerdir. Uygulanan EMS dozlarında ise toplam klorofil içeriği hariç diğer tüm parametrelerde bir düşüş olduğunu ancak prolin miktarını değiştirmedğini saptamışlardır. Çalışma sonucunda EMS uygulamalarının artan tuz dozlarının olumsuz etkilerini azalttığı saptanmıştır.

Singh ve Sadhukhan (2019), üç farklı mürdümük genotipinde EMS ve gama ışını kombinasyonlarının bitkideki letal dozlarını (LD50) belirlemişlerdir. Araştırma sonucunda gama rasyasyonunda LD 50 dozları Nirmal, Biol-212 ve Berhampur çeşitlerinde sırasıyla 590 Gy, 630 Gy ve 539 Gy olarak belirlemişlerdir. Nirmal ve Bipl-212 çeşitlerinde %0.5 ve Berhampu çeşidinde ise %1'in üzerindeki EMS dozlarının öldürücü etki gösterdiğini belirlemişlerdir.

Uzun ve Yükselgüngör (2020), 4 farklı korunga çeşidinde in vitro şartlarda bitki rejenerasyonu amacıyla, steril fidelerde kotiledon boğum eksplantını farklı bitki büyüme düzenleyiciler içeren MS besin ortamında kültüre almışlardır. En fazla eksplant başına sürgün sayısı *Onobrychis stenostachya*, *O. fallax* ve *O. elata* türlerinde 1.2 mg/L TDZ, *O. viciifolia*'da ise 0.3 mg/L TDZ ortamlardan elde etmişlerdir. Sürgünler 1 veya 2 mg/L IBA içeren MS besin ortamında köklendirmişlerdir.

Wijekoon vd. (2019), yonca ve korungada EMS uygulamaları için uygun dozları belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada ilk olarak ön ıslatmasız gerçekleştirdikleri çalışmada morfolojik bir varyasyon saptayamadıkları için tohumlar 6-12 ve 24 saatlik oda sıcaklığında saf suda bekletmişlerdir. Ardından %0.5- 1 ve 2 EMS dozlarıyla muamele edilmiştir. Artan EMS dozlarında ve uygulamalarda tohumların canlılıklarında doğru orantılı olarak azalış belirlemişlerdir. LD50 dozunu yonca için %0.95 EMS dozu ve 12 saat uygulama, korunga da ise %1.5 EMS dozu ve 12 saat uygulama süresi olarak belirlemişlerdir. Her iki tür içinde en fazla varyasyon 6 saat EMS uygulamasından elde edilmiş olup, 6 saat uygulamasında LD50 dozunu yonca ve korunga için %0.5 ve 1 olarak ifade etmişlerdir.

Dubey vd. (2020), ketende artan tuz dozlarına bağlı olarak (0, 50, 100, 150 ve 200 mM NaCl, KCl, CaCl₂) klorofil a, klorofil ve karotenoid miktarının sürekli olarak azaldığını saptamışlardır.

Güvercin vd. (2020), kurmuş oldukları çalışmada, EMS kimyasal mutajenin, pamuk tohumlarında çimlenme üzerine etkisini belirlemek amacıyla 2 farklı pamuk çeşidini; Teks (*Gossypium hirsutum* L.) ve Aşkabat 100 (*Gossypium barbadense* L.) bitki materyali olarak kullanmışlardır. İki farklı EMS dozunu iki farklı sürede (% 0.5 ve 1; 6 ve 12 saat) uygulamışlardır. Çalışma sonucunda, tohumların çimlenme oranı, uygulama dozu ve uygulama süresine göre değişiklik göstermiştir. Kontrol uygulamanın çimlenme oranı, uygulama süresi 6 saatten 12 saate yükseldiğinde artmıştır. En düşük çimlenme oranı, %1 EMS dozunun 6 saat uygulamasında görülürken, aynı dozun 12 saat uygulaması Aşkabat 100 pamuk çeşidinin çimlenme oranına engelleyici etkide bulunmuştur.

Kumar ve Kumari (2021), *Arthemisis vulgaris*'te in vitro EMS uygulamaları ile tuza dayanıklı bitkiler elde etmek amacıyla 30, 60 ve 90 dakika süreyle kalluslara %0.5 EMS uygulamışlardır. Araştırma sonucunda EMS uygulamalarının NaCl'nin toksik etkilerini azalttığını, büyüme ve biyokimyasal aktiviteyi artırdığını tespit etmişlerdir.

Nasri vd. (2021), dört farklı *Chrysanthemum morifolium* çeşidinde %.0125, 0.25 ve 0.5 EMS dozlarını yaprak disklerine uygulayarak mutasyon yaratmayı hedeflemişlerdir. Denemede Homa çeşidinin diğer çeşitlerden EMS uygulamalarına daha dayanıklı olduğunu ve yaşama oranının artan EMS dozuna bağlı olarak düştüğünü bildirmişlerdir. İn vitro koşullarda 2082 bitkicik elde etmişler ve bunlardan 28 yaprak ve 32 çiçek mutasyonu belirlemişlerdir. İn vitro koşullarda EMS ile oluşturulan mutasyonların yeni krizantem çeşitlerinin üretilmesi için ümitvar olduğunu bildirmişlerdir.

Sharavdorj vd. (2021), Yonca, çayır üçgülü ve kamışsı yumakta farklı tuz dozları sıcaklık derecelerinin çimlenme üzerine etkilerini incelemişlerdir. Çalışma sonucunda çimlenme oranının çayır üçgölünde diğer türlerden daha düşük olduğunu, tüm sıcaklık derecelerinde yüksek tuz dozlarında çimlenme yüzdesinin düştüğünü belirlemişlerdir. Hem tuzluluğun hem de sıcaklığın çimlenmeyi sınırlandırmada etkili olduğunu saptamışlardır.

2. BÖLÜM

MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Araştırma Yeri

Araştırma, Erciyes Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü laboratuvarında, kontrollü koşullarda iklim dolabında yürütülmüştür.

2.2. Materyal

2.2.1. Bitki Materyali

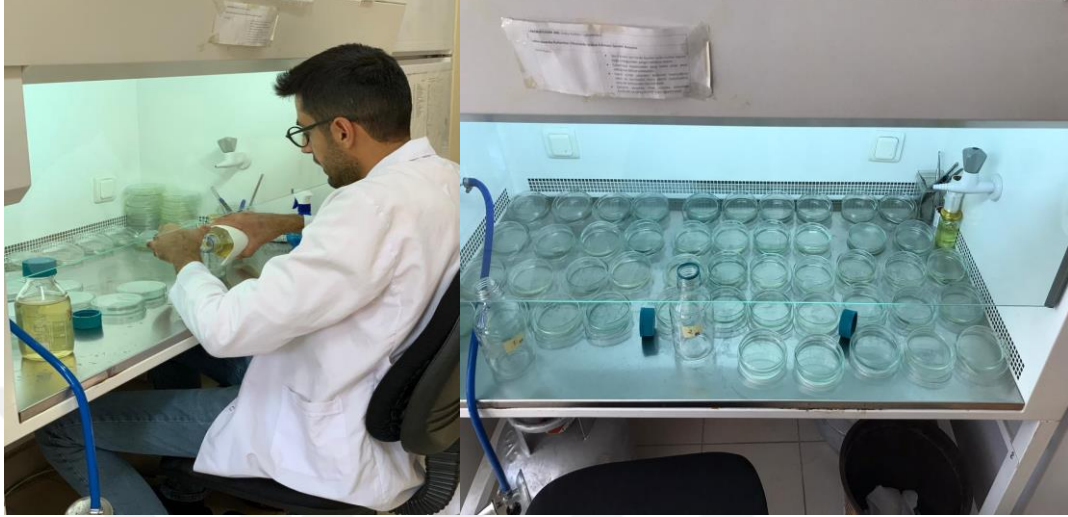
Çalışmada bitki materyali olarak Dadaş ve Tavlaş çayır üçgülü çeşitleri kullanılmıştır. Dadaş ve Tavlaş çayır üçgülü çeşitleri Doğu Anadolu Tarımsal Araştırma Enstitüsü tarafından geliştirilmiştir.

2.3. Yöntem

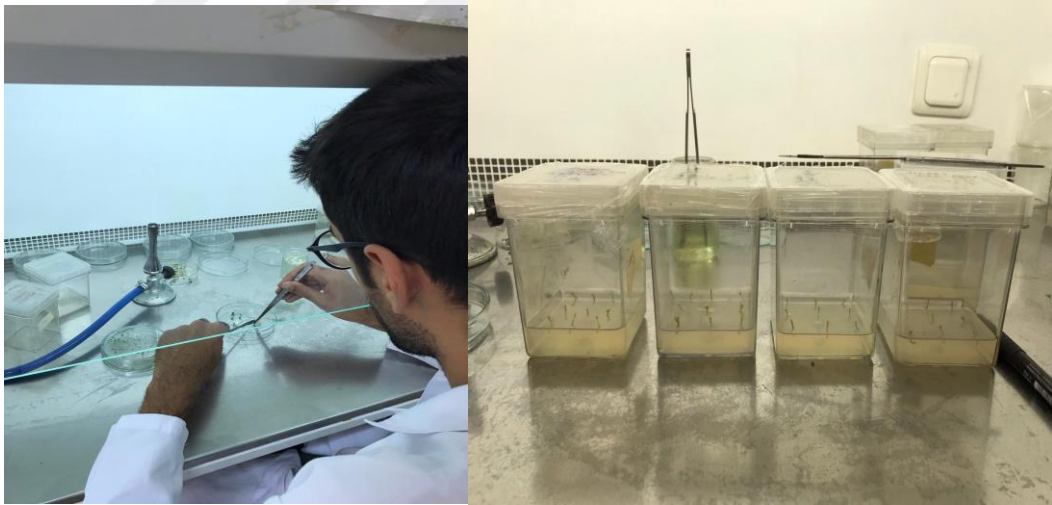
2.3.1. İn Vitro Rejenerasyon ve Köklendirme

Çalışma kapsamında öncelikle iki çayır üçgülü çeşidinin in vitro rejenerasyonu incelenmiştir. Bu amaçla çayır üçgülü tohumları %50 çamaşır suyunda 10 dakika steril edildikten sonra, 3 defa steril saf su ile durulanmış, 6 saat steril saf su içerisinde orbital çalkalayıcı da bekletilerek ½ MS, 30 g/L şeker içeren %7.5 agar ile katılaştırılmış besin ortamına çimlendirme için ekimi yapılmıştır. Çimlendirme başlangıcından yaklaşık 8-10 gün sonra kotiledon boğumlar izole edilerek Tablo 2.1’de verilen farklı konsantrasyonlarda ve kombinasyonlarda TDZ, BAP ve NAA eklenmiş, 30 g/L şeker içeren %7.5 agar ile katılaştırılmış MS besin ortamlarına aktarılmıştır (Şekil 2.1, 2.2 ve 2.3). Kültür başlangıcından yaklaşık 7-8 hafta sonra sürgün oluşturan eksplant yüzdesi (sürgün oluşturan eksplant sayısı/ toplam eksplant sayısı ×100), eksplant başına sürgün sayısı (toplam sürgün sayısı/sürgün oluşturan eksplant sayısı) ve ortalama sürgün

uzunluğu (her Magenta kabında sürgün oluşturan eksplantların sürgün uzunlukları ölçölmüş ve ortalaması alınmıştır) özellikleri belirlenmiştir.



Şekil 2.1. Ortamların hazırlanması



Şekil 2.2. Eksplantların ortamlara aktarılması



Şekil 2.3. Kotiledon boğum eksplantı

Tablo 2.1. Farklı TDZ, BAP ve NAA konsantrasyonları ve kombinasyonları

Ortamlar (mg/L)		
TDZ	BAP	NAA
0.25	-	-
0.5	-	-
1	-	-
1.5	-	-
0.25	-	0.5
0.5	-	0.5
1	-	0.5
1.5	-	0.5
0.25	-	1
0.5	-	1
1	-	1
1.5	-	1
-	0.5	-
-	1	-
-	2	-
-	0.5	0.5
-	1	0.5
-	2	0.5

Rejenere olan sürgünler 0.5-2 mg/L IAA veya IBA, 30 g/L şeker içeren %7.5 agarla katılaştırılmış MS besin ortamında köklendirmeye alınmıştır. Kültür başlangıcından ortalama 6 hafta sonra kök oluşturan sürgün yüzdesi (köklenen eksplant sayısı/toplam eksplant sayısı x100) ve kök uzunluğuna (cm) ait veriler toplanmıştır. Daha sonra sürgünler içerisinde torf içeren plastik bardaklara aktararak dış koşullara alıştırılmıştır.

2.3.2. Tohuma EMS Uygulamaları

Mutagen kaynağı olarak TGI marka EMS (Etil Metan Sülfonat) kullanılmıştır. Moleküler formülü $C_3H_8O_3S$ ve saflığı $>99\%$ şeklindedir. Açıldıktan sonra ağzı kapalı ve güneş ışığından korunaklı olarak $+4\text{ }^{\circ}C$ 'de muhafaza edilmiştir. Çeşitlere ait tohumlar, sterilizasyon işleminden sonra 6 saat süreyle saf su içerisinde bekletilmiş ve ardından 6 saat süreyle $0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1$ ve 1.2 (v/v) EMS ile muamele edilerek iyice steril saf su ile durulandıktan sonra 30 g/L şeker içeren 7.5% agar ile katılaştırılmış MS besin ortamına ekilmiştir. EMS uygulamaları sırasında tüm ortamlara 2% DMSO eklenmiştir. Her tekerrürde 25 tohum olacak şekilde ekimler yapılmıştır. Çimlendirme başlangıcından yaklaşık 14 gün sonra çimlenme yüzdesi (çimlenen tohum sayısı/ toplam çimlendirmeye alınan tohum sayısı $\times 100$) belirlenmiştir. Her tekerrürde 10 bitkide kök ve sürgün uzunlukları belirlendikten sonra 10 bitkinin yaş ağırlıkları alınmış ve $65\text{ }^{\circ}C$ 'de sabit ağırlığa gelinceye kadar bekletilmiş ve kuru ağırlıkları belirlenmiştir. Daha sonra fide başına yaş ve kuru ağırlıklar hesaplanmıştır.

2.3.3. Tohuma EMS Uygulaması ve NaCl İçeren Ortamda Rejenerasyon

EMS uygulamalarının tuz stresi üzerine etkilerini belirlemek amacıyla öncelikle tohumlar steril edildikten sonra, 6 saat süreyle saf su içerisinde bekletilmiş ve ardından 6 saat süreyle kontrol, $0.4, 0.6$ ve 0.8 (v/v) EMS ile muamele edilmiştir. EMS uygulamaları sırasında tüm ortamlara 2% DMSO eklenmiştir. Steril saf su ile iyice durulanan tohumlar MS, 30 g/L şeker içeren 7.5% agar ile katılaştırılmış besin ortamına ekilmiştir. Çimlendirme işleminden 10-15 gün sonra kotiledon boğum eksplantları $6, 8$ ve 10 g/L NaCl ilave edilmiş 0.5 mg/L TDZ, 30 g/L şeker içeren 7.5% agar ile katılaştırılmış MS besin ortamında kültüre alınmıştır. Kültür başlangıcından yaklaşık 6-7 hafta sonra sürgün oluşturan eksplant yüzdesi, eksplant başına sürgün sayısı ve ortalama sürgün uzunluğu belirlenmiştir. Daha sonra yaş eksplantlar tartılmış ve $65\text{ }^{\circ}C$ 'de sabit ağırlığa gelinceye kadar bekletilerek kuru ağırlıkları belirlenmiştir. Böylece sürgün oluşturan eksplant başına yaş ve kuru ağırlıklar hesaplanmıştır. Ayrıca klorofil a, klorofil b ve toplam klorofil analizi Curtis ve Shetty (1996)'e göre gerçekleştirilmiştir. İlk önce 50 mg taze sürgün örneği, 3 ml metanol içerisinde $23\text{ }^{\circ}C$ 'de karanlık bir ortamda 2 saat boyunca tutularak homojenize olması sağlanmıştır (Şekil 2.4). Homojenize edilmiş sıvıdan 0.3 ml alınarak 650 ve 665 nm 'de spektrofotometrede

optik yoğunluğu ölçülmüş ve klorofil a, klorofil b ve toplam klorofil miktarları μg klorofil/g taze doku cinsinden saptanmış ve aşağıda verilen formüller ile hesaplanmıştır (Şekil 2.4).

$$\text{Klorofil}_a = (16.5 \times A_{665} - 8.3 \times A_{650}) \times 3 / 0.05$$

$$\text{Klorofil}_b = (33.8 \times A_{650} - 12.5 \times A_{665}) \times 3 / 0.05$$

$$\text{Toplam klorofil} = (25.8 \times A_{650} - 4.0 \times A_{665}) \times 3 / 0.05$$



Şekil 2.4. Klorofil analizi için hazırlanan örnekler ve spektrofotometrede okuma işlemi

İyon sızıntısı Aydın (2018)'de belirtilen yöntemle yapılmıştır. Alınan yaş sürgünler (0.5 g) saf su ile yıkandıktan sonra 10 ml saf su içerisinde oda sıcaklığında ve 24 saat bekletilerek çözeltinin EC'si ölçülmüştür ($O.D_1$). Daha sonra otoklavda 121°C 'de 20 dakika bekletilip, soğutulduktan sonra tekrar EC'si ölçüldükten sonra ($O.D_2$) yaprak dokularında iyon sızıntısı aşağıdaki eşitlik ile hesaplanmıştır (Aydın, 2018).

$$\% \text{İyon Sızıntısı} = (O.D_1 / O.D_2) \times 100$$

2.3.4. Çalışmada Kullanılan Besi Ortamları ve Bitki Büyüme Düzenleyicileri

Çalışmada ortam içeriği olarak mineral ve vitaminler için MS (Murashige ve Skoog, 1962; Tablo 2.2) ile beraber karbon kaynağı olarak sukroz ve ortamı katılaştırmak için agar kullanılmıştır. Saf su, besin ortamların ve çalışmada kullanılan alet ekipmanın (beherler, petri kutuları, magenta kapları, santrifüj tüpleri, pipet uçları vb) sterilizasyonu otoklav kullanılarak 1.5 atmosfer basınç altında, 121°C 'de 20 dakika

sürede gerçekleştirilmiştir. Isıya dayanıklı olmayan bitki büyüme düzenleyicilerin sterilizasyonu ise milipore filtre kullanılarak yapılmıştır (Tablo 2.3). Tüm steril çalışmalar hepa filtreli steril kabin içerisinde gerçekleştirilmiştir. Besin ortamlarının pH'sı 1N NaOH ve 1 N HCl kullanılarak 5.6 ile 5.8 arasında ayarlanmış ve kültürler 16 saat aydınlık 8 saat karanlık fotoperyotta, $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de ve 5000 lüks ışık yoğunluğunda büyütülmüşlerdir.

Tablo 2.2. MS besin ortamının içeriği

İçerik	Miktar (mg/L)
Makro Elementler	
CaCl ₂	332.02
KH ₂ PO ₄	170.00
KNO ₃	1900.00
MgSO ₄	180.54
NH ₄ NO ₃	1650.00
Mikro Elementler	
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025
FeNaEDTA	36.70
H ₃ BO ₃	6.20
KI	0.83
MnSO ₄ .H ₂ O	16.90
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.60
Vitaminler	
Glycine	2.00
Myo-inositol	100.00
Nikotinik asit	0.50
Pyridoksin HCL	0.50
Thiamine HCL	0.10

<https://www.duchefa-biochemie.com/product/category/id/16/name/plant-tissue-culture-media>, Murashige ve Skoog, 1962

Tablo 2.3. Çalışmada kullanılan bitki büyüme düzenleyicilerin sterilizasyon yöntemi ve kullanılan çözücü

Adı	Çözücü	Stok Solüsyon	Sterilizasyon
		Saklama Sıcaklığı	
NAA	NaOH	0-5	Otoklav
BAP	NaOH	0-5	Otoklav
Thidiazuran	DMSO	-20	Filtre
IBA	NaOH	-20	Filtre
IAA	NaOH	-20	Filtre

2.3.5. Verilerin Değerlendirilmesi

Araştırma tesadüf parsellerinde faktöriyel deneme desenine göre kurulmuş olup, EMS dozları kullanılarak çimlendirme denemesi 4 tekerrürlü ve her tekerrürde 25 tohum; in vitro rejenerasyon ile EMS ve tuz denemeleri 4 tekerrürlü ve her tekerrürde 9 eksplant; köklendirme denemeleri ise 3 tekerrürlü ve 6 eksplant olacak şekilde yürütülmüştür. Yüzde değerler varyans analizinden önce “arcsin” transformasyonuna tabi tutulmuştur. Araştırma sonucunda elde edilen veriler bilgisayarda “JMP 13.2.0” programı ile tesadüf parsellerinde faktöriyel deneme desenine göre analiz edilmiştir. Muamele ortalamaları Tukey Çoklu Karşılaştırma Testi ile karşılaştırılmıştır (Snedecor ve Cochran, 1967).

3. BÖLÜM

BULGULAR

3.1. Çayır Üçgülünde İn Vitro Sürgün Rejenerasyonu

Çalışmada Dadaş ve Tavlaş çayır üçgülü çeşitlerinde sürgün rejenerasyonu amacıyla kotiledon boğum eksplantları TDZ (0.25-1.5 mg/L) ve BAP (0.5-2 mg/L) sitokininleri ile bir oksin olan NAA (0.5-1 mg/L) kombinasyonlarını içeren MS besin ortamında kültüre alınmıştır. Kültür başlangıcından yedi-sekiz hafta sonra sürgün oluşturan eksplant yüzdesi, eksplant başına sürgün sayısı ve ortalama sürgün uzunlukları belirlenmiştir. Elde edilen verilere ait varyans analizi sonuçları Tablo 3.1.'de özetlenmiştir. Varyans analizi sonuçlarına göre sürgün oluşturan eksplant yüzdesi ve ortalama sürgün uzunluğunda çeşitler ve ortamlar 0.01 düzeyinde önemli, çeşit × ortam interaksyonu önemsiz; eksplant başına sürgün sayısında sadece ortamlar 0.01 düzeyinde istatistiksel olarak önemli, çeşitler ve çeşit × ortam interaksyonu önemsiz bulunmuştur.

Dadaş ve Tavlaş çayır üçgülü çeşitlerinde farklı büyümeyi düzenleyiciler içeren ortamlarda elde edilen sürgün oluşturan eksplant yüzdesi, eksplant başına sürgün sayısı ve ortalama sürgün uzunluğuna ait ortalama değerler ve Tukey gruplandırmaları Tablo 3.2 ve 3.3'te verilmiştir. Tablo 3.2 incelendiğinde sürgün oluşumu Dadaş ve Tavlaş çeşitlerinde sırasıyla %52.77-100 ve %58.33-100 arasında değişim göstermiştir. Her iki çeşitte de en yüksek sürgün rejenerasyonu yüzdesi 0.5 mg/L TDZ, en düşük ise 2 mg/L BAP+0.5 mg/l NAA içeren ortamlarda tespit edilmiştir. İki çeşidin ortalamasında en yüksek sürgün rejenerasyonu %100 ile 0.5 mg/L TDZ içeren ortamdan elde edilmiş olup, 0.25 mg/L (%94.44) ve 1 mg/L TDZ (%91.66) içeren ortamlar ile aynı istatistiksel grupta yer yer almıştır. TDZ ve BAP'ın NAA ile kombinasyonları sürgün oluşturan eksplant yüzdelерinin düşmesine neden olmuştur.

Tablo 3.1. Dadaş ve Tavlaş çayır üçgülü çeşitlerinde farklı sitokinin ve oksin konsantrasyon ve kombinasyonlarının sürgün oluşturan eksplant yüzdesi, eksplant başına sürgün sayısı ve ortalama sürgün uzunluğuna etkisine ait varyans analizi

Sürgün Oluşturan Eksplant Yüzdesi			
<i>Varyasyon Kaynakları</i>	<i>Serbestlik Derecesi</i>	<i>Kareler Toplamı</i>	<i>F Değeri</i>
Çeşit	1	1115.794	9.675**
Ortam	17	15766.051	8.041**
Çeşit × Ortam	17	1998.901	1.019
Hata	108	12456.072	
Genel	143	31336.819	
Eksplant Başına Sürgün Sayısı			
Çeşit	1	0.0832	0.800
Ortam	17	20.332	11.512**
Çeşit × Ortam	17	1.886	0.673
Hata	108	11.220	
Genel	143	32.824	
Ortalama Sürgün Uzunluğu			
Çeşit	1	0.996	6.892**
Ortam	17	12.966	5.278**
Çeşit × Ortam	17	3.562	1.450
Hata	108	15.607	
Genel	143	33.132	

**0.01 düzeyinde önemli

Dadaş ve Tavlaş çayır üçgülü çeşitlerinde eksplant başına sürgün sayıları ise sırasıyla 2.33-3.49 adet ve 2.23-3.55 adet sürgün arasında değişim göstermiştir. İki çeşidin ortalamasına göre ortamlar incelendiğinde en yüksek eksplant başına sürgün sayısı ortalama 3.48 adet ile 0.25 mg/L TDZ içeren ortamdan elde edilirken 0.5 mg/L TDZ, 1 mg/L TDZ, 0.25 mg/L TDZ+0.5 mg/L NAA, 0.5 mg/L TDZ +0.5 mg/L NAA ve 0.5 mg/L BAP içeren ortamlar istatistiksel olarak aynı grupta yer almıştır. En düşük eksplant başına sürgün sayısı ise sırasıyla 2.28 ve 2.29 adet ile 2 mg/L BAP+0.5 mg/L NAA ve 1.5 mg/L TDZ ve+1 mg/L NAA içeren ortamlardan elde edilmiştir.

Sürgün uzunluklarına ait Tablo 3.3. incelendiğinde sürgün uzunlukları Dadaş çeşidinde 1.13-2.31 cm ve Tavlaş çeşidinde 1.66-2.83 cm arasında değişim göstermiştir. İki çeşidin ortalamasına göre en yüksek sürgün uzunluğu 2.57 cm ile 0.5 mg/L TDZ içeren ortamdan elde edilmiş olup, 0.25 mg/L TDZ bunların 0.5 mg/L NAA ile kombinasyonları, 0.5 mg/L TDZ+1 mg/L NAA ve BAP içeren ortamlar istatistiksel

olarak aynı grupta yer almıştır. En düşük sürgün uzunluğu ise 1.44 cm ile 1.5 mg/L TDZ+ 1 mg/L NAA içeren ortamdan elde edilmiştir.

Tablo 3.2. Dadaş ve Tavlaş çayır üçgülü çeşitlerinin farklı sitokinin ve oksin konsantrasyon ve kombinasyonlarında sürgün oluşturan eksplant yüzdeleri

Büyüme Düzenleyiciler (mg/L)			Sürgün Oluşturan Eksplant Yüzdesi		Ortalama
TDZ	BAP	NAA	Dadaş	Tavlaş	
0.25	--	--	94.44 (80.27)	94.44 (82.97)	94.44 (81.62) ^{ab**}
0.5	--	--	100.00 (90.00)	100.00 (90.00)	100 (90.00) ^a
1	--	--	94.44 (82.97)	88.88 (75.74)	91.66 (79.46) ^{abc}
1.5	--	--	83.33 (66.20)	80.5 (67.12)	81.92 (66.66) ^{b-f}
0.25	--	0.5	69.44 (56.67)	94.44 (80.27)	81.91 (68.47) ^{bcd}
0.5	--	0.5	86.11 (74.15)	83.33 (66.20)	84.72 (70.18) ^{bcd}
1	--	0.5	72.22 (58.46)	83.33 (66.58)	77.78 (62.52) ^{b-f}
1.5	--	0.5	72.22 (59.55)	83.33 (72.37)	77.78 (65.96) ^{b-f}
0.25	--	1	63.88 (53.25)	83.33 (69.29)	73.61 (61.27) ^{c-f}
0.5	--	1	63.88 (53.29)	77.77 (62.78)	70.83 (58.04) ^{def}
1	--	1	63.88 (53.25)	75.00 (60.47)	69.44 (56.86) ^{def}
1.5	--	1	61.11 (51.51)	75.00 (60.47)	68.056 (55.99) ^{def}
--	0.5	--	80.55 (64.04)	86.11 (71.07)	83.33 (67.55) ^{b-e}
--	1	--	75.00 (60.45)	77.77 (61.88)	76.39 (61.17) ^{c-f}
--	2	--	72.22 (58.31)	80.55 (67.50)	76.39 (62.90) ^{b-f}
--	0.5	0.5	66.66 (58.64)	72.22 (58.30)	69.44 (58.48) ^{def}
--	1	0.5	52.77 (46.64)	61.11 (51.46)	56.94 (49.05) ^{ef}
--	2	0.5	52.77 (46.64)	58.33 (49.83)	55.55 (48.23) ^f
Ortalama			73.60 (61.91) ^{b*}	80.86 (67.47) ^a	

(*) Aynı satırda ve (**) sütunda farklı küçük harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark $p \leq 0.05$ düzeyinde önemlidir. Transformasyon değerleri tabloda parantez içerisinde verilmiştir.

Tablo 3.3. Dadaş ve Tavlaş çayır üçgülü çeşitlerinin farklı sitokin ve oksin konsantrasyon ve kombinasyonlarında eksplant başına sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu değerleri

Büyüme Düzenleyiciler (mg/L)			Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet)		Ortalama
TDZ	BAP	NAA	Dadaş	Tavlaş	
0.25	--	--	3.41	3.55	3.48 ^{a**}
0.5	--	--	3.33	3.43	3.38 ^{ab}
1	--	--	3.49	3.05	3.27 ^{abc}
1.5	--	--	2.99	2.81	2.90 ^{b-f}
0.25	--	0.5	2.97	3.01	2.99 ^{a-e}
0.5	--	0.5	3.06	2.97	3.02 ^{a-e}
1	--	0.5	2.49	2.48	2.48 ^{d-g}
1.5	--	0.5	2.39	2.46	2.42 ^{efg}
0.25	--	1	2.93	2.69	2.81 ^{b-g}
0.5	--	1	3.02	2.68	2.85 ^{b-g}
1	--	1	2.29	2.37	2.33 ^{fg}
1.5	--	1	2.21	2.37	2.29 ^g
--	0.5	--	3.29	3.06	3.17 ^{abc}
--	1	--	2.71	2.96	2.84 ^{b-g}
--	2	--	2.43	2.52	2.47 ^{d-g}
--	0.5	0.5	2.85	2.67	2.76 ^{c-g}
--	1	0.5	2.40	2.38	2.39 ^{fg}
--	2	0.5	2.33	2.23	2.28 ^g
Ortalama			2.81	2.76	
Sürgün Uzunluğu (cm)					
0.25	--	--	2.18	2.42	2.30 ^{abc**}
0.5	--	--	2.31	2.83	2.57 ^a
1	--	--	1.75	1.93	1.84 ^{bcd}
1.5	--	--	1.44	1.82	1.63 ^{cd}
0.25	--	0.5	2.08	1.77	1.93 ^{a-d}
0.5	--	0.5	2.03	2.22	2.12 ^{abc}
1	--	0.5	1.84	1.70	1.77 ^{cd}
1.5	--	0.5	1.67	1.66	1.67 ^{cd}
0.25	--	1	1.78	1.98	1.88 ^{bcd}
0.5	--	1	2.13	1.93	2.03 ^{a-d}
1	--	1	1.59	1.91	1.75 ^{cd}
1.5	--	1	1.13	1.75	1.44 ^d
--	0.5	--	2.18	2.77	2.47 ^{ab}
--	1	--	2.09	2.83	2.46 ^{ab}
--	2	--	2.06	2.25	2.16 ^{abc}
--	0.5	0.5	2.07	1.86	1.96 ^{a-d}
--	1	0.5	2.13	1.83	1.99 ^{a-d}
--	2	0.5	1.94	1.96	1.95 ^{a-d}
Ortalama			1.91 ^{b*}	2.08 ^a	

(*) Aynı satırda ve (**) sütunda farklı küçük harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark $p \leq 0.05$ düzeyinde önemlidir.

3.2. Sürgünlerin İn Vitro Köklendirilmesi

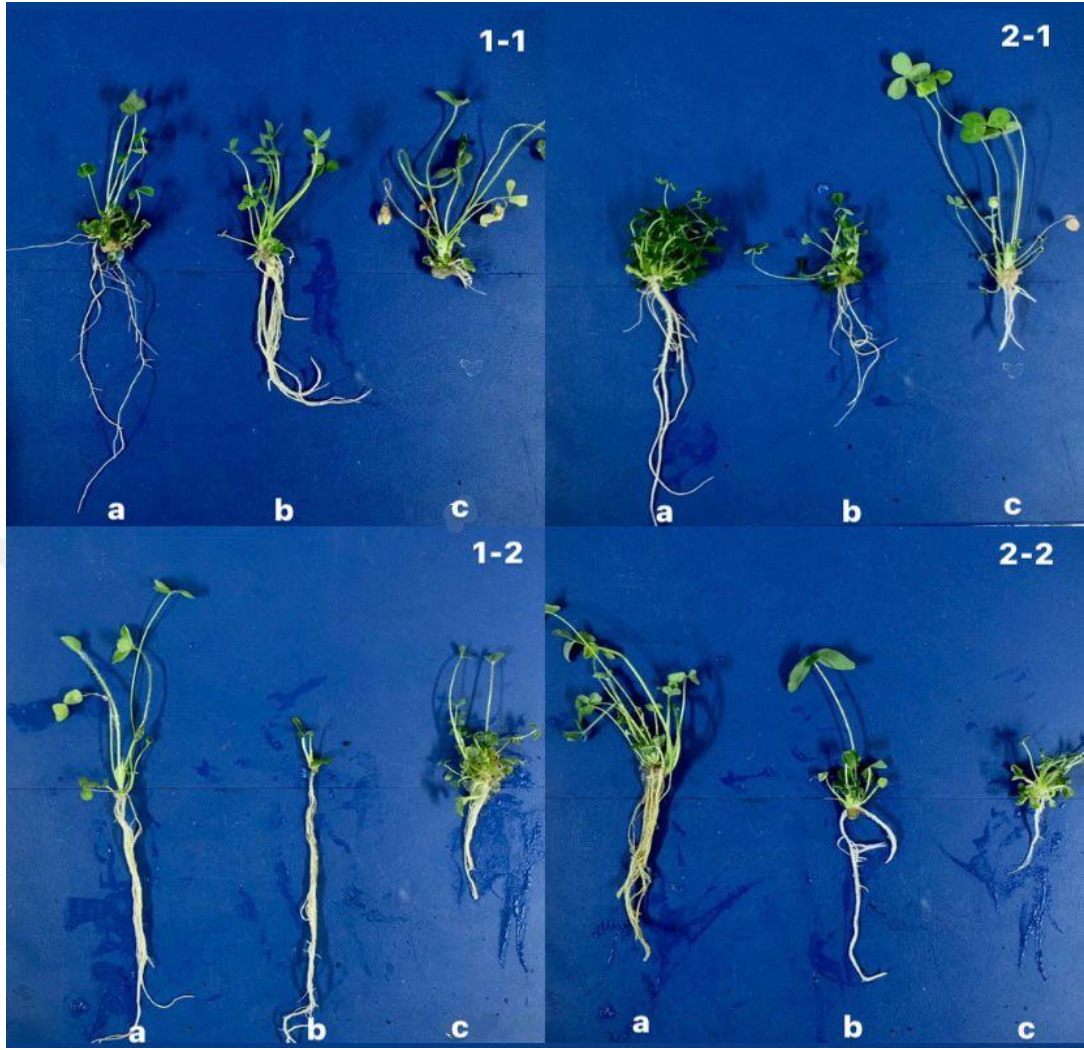
Rejenere olan sürgünler 0.5-2 mg/L IAA veya IBA, 30 g/L şeker içeren %7.5 agarla katılaştırılmış MS besin ortamında köklendirmeye alınmıştır. Kültür başlangıcından ortalama 6 hafta sonra kök oluşturan sürgün yüzdesi ve kök uzunluklar belirlenmiştir (Şekil 3.1). Köklenen sürgünler başarılı bir şekilde dış koşullara aktarılmıştır (Şekil 3.2). Köklenme ile ilgili varyans analiz sonuçlarına göre kök oluşturan sürgün yüzdesinde ortamlar, kök uzunluğunda ise çeşit, ortam ve çeşit × ortam interaksyonu istatistiksel olarak 0.01 düzeyinde önemli bulunmuştur (Tablo 3.4.)

Tablo 3.4. Çayır üçgülü çeşitlerinde farklı oksin dozlarının kök oluşturan sürgün yüzdesi ve kök uzunluğuna etkisine ait varyans analizi

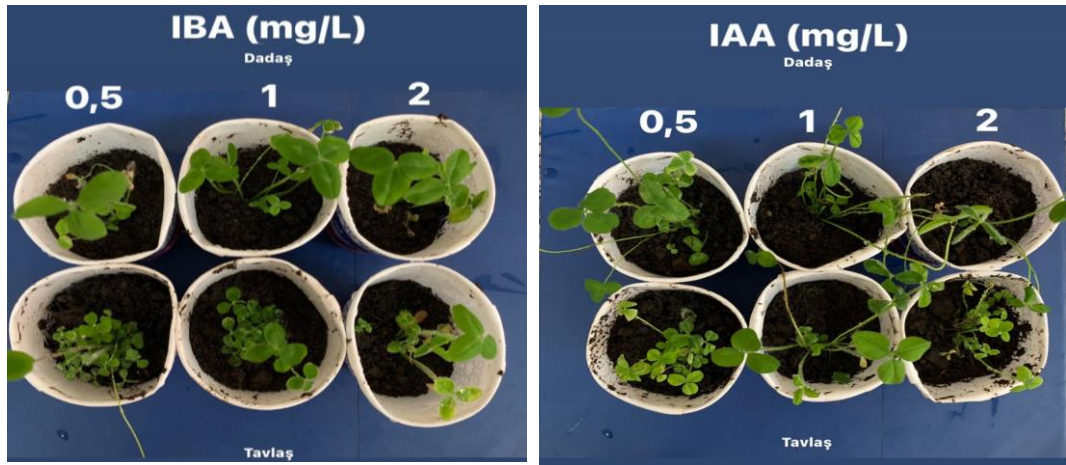
Varyasyon Kaynakları	Kök Oluşturan Sürgün Yüzdesi		
	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	F Değeri
Çeşit	1	0.469	0.022
Ortam	5	1417.807	13.531**
Çeşit × Ortam	5	72.629	0.693
Hata	24	502.966	
Genel	35	1993.871	
Kök Uzunluğu			
Çeşit	1	45.563	93.836**
Ortam	5	232.718	95.856**
Çeşit × Ortam	5	40.963	16.872**
Hata	24	11.653	
Genel	35	330.897	

**0.01 düzeyinde önemli

Kök oluşturan sürgün yüzdesinde Dadaş ve Tavlaş çeşitlerinde en yüksek değerler sırasıyla % 85.19 ve 88.89 ile 0.5 mg/L IBA içeren ortamda elde edilmiştir (Tablo 3.5). En düşük kök oluşumu ise sırasıyla %55.55 ve 59.26 ile 2 mg/l IAA içeren ortamda saptanmıştır. Kök uzunluklarında ise en yüksek değer Dadaş çeşidinde 8.27 cm ile 0.5 mg/L IAA içeren ortamdan elde edilirken, Tavlaş çeşidinde 11.47 cm ile 0.5 mg/L IBA içeren ortamdan elde edilmiştir.



Şekil 3.1. Sürgünlerin in vitro köklendirilmesi (1-1:Tavlaş IBA; 1-2:Tavlaş IAA; 2-1: Dadaş IBA; 2-2: Dadaş IAA ve a: 0.5 mg/L, b: 1mg/L, c: 2 mg/L)



Şekil 3.2. Köklenen sürgünlerin torf içeren ortamda gelişimleri

Tablo 3.5. Çayır üçgülü çeşitlerinin farklı oksin dozlarında kök oluşturan sürgün yüzdeleri ve kök uzunlukları

Oksinler (mg/L)		Kök Oluşturan Sürgün Yüzdesi		
IAA	IBA	Dadaş	Tavlaş	Ortalama
0.5	--	77.78(61.88)	74.07(60.00)	75.93(60.94) ^{ab**}
1	--	70.37(57.12)	74.07(59.50)	72.22(58.31) ^{bc}
2	--	55.55(48.19)	59.26(50.37)	57.41(49.28) ^d
--	0.5	85.19(67.65)	88.89(70.53)	87.04(69.09) ^a
--	1	74.07(59.50)	70.37(57.12)	72.22(58.31) ^{bc}
--	2	66.67(54.93)	59.26(50.37)	62.96(52.65) ^{cd}
Ortalama		71.61 (58.21)	70.98(57.98)	
Kök Uzunluğu (cm)				
0.5		8.27 ^{b***}	9.43 ^{ab}	8.85 ^{a**}
1		5.20 ^d	7.77 ^{bc}	6.48 ^b
2		2.90 ^{ef}	1.60 ^f	2.25 ^c
	0.5	5.87 ^{cd}	11.47 ^a	8.67 ^a
	1	5.20 ^d	8.87 ^b	7.03 ^b
	2	2.23 ^{ef}	4.03 ^{de}	3.13 ^c
Ortalama		4.94 ^{b*}	7.19 ^a	

Kök oluşturan sürgün yüzdesine ait transformasyon değerleri tabloda parantez içerisinde verilmiştir.

(*) Aynı satırda ve (**) sütunda farklı küçük harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark $p \leq 0.05$ düzeyinde önemlidir.

(***) Aynı satırda ve sütunda farklı küçük harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark $p \leq 0.05$ düzeyinde önemlidir.

3.3. Tohuma EMS Uygulamaları

Dadaş ve Tavlaş çayır üçgülü çeşitlerinde farklı EMS konsantrasyonlarının çimlenme ve fide gelişimi üzerine etkilerini incelemek amacıyla tohumlar steril edilip 6 saat steril saf su içerisinde bekletildikten sonra % 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1 ve 1.2 EMS ile muamele edilmiştir. EMS işleminden sonra tohumlar iyice durulanmış ve MS besin ortamına alınarak çimlendirmeye bırakılmıştır. Kültür başlangıcından 14 gün sonra çimlenme yüzdesi, sürgün ve kök uzunluğu (cm), fide yaş ve kuru ağırlık (mg) parametreleri incelenmiştir.

3.3.1. Çimlenme Yüzdesi

Varyans analiz sonuçlarına göre çimlenme yüzdesinde çeşit, doz ve çeşit $\times$ doz etkisi istatistiksel olarak 0.01 düzeyine göre önemli bulunmuştur (Tablo 3.6).

Tablo 3.6. Çayır üçgülü çeşitlerinde farklı EMS konsantrasyonlarının çimlenme yüzdesine etkisine ait varyans analizi

Varyasyon Kaynakları	Çimlenme Yüzdesi		
	Serbestlik Derecesi	Kareler Toplamı	F Değeri
Çeşit	1	501.765	45.469**
Doz	6	8033.465	121.329**
Çeşit × doz	6	442.677	6.686**
Hata	42	463.485	
Genel	55	9441.392	

**0.01 düzeyinde önemli

Farklı EMS konsantrasyonlarında çimlenme yüzdeleri Dadaş çeşidinde %23-80, Tavlaş çeşidinde ise %22-85 arasında değişim göstermiştir (Tablo 3.7). En yüksek çimlenme yüzdesi kontrol uygulamalarından elde edilirken en düşük çimlenme yüzdesi %1.2 EMS uygulamasından elde edilmiştir. Dadaş çeşidinde %0.6 EMS ve üzerindeki uygulamalar istatistiksel olarak en düşük çimlenme yüzdesi elde edilen uygulama ile aynı grupta yer alırken Tavlaş çeşidinde ise %1 EMS uygulaması aynı grupta yer almıştır.

Tablo 3.7. Çayır üçgülü çeşitlerinin farklı EMS konsantrasyonlarında çimlenme yüzdeleri (%)

EMS Dozu (%)	Dadaş	Tavlaş	Ortalama
Kontrol	80.00 (63.49) ^{a***}	85.00 (67.33) ^a	82.50 (65.41) ^{a**}
0.2	56.00 (48.45) ^{bc}	66.00 (54.42) ^b	61.00 (51.43) ^b
0.4	49.00 (44.42) ^c	60.00 (50.80) ^{bc}	54.50 (47.61) ^b
0.6	31.00 (33.77) ^d	58.00 (49.64) ^{bc}	44.50 (41.70) ^c
0.8	28.00 (31.94) ^d	47.00 (43.27) ^c	37.50 (37.61) ^c
1	26.00 (30.64) ^d	25.00 (29.94) ^d	25.50 (30.29) ^d
1.2	23.00 (28.64) ^d	22.00 (27.85) ^d	22.50 (28.24) ^d
Ortalama	41.86 (40.19) ^{b*}	51.85 (46.18) ^a	

(*) Aynı satırda ve (**) sütunda farklı küçük harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark $p \leq 0.05$ düzeyinde önemlidir. Transformasyon değerleri tabloda parantez içerisinde verilmiştir.

(***) Aynı satırda ve sütunda farklı küçük harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark $p \leq 0.05$ düzeyinde önemlidir.

3.3.2. Sürgün ve Kök Uzunlukları

Varyans analiz sonuçlarına göre sürgün ve kök uzunluğunda; çeşit ve doz istatistiksel olarak 0.01 düzeyinde önemli bulunmuştur. Çeşit × doz interaksiyonu ise istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur (Tablo 3.8).

Tablo 3.8. Çayır üçgülü çeşitlerinde farklı EMS konsantrasyonlarının sürgün ve kök uzunluklarına etkisine ait varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynakları	Serbestlik Derecesi	Sürgün Uzunluğu		Kök Uzunluğu	
		KT	F Değeri	KT	F Değeri
Çeşit	1	1.416	13.438**	2.730	8.577**
Doz	6	138.376	218.926**	531.202	278.112**
Çeşit × doz	6	0.958	1.515	1.409	0.738
Hata	42	4.424		13.370	
Genel	55	145.173		548.712	

**0.01 düzeyinde önemli

Farklı EMS dozlarında en yüksek sürgün uzunluğu değerleri 5.52 ve 5.47 cm ile Dadaş ve Tavlaş çeşitlerinde kontrol uygulamasında saptanmıştır (Tablo 3.9). Benzer şekilde en yüksek kök uzunluğu değerleri de 9.51 ve 9.76 cm ile kontrol uygulamasında saptanmıştır. Her iki çeşitte de artan EMS konsantrasyonlarına bağlı olarak sürgün ve kök uzunluklarının düştüğü görülmektedir. En düşük sürgün ve kök uzunluğu değerleri ise %1.2 EMS uygulamasında kaydedilmiştir.

Tablo 3.9. Çayır üçgülü çeşitlerinin farklı EMS konsantrasyonlarında sürgün ve kök uzunluk değerleri (cm)

EMS Dozu (%)	Sürgün Uzunluğu			Kök Uzunluğu		
	Dadaş	Tavlaş	Ortalama	Dadaş	Tavlaş	Ortalama
Kontrol	5.52	5.47	5.49^{a**}	9.51	9.76	9.63^{a**}
0.2	4.02	4.66	4.34^b	7.68	7.15	7.41^b
0.4	3.71	4.39	4.05^b	7.19	6.71	6.94^b
0.6	1.88	2.30	2.09^c	2.82	2.09	2.45^c
0.8	1.73	1.99	1.86^{cd}	2.75	1.97	2.36^c
1	1.38	1.62	1.50^{de}	1.95	1.61	1.78^{cd}
1.2	1.02	1.06	1.04^e	1.67	1.19	1.43^d
Ortalama	2.75^{b*}	3.07^a		4.79^{a*}	4.35^b	

(*) Aynı satırda ve (**) sütunda farklı küçük harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark $p \leq 0.05$ düzeyinde önemlidir.

3.3.3 Fide Yaş ve Kuru Ağırlıkları

Varyans analiz sonuçlarına göre fide yaş ve kuru ağırlıklarında; EMS dozları istatistiksel olarak 0.01 düzeyinde önemli bulunurken; çeşit, çeşit × doz interaksyonu istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur (Tablo 3.10)

Tablo 3.10. Çayır üçgülü çeşitlerinde farklı EMS konsantrasyonlarının fide yaş ve kuru ağırlıklarına etkisine ait varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynakları	Serbestlik Derecesi	Yaş Ağırlık		Kuru Ağırlık	
		KT	F Değeri	KT	F Değeri
Çeşit	1	1032.316	3.761	4.267	0.909
Doz	6	48371.256	29.369**	571.553	20.280**
Çeşit × doz	6	2865.396	1.740	4.001	0.142
Hata	42	11529.219		197.280	
Genel	55	63798.188		777.102	

**0.01 düzeyinde önemli

Dadaş ve Tavlaş çayır üçgülü çeşitlerinde fide yaş ağırlığı sırasıyla 25.67-85.25 ve 21.07-122.50 mg; kuru ağırlıkları ise sırasıyla 3.417-12.825 ve 3.530-11.500 mg arasında değişim göstermiştir (Tablo 3.11). İki çeşidin ortalamasına ait veriler incelendiğinde en yüksek yaş ve kuru ağırlık değerleri kontrol uygulamasından elde edilirken, yaş ağırlıkta %0.2 ve 0.4 EMS, kuru ağırlıkta ise %0.2 EMS uygulamaları ile aynı istatistiksel grupta yer almıştır. En düşük yaş ve kuru ağırlık değerleri %1.2 EMS uygulamasından elde edilmiş olup %0.6, 0.8 ve 1.2 EMS uygulamaları ile aynı istatistiksel grupta yer almıştır.

Tablo 3.11. Çayır üçgülü çeşitlerinin farklı EMS konsantrasyonlarında fide yaş ve kuru kuru ağırlık değerleri (mg)

EMS Dozu (%)	Yaş Ağırlık (mg/fide)			Kuru Ağırlık (mg/fide)		
	Dadaş	Tavlaş	Ortalama	Dadaş	Tavlaş	Ortalama
Kontrol	85.25	122.50	103.88^{a*}	12.825	11.500	12.162^{a*}
0.2	82.50	99.00	90.75^a	9.750	9.750	9.750^{ab}
0.4	71.25	86.75	79.00^a	8.500	7.500	8.000^b
0.6	47.64	44.25	45.94^b	5.070	4.000	4.535^c
0.8	41.07	43.28	42.18^b	4.286	3.833	4.059^c
1	30.66	27.30	28.98^b	3.810	3.679	3.744^c
1.2	25.67	21.07	23.37^b	3.417	3.530	3.473^c
Ortalama	54.86	63.45		6.810	6.256	

(*) Aynı sütunda farklı küçük harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark $p \leq 0.05$ düzeyinde önemlidir.

3.4. Tohuma EMS Uygulaması ve NaCl İçeren Ortamda Rejenerasyon

Çalışmada mutajen kaynağı olarak kullanılan EMS tohumlara %0, 0.4, 0.6 ve 0.8 dozlarında uygulandıktan sonra gelişen fidelerde kotiledon boğumlar izole edilerek kontrol, 6, 8, 10 g/L NaCl ilave edilmiş %7.5 agar, 30 g/L şeker ve 0.5 mg/L TDZ içeren MS besin ortamında kültüre alınmıştır. Mutajen uygulanan tohumlardan gelişen eksplantların tuz ortamlarındaki toleransları incelenmiştir (Şekil 3.3. ve 3.4). Kültür

başlangıcından 6-7 hafta sonra sürgün oluşturan eksplant sayıları (%), eksplant başına sürgün sayısı (adet), ortalama sürgün uzunluğu (cm), sürgün oluşturan eksplant başına sürgün yaş ve kuru ağırlıkları (mg), klorofil a, b ve toplam klorofil (μg klorofil/g doku) ve iyon sızıntısı (%) incelenmiştir.

3.4.1. Sürgün Oluşturan Eksplant Yüzdesi

Varyans analiz sonuçlarına göre sürgün oluşturan eksplant yüzdesinde çeşit, EMS dozu, tuz dozu, çeşit $\times$ tuz dozu interaksyonu istatistiksel olarak 0.01 düzeyinde önemli bulunmuştur (Tablo 3.12). Çeşit $\times$ EMS dozu $\times$ tuz dozu interaksyonuna ait ortalamalar Tablo 3.13’de verilmiştir. Çeşit $\times$ EMS dozu $\times$ tuz dozu interaksyon tablosu incelendiğinde genel olarak her iki çeşitte de her bir EMS uygulamasında tuz dozlarındaki artışa bağlı olarak sürgün oluşturan eksplant yüzdesinde bir düşüş gözlenmiştir. EMS dozları incelendiğinde ise en yüksek sürgün oluşumu %77.88 ile %0.4 EMS uygulamasında elde edilmiş ve kontrol (%75.52) ile aynı istatistiksel grupta yer almıştır. EMS uygulamalarında %0.4 üzerinde doz artışıyla sürgün oluşumu azalmıştır (Tablo 3.13).

Çeşit $\times$ tuz dozu interaksyonuna ait Tablo 3.14 incelendiğinde Dadaş çeşidinde en yüksek sürgün rejenerasyonu %91.19 ile kontrol uygulamasından elde edilirken, Tavlaş çeşidinde %90.27 ve %88.88 ile kontrol ve 6 g/L tuz uygulamasından elde edilmiştir. Kontrole göre artan tuz dozlarına bağlı olarak sürgün oluşturan eksplant yüzdesinde azalış belirlenmiştir. Dadaş çeşidinde ortalama %71.61, Tavlaş çeşidinde ise %77.60 sürgün oluşumu saptanmıştır.

Tablo 3.12. Çayır üçgülü çeşitlerinde farklı EMS ve tuz dozlarının sürgün oluşturan eksplant yüzdesine etkisine ait varyans analizi

Varyasyon Kaynakları	S.D	Sürgün Oluşturan Eksplant Yüzdesi	
		KT	F Değeri
Çeşit	1	657.246	14.263**
EMS Dozu	3	567.484	4.105**
Tuz Dozu	3	14002.895	101.293**
Çeşit $\times$ EMS Dozu	3	48.955	0.354
Çeşit $\times$ Tuz Dozu	3	573.392	4.148**
EMS Dozu $\times$ Tuz Dozu	9	627.828	1.514
Çeşit $\times$ EMS Dozu $\times$ Tuz Dozu	9	552.928	1.333
Hata	96	4423.719	
Genel	127	21454.447	

**0.01 düzeyinde önemli

Tablo 3.13. Çayır üçgülü çeşitlerinin farklı EMS ve tuz dozlarında sürgün oluşturan eksplant yüzdeleri (%)

EMS Dozu (%)	Tuz Dozu (g/L)	Sürgün Oluşturan Eksplant Yüzdesi			Ortalama EMS dozu
		Dadaş	Tavlaş	Ortalama	
Kontrol	Kontrol	94.44(80.27)	94.44(80.27)	94.44(80.27)	75.52 (62.90)^{ab}
	6	81.94(65.50)	86.11(68.37)	84.03(66.93)	
	8	66.66(54.74)	80.55(64.04)	73.61(59.39)	
	10	44.44(41.81)	55.55(48.19)	50.00(45.00)	
0.4	Kontrol	96.28(82.33)	91.67(75.40)	93.97(78.86)	77.88(64.58)^a
	6	85.16(67.56)	91.67(75.40)	88.42(71.49)	
	8	72.22(58.31)	80.56(64.42)	76.39(61.36)	
	10	50.00(45.00)	55.56(48.19)	52.78(46.60)	
0.6	Kontrol	88.89(70.53)	88.89(73.23)	88.88(71.88)	73.26(60.12)^b
	6	75.00(60.10)	88.89(70.53)	81.94(65.31)	
	8	63.89(53.25)	75.00(60.09)	69.44(56.67)	
	10	52.78(46.60)	52.78(46.64)	52.78(46.62)	
0.8	Kontrol	85.17(67.56)	86.11(71.07)	85.64(69.31)	71.76(59.35)^b
	6	63.89(53.25)	88.89(73.24)	76.39(63.24)	
	8	63.89(53.25)	72.22(58.31)	68.05(55.78)	
	10	61.11(51.46)	52.78(46.64)	56.94(49.05)	

Aynı sütunda farklı küçük harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark $p \leq 0.05$ düzeyinde önemlidir.

Tablo 3.14. Çayır üçgülü çeşitlerinin farklı tuz dozlarında sürgün oluşturan eksplant yüzdeleri

Tuz Dozu (g/L)	Sürgün Oluşturan Eksplant Yüzdesi		
	Dadaş	Tavlaş	Ortalama
Kontrol	91.19 (75.17) ^{a ***}	90.27(74.99) ^a	90.73(75.08) ^{a**}
6	76.50(61.60) ^b	88.88(71.88) ^a	82.69(66.74) ^b
8	66.66(54.88) ^b	77.08(61.71) ^b	71.87(58.30) ^c
10	52.08(46.22) ^c	54.16(47.41) ^c	53.12(46.82) ^d
Ortalama	71.61 (59.47) ^{b*}	77.60 (64.00) ^a	

Transformasyon değerleri tabloda parantez içerisinde verilmiştir.

(*) Aynı satırda ve (**) sütunda farklı küçük harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark $p \leq 0.05$ düzeyinde önemlidir.

(***) Aynı satırda ve sütunda farklı küçük harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark $p \leq 0.05$ düzeyinde önemlidir.

3.4.2 Eksplant Başına Sürgün Sayısı ve Ortalama Sürgün Uzunluğu

Varyans analizi sonuçlarına göre eksplant başına sürgün sayısında EMS dozu, tuz dozu, çeşit $\times$ tuz dozu ve EMS dozu $\times$ tuz dozu ; ortalama sürgün uzunluğunda ise EMS dozu, tuz dozu, EMS $\times$ tuz dozu istatistiksel olarak 0.01 düzeyinde, çeşit $\times$ EMS dozu ise 0.05 düzeyinde önemli bulunmuştur (Tablo 3.15).

Tablo 3.15. Çayır üçgülü çeşitlerinde farklı EMS ve tuz dozlarının eksplant başına sürgün sayısı ve ortalama sürgün uzunluğuna etkisine ait varyans analizi

Varyasyon Kaynakları	S.D	Sürgün Sayısı		Sürgün Uzunluğu	
		KT	F Değeri	KT	F Değeri
Çeşit	1	0.050	3.085	0.021	0.971
EMS Dozu	3	2.707	56.197**	4.502	68.880**
Tuz Dozu	3	18.027	374.276**	81.120	1241.216**
Çeşit×EMS Dozu	3	0.108	2.237	0.184	2.821*
Çeşit×Tuz Dozu	3	0.257	5.342**	0.097	1.491
EMS Dozu×Tuz Dozu	9	0.987	6.832**	1.630	8.318**
Çeşit×EMS×Tuz Dozu	9	0.155	1.070	0.129	0.662
Hata	96	1.541		2.091	
Genel	127	23.830		89.776	

*0.05 düzeyinde önemli, **0.01 düzeyinde önemli

Dadaş ve Tavlaş çayır üçgülü çeşitlerinde EMS ve tuz uygulamaları sonucu elde edilen eksplant başına sürgün sayıları Tablo 3.16’te verilmiştir. EMS dozu × tuz dozu interaksyonu incelendiğinde ise en yüksek değerler %0.4 EMS uygulamasının kontrol tuz dozunda (2.28 adet) ve kontrol (2.16 adet) uygulamasından elde edilmiştir. En düşük eksplant başına sürgün sayıları ise 1 adet ile bütün EMS uygulamalarında 10 g/L tuz dozunda saptanmıştır. Tablo 3.16’da sadece EMS dozları incelendiğinde en fazla eksplant başına sürgün sayıları 1.78 ve 1.73 adet ile %0.4 ve kontrol uygulamalarından elde edilmiştir. EMS’nin %0.6 ve 0.8 uygulamalarında ise 1.48 ve 1.45 adet eksplant başına sürgün elde edilmiştir.

Çeşit × tuz dozu interaksyonu Tablo 3.17’de verilmiştir. Çeşit × tuz dozu interaksyonunda Dadaş ve Tavlaş çeşitlerinde en fazla eksplant başına sürgün sayıları sırasıyla 2.05 ve 1.97 adet ile kontrol uygulamasından elde edilirken tuz dozlarındaki artışa bağlı olarak eksplant başına sürgün sayıları düşmüştür. Dadaş çeşidinde 6 g/L tuz uygulamasında 1.75 adet, Tavlaş çeşidinde ise 1.82 adet sürgün elde edilmiştir. Tavlaş çeşidinde 8 g/L tuz uygulamasında 1.71 adet sürgün elde edilmiş ve 6 g/L tuz uygulaması ile aynı istatistiksel grupta yer almıştır.

Tablo 3.16. Çayır üçgülü çeşitlerinin farklı EMS ve tuz dozlarında eksplant başına sürgün sayıları

Sürgün Sayısı (adet)					
EMS Dozu (%)	Tuz Dozu (g/L)	Dadaş	Tavlaş	Ortalama	Ortalama EMS dozu
Kontrol	Kontrol	2.17	2.15	2.16 ^{ab}	1.73 ^a
	6	1.93	1.97	1.95 ^{bc}	
	8	1.75	1.83	1.79 ^{cd}	
	10	1.00	1.00	1.00 ^f	
0.4	Kontrol	2.43	2.13	2.28 ^a	1.78 ^a
	6	1.99	2.00	2.00 ^{bc}	
	8	1.77	1.88	1.82 ^{cd}	
	10	1.00	1.00	1.00 ^f	
0.6	Kontrol	1.78	1.87	1.83 ^{cd}	1.48 ^b
	6	1.64	1.67	1.65 ^{de}	
	8	1.31	1.56	1.43 ^e	
	10	1.00	1.00	1.00 ^f	
0.8	Kontrol	1.82	1.74	1.78 ^{cd}	1.45 ^b
	6	1.43	1.64	1.54 ^e	
	8	1.36	1.59	1.48 ^e	
	10	1.00	1.00	1.00 ^f	

Aynı sütunda farklı küçük harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark $p \leq 0.05$ düzeyinde önemlidir.

Tablo 3.17. Çayır üçgülü çeşitlerinin farklı tuz dozlarında eksplant başına sürgün sayıları

Tuz Dozu (g/L)	Sürgün Sayısı (adet)		
	Dadaş	Tavlaş	Ortalama
Kontrol	2.05 ^{a***}	1.97 ^a	2.01 ^{a**}
6	1.75 ^b	1.82 ^b	1.78 ^b
8	1.55 ^c	1.71 ^b	1.63 ^c
10	1.00 ^d	1.00 ^d	1.00 ^d
Ortalama	1.59*	1.63	

(*) Aynı satırda ve (**) sütunda farklı küçük harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark $p \leq 0.05$ düzeyinde önemlidir.

(***) Aynı satırda ve sütunda farklı küçük harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark $p \leq 0.05$ düzeyinde önemlidir.

EMS ve tuz uygulamalarında Dadaş çeşidinde sürgün uzunlukları 0.81-3.50 cm, Tavlaş çeşidinde de ise 0.93-3.51 cm arasında değişim göstermiştir (Tablo 3.18). EMS dozu $\times$ tuz dozu interaksyonunda en yüksek sürgün uzunluğu değerleri kontrol uygulaması (EMS ve tuz uygulanmamış; 3.49 cm) ve %0.4 EMS uygulamasının (3.50 cm) kontrol tuz dozunda elde edilmiştir. Sadece tuz dozları incelendiğinde en yüksek sürgün uzunluğu değeri kontrol uygulamasında (3.31 cm) belirlenmiş ve tuz dozlarına bağlı olarak sürgün uzunluğu değerleri azalmıştır.

Çeşit × EMS dozu interaksiyonunda ise her iki çeşitte de en yüksek sürgün uzunlukları % 0.4 EMS uygulamasından elde edilmiştir (Tablo 3.19). EMS dozları incelendiğinde ise en yüksek sürgün uzunluğu değeri yine %0.4 EMS’de 2.71 cm ile tespit edilmiştir. En düşük ise 2.23 cm ile %0.8 EMS dozunda belirlenmiştir.

Tablo 3.18. Çayır üçgülü çeşitlerinin farklı EMS ve tuz dozlarında ortalama sürgün uzunlukları

Sürgün Uzunluğu (cm)				
EMS Dozu (%)	Tuz Dozu (g/L)	Dadaş	Tavlaş	Ortalama
Kontrol	Kontrol	3.49	3.49	3.49^a
	6	2.65	2.67	2.66^{de}
	8	1.97	2.17	2.07^f
	10	0.81	0.93	0.87ⁱ
0.4	Kontrol	3.50	3.51	3.50^a
	6	3.25	3.15	3.20^b
	8	2.65	2.62	2.63^{de}
	10	1.56	1.41	1.49^g
0.6	Kontrol	3.25	3.18	3.21^b
	6	2.95	2.83	2.89^{cd}
	8	2.23	2.36	2.27^f
	10	1.22	1.20	1.21^h
0.8	Kontrol	3.04	3.04	3.04^{bc}
	6	2.45	2.68	2.57^e
	8	2.07	2.26	2.17^f
	10	1.10	1.15	1.13^{hi}
Tuz dozu	Kontrol	3.31^a		
	6	2.83^b		
	8	2.29^c		
	10	1.17^d		

Aynı sütunda farklı küçük harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark $p \leq 0.05$ düzeyinde önemlidir.

Tablo 3.19. Çayır üçgülü çeşitlerinin farklı EMS dozlarında sürgün uzunlukları

EMS Dozu (%)	Sürgün Uzunluğu (cm)		
	Dadaş	Tavlaş	Ortalama
Kontrol	2.23 ^{cd**}	2.31 ^{bcd}	2.27^{c*}
0.4	2.74 ^a	2.67 ^a	2.71^a
0.6	2.41 ^b	2.39 ^{bc}	2.40^b
0.8	2.17 ^d	2.28 ^{bcd}	2.23^c
Ortalama	2.39	2.41	

(*) Aynı sütunda farklı küçük harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark $p \leq 0.05$ düzeyinde önemlidir.

(**) Aynı satırda ve sütunda farklı küçük harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark $p \leq 0.05$ düzeyinde önemlidir.

3.4.3 Yaş ve Kuru Ağırlık

Tablo 3.20 incelendiğinde sürgün oluşturan sürgün oluşturan eksplant başına yaş ağırlıkta çeşit, tuz dozu ile çeşit $\times$ EMS dozu ve EMS dozu $\times$ tuz dozu interaksyonları istatistiksel olarak 0.01, EMS dozu ise 0.05; sürgün oluşturan eksplant başına kuru ağırlıkta ise çeşit, EMS dozu, tuz dozu ile çeşit $\times$ EMS dozu ve EMS dozu $\times$ tuz dozu interaksyonları istatistiksel olarak 0.01 önemli bulunmuştur.

Tablo 3.20. Çayır üçgünlü çeşitlerinde farklı EMS ve tuz dozlarının sürgün oluşturan eksplant başına yaş ve kuru ağırlığa etkisine ait varyans analizi

Varyasyon Kaynakları	S.D	Yaş Ağırlık		Kuru Ağırlık	
		KT	F Değeri	KT	F Değeri
Çeşit	1	23186.52	19.266**	471.532	96.709**
EMS Dozu	3	11657.02	3.229*	57.206	4.417**
Tuz Dozu	3	140159.44	38.821**	420.402	32.458**
Çeşit $\times$ EMS Dozu	3	19590.73	5.426**	89.651	6.922**
Çeşit $\times$ Tuz Dozu	3	2163.09	0.599	13.130	1.014
EMS Dozu $\times$ Tuz Dozu	9	36348.23	3.356**	173.280	4.459**
Çeşit $\times$ EMS $\times$ Tuz Dozu	9	8385.49	0.774	60.741	1.563
Hata	96	115533.82		414.469	
Genel	127	357024.35		1646.412	

*0.05 düzeyinde önemli, **0.01 düzeyinde önemli

Dadaş çeşidinde EMS ve tuz uygulamaları sonucunda elde edilen eksplant başına yaş ağırlık değerleri 34.75-187.40 mg, Tavlaş çeşidinde ise 25-170.95 mg arasında değişim göstermiştir (Tablo 3.21). EMS dozu $\times$ tuz dozu interaksyonunda Tablo 3.21’de incelendiğinde en yüksek yağ ağırlık 176.87 mg ile kontrol uygulamasında belirlenmiş ancak %0.4 EMS, %0.6 EMS ve %0.8 EMS uygulamalarının kontrol tuz dozları ile %0.4 EMS’nin 6 g/L tuz dozu ve EMS uygulanmayan grupta 6 g/L tuz dozu aynı istatistiksel grupta yer almıştır. En düşük değerler tüm EMS uygulamalarında 10 g/L tuz dozunda saptanmıştır. Tuz dozları ayrı olarak incelendiğinde kontrol grubunda yaş ağırlık 150.56 mg iken artan tuz dozlarına bağlı olarak düşüş göstermiş ve 10 g/L tuz dozunda 60.59 mg olarak tespit edilmiştir.

Çeşit $\times$ EMS dozu interaksyonunda Dadaş çeşidinde eksplant başına elde edilen yaş ağırlıklar bakımından istatistiksel olarak farklılık bulunmamıştır. Ancak Tavlaş çeşidinde kontrol ve %0.4 EMS uygulaması aynı istatistiksel grupta yer almış ve %0.6 ve 0.8 EMS dozunda bu uygulamalara göre yaş ağırlıklar düşüş göstermiştir (Tablo 3.22). EMS dozları tek başına incelendiğinde ise 122.83 mg ile %0.4 EMS’de en yüksek

yaş ağırlık değeri elde edilmiş olup, en düşük yaş ağırlık değeri ise 96.02 mg ile %0.8 EMS uygulamasında belirlenmiştir.

Tablo 3.21. Çayır üçgülü çeşitlerinin farklı EMS ve tuz dozlarında sürgün oluşturan eksplant başına yaş ağırlıkları

EMS Dozu (%)	Tuz Dozu (g/L)	Yaş Ağırlık		Ortalama
		Dadaş	Tavlaş	
Kontrol	Kontrol	187.40	166.33	176.87^a
	6	136.58	160.49	148.53^{abc}
	8	59.54	87.79	73.67^{efg}
	10	34.75	25.00	29.88^g
0.4	Kontrol	153.86	170.95	162.41^{ab}
	6	145.98	124.73	135.36^{a-d}
	8	135.19	108.43	121.81^{a-e}
	10	81.84	61.67	71.75^{efg}
0.6	Kontrol	167.06	104.21	135.64^{a-d}
	6	107.47	95.67	101.57^{b-f}
	8	130.96	83.73	107.35^{b-f}
	10	107.20	61.08	84.14^{d-g}
0.8	Kontrol	167.71	86.98	127.34^{a-e}
	6	131.65	84.20	107.93^{b-f}
	8	123.23	61.26	92.25^{c-f}
	10	77.98	35.18	56.78^{fg}
Tuz dozu	Kontrol	150.56^a		
	6	123.35^b		
	8	98.77^c		
	10	60.59^d		

Aynı sütunda farklı küçük harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark $p \leq 0.05$ düzeyinde önemlidir.

Tablo 3.22. Çayır üçgülü çeşitlerinin farklı EMS dozlarında sürgün oluşturan eksplant başına yaş ağırlıkları

EMS Dozu (%)	Yaş Ağırlık (mg)		Ortalama
	Dadaş	Tavlaş	
Kontrol	104.57 ^{abc***}	109.90 ^{ab}	107.23^{ab**}
0.4	129.22 ^a	116.45 ^{ab}	122.83^a
0.6	128.17 ^a	86.17 ^{bc}	107.17^{ab}
0.8	125.14 ^a	66.90 ^c	96.02^b
Ortalama	121.78^{a*}	94.86^b	

(*) Aynı satırda ve (**) sütunda farklı küçük harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark $p \leq 0.05$ düzeyinde önemlidir.

(***) Aynı satırda ve sütunda farklı küçük harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark $p \leq 0.05$ düzeyinde önemlidir.

Farklı EMS ve tuz uygulamaları sonucunda Dadaş ve Tavlaş çayır üçgülü çeşitlerinde sürgün oluşturan eksplant başına kuru ağırlık değerleri sırasıyla 4.137-15.422 mg ve 1.450-11.070 mg arasında değişim göstermiştir (Tablo 3.23). EMS dozu $\times$ tuz dozu

interaksiyonunda en yüksek eksplant başına kuru ağırlık değerleri kontrol uygulamasından (12.109 mg) elde edilmiş olup, kontrol uygulaması ile kontrol EMS+6 g/L tuz dozu, %0.4 EMS+kontrol ve %0.4 EMS+6 g/L tuz dozu, %0.6 EMS'nin kontrol tuz dozlarından elde edilen değerler aynı istatistiksel grupta yer almıştır. Tuz dozlarında ise en yüksek kuru ağırlık değeri 10.037 mg ile kontrol uygulamasında, en düşük ise 4.972 ile 10 g/L tuz dozunda saptanmıştır.

Tablo 3.24.'de çeşit × EMS dozu interaksiyonunda Dadaş çeşidinde EMS uygulamaları sonucunda elde edilen kuru ağırlıklar arasında istatistiksel bir farklılık oluşmamıştır (9.066-9.913 mg). Ancak Tavlaş çeşidinde en yüksek eksplant başına kuru ağırlık değeri 7.951 mg %0.4 EMS uygulamasında saptanmıştır (Tablo 3.24). EMS dozları incelendiğinde en yüksek kuru ağırlık değeri %0.4 EMS'de 8.508 mg olarak belirlenmiş ancak kontrol ve %0.6 EMS (sırasıyla 7.535 ve 8.002 mg) ile aynı istatistiksel grupta yer almıştır.

Tablo 3.23. Çayır üçgülü çeşitlerinin farklı EMS ve tuz dozlarında sürgün oluşturan eksplant başına kuru ağırlıkları

Kuru Ağırlık (mg)				
EMS Dozu (%)	Tuz Dozu (g/L)	Dadaş	Tavlaş	Ortalama
Kontrol	Kontrol	15.422	8.464	12.109^a
	6	9.520	7.787	8.654^{a-d}
	8	8.092	5.053	6.573^{cde}
	10	4.137	1.475	2.806^f
0.4	Kontrol	10.591	11.070	10.830^{ab}
	6	9.856	8.899	9.242^{abc}
	8	9.421	7.477	8.449^{bcd}
	10	6.666	4.359	5.512^{def}
0.6	Kontrol	11.682	7.805	9.734^{abc}
	6	7.869	5.973	6.921^{cde}
	8	10.064	5.598	7.831^{bcd}
	10	10.039	4.986	7.513^{b-e}
0.8	Kontrol	9.498	5.432	7.451^{b-e}
	6	10.873	4.817	7.845^{bcd}
	8	11.392	3.407	7.400^{b-e}
	10	6.665	1.450	4.057^{ef}
Tuz dozu	Kontrol	10.037^a		
	6	8.165^b		
	8	7.563^b		
	10	4.972^c		

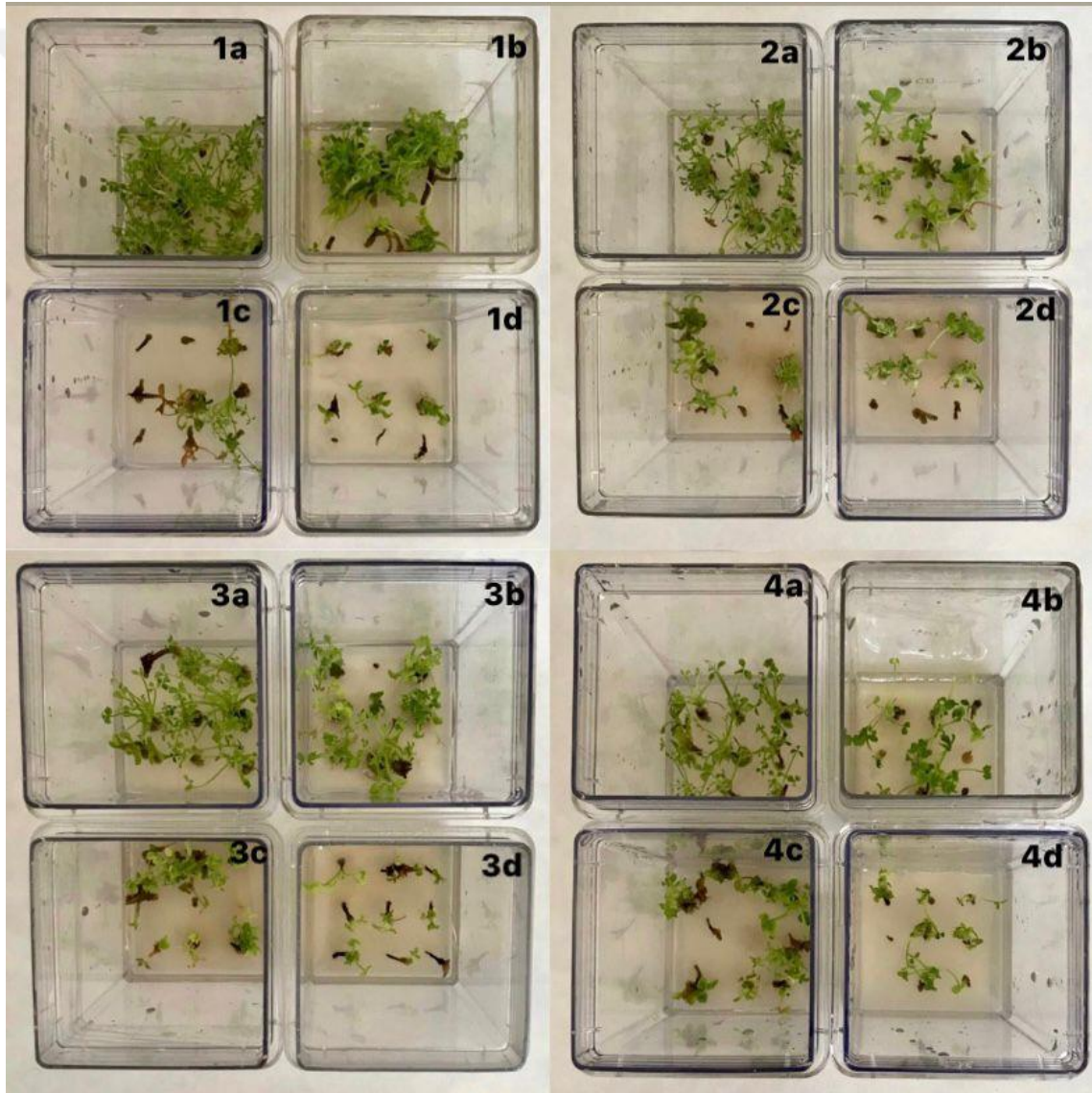
Aynı sütunda farklı küçük harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark $p \leq 0.05$ düzeyinde önemlidir.

Tablo 3.24. Çayır üçgülü çeşitlerinin farklı EMS dozlarında sürgün oluşturan eksplant başına kuru ağırlıkları

EMS Dozu (%)	Kuru Ağırlık (mg)		Ortalama
	Dadaş	Tavlaş	
Kontrol	9.376 ^{a***}	5.695 ^{bc}	7.535 ^{ab**}
0.4	9.066 ^a	7.951 ^{ab}	8.508 ^a
0.6	9.913 ^a	6.090 ^b	8.002 ^{ab}
0.8	9.607 ^a	3.776 ^c	6.691 ^b
Ortalama	9.490 ^{a*}	5.878 ^b	

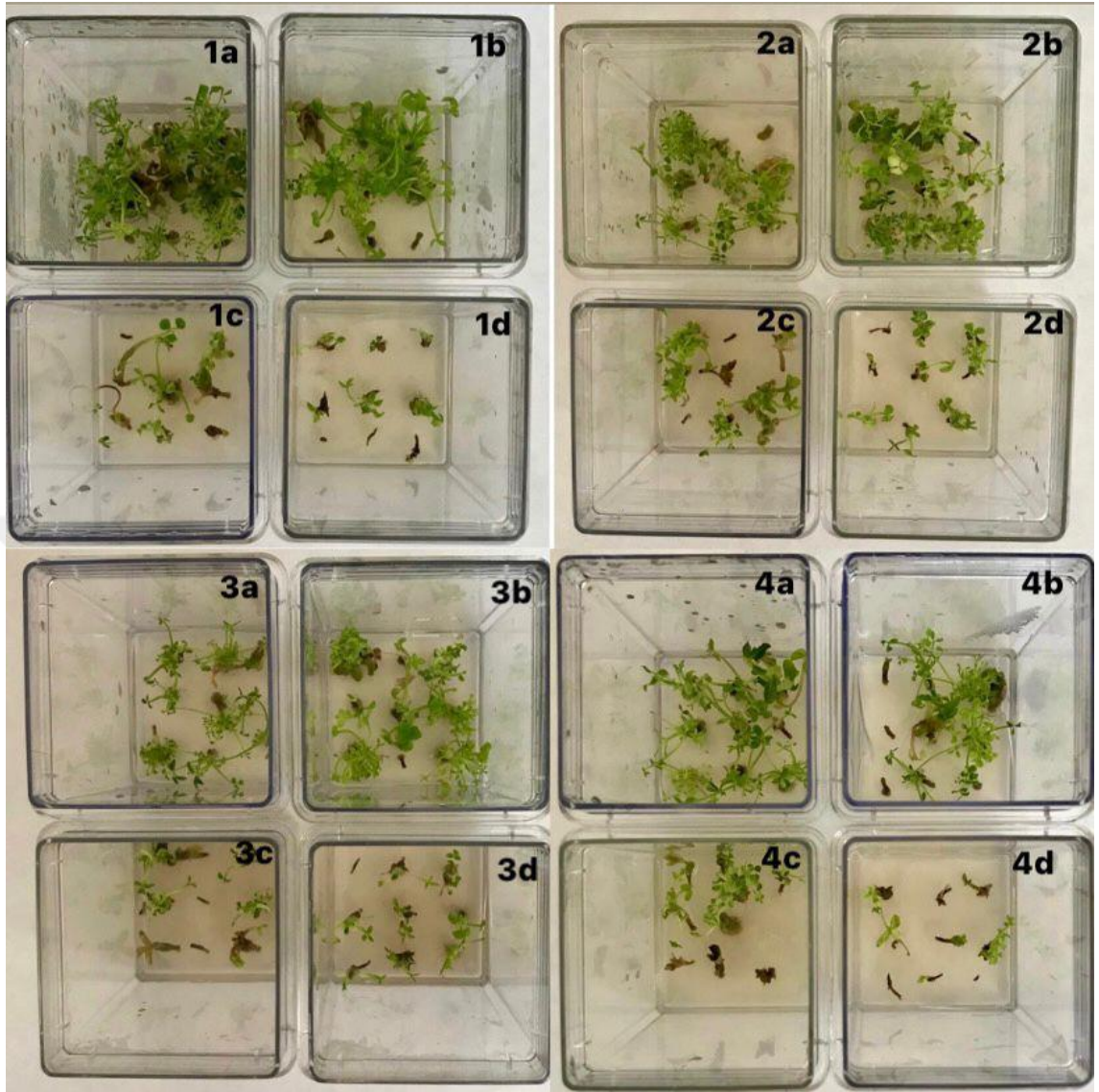
(*) Aynı satırda ve (**) sütunda farklı küçük harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark $p \leq 0.05$ düzeyinde önemlidir.

(***) Aynı satırda ve sütunda farklı küçük harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark $p \leq 0.05$ düzeyinde önemlidir.



Şekil 3.3. Dadaş çeşidinde farklı EMS ve Tuz dozlarında gelişen eksplantlar

1, 2, 3 ve 4 : Sırasıyla; Kontrol, %0.4 EMS, %0.6 EMS ve %0.8 EMS
a, b, c ve d : Sırasıyla; Kontrol, 6 g/l NaCl, 8 g/l NaCl ve 10 g/l NaCl



Şekil 3.4. Tavlaş çeşidine farklı EMS ve Tuz dozlarında gelişen eksplantlar
1, 2, 3 ve 4 : Sırasıyla; Kontrol, %0.4 EMS, %0.6 EMS ve %0.8 EMS
a, b, c de d : Sırasıyla; Kontrol, 6 g/l NaCl, 8 g/l NaCl ve 10 g/l NaCl

3.4.4. Klorofil a ve Klorofil b

Dadaş ve Tavlaş çayır üçgülü çeşitlerinde EMS ve tuz uygulamaları sonucu elde edilen varyans analizi tablosu incelendiğinde Klorofil a ve Klorofil b’de EMS dozu ve tuz dozlarının istatistiksel olarak 0.01 düzeyinde önemli olduğu saptanmıştır (Tablo 3.25).

Tablo 3.25. Çayır üçgülü çeşitlerinde farklı EMS ve tuz dozlarının klorofil a ve klorofil b üzerine etkisine ait varyans analizi

Varyasyon Kaynakları	S.D	Klorofil a		Klorofil b	
		KT	F Değeri	KT	F Değeri
Çeşit	1	9238.33	1.891	741.224	1.119
EMS Dozu	3	174203.39	11.886**	22587.857	11.371**
Tuz Dozu	3	214766.27	14.654**	27705.922	13.947**
Çeşit × EMS Dozu	3	20106.30	1.372	2982.414	1.501
Çeşit × Tuz Dozu	3	7511.75	0.513	1748.718	0.880
EMS Dozu × Tuz Dozu	9	74174.92	1.687	8022.643	1.346
Çeşit × EMS × Tuz Dozu	9	54662.41	1.243	7677.098	1.288
Hata	96	468988.2		63566.88	
Genel	127	1023651.6		135032.76	

****0.01 düzeyinde önemli**

Klorofil a bakımından Dadaş çeşidinde değerler 122.68-464.42 µg/g arasında, Tavlaş çeşidinde ise 144.37-334.10 µg/g arasında değişim göstermiştir (Tablo 3.26). EMS dozları incelendiğinde en yüksek klorofil a değeri 284.34 µg/g ile kontrol uygulamasında elde edilmiş ve 264.67 µg/g ile %0.4 EMS dozu ile aynı istatistiksel grupta yer almıştır. En düşük klorofil a değeri ise 189.93 µg/g ile %0.8 EMS dozunda belirlenmiştir. Tuz dozlarında ise en yüksek klorofil a miktarı 300.21 µg/g ile kontrol uygulamasında en düşük ise 188.38 µg/g ile 10 g/L tuz dozunda elde edilmiştir. Klorofil b miktarında da benzer sonuçlar elde edilmiş olup, en yüksek klorofil b miktarı 137.49 µg/g ve 134. 21 µg/g ile kontrol ve %0.4 EMS uygulamalarında belirlenmiştir. Tuz dozlarında ise en yüksek klorofil b miktarı 145.23 µg/g ile kontrol uygulamasında, en düşük ise 105.49 µg/g ile 10 g/L tuz uygulamasında saptanmıştır.

Tablo 3.26. Çayır üçgülü çeşitlerinin farklı EMS ve tuz dozlarında klorofil a ve b miktarları

Klorofil a (μg klorofil/g doku)				
EMS Dozu (%)	Tuz Dozu (g/L)	Dadaş	Tavlaş	Ortalama EMS dozu
Kontrol	Kontrol	464.42	334.10	284.34^{a*}
	6	318.42	296.54	
	8	195.39	270.08	
	10	206.46	189.36	
0.4	Kontrol	279.70	307.61	264.67^{ab}
	6	246.27	302.74	
	8	242.61	270.69	
	10	242.32	225.46	
0.6	Kontrol	286.30	278.58	220.99^{bc}
	6	244.06	195.34	
	8	206.92	180.29	
	10	194.37	182.05	
0.8	Kontrol	251.24	199.72	189.93^c
	6	230.51	162.46	
	8	244.01	164.43	
	10	122.68	144.37	
Tuz dozu	Kontrol	300.21^{a*}		
	6	249.54^b		
	8	221.80^{bc}		
	10	188.38^c		
Klorofil b (μg klorofil/g doku)				Ortalama EMS dozu
Kontrol	Kontrol	201.29	151.74	137.49^{a*}
	6	140.64	144.70	
	8	106.74	128.29	
	10	116.85	109.67	
0.4	Kontrol	140.08	146.35	134.21^a
	6	129.27	150.04	
	8	124.75	132.92	
	10	127.04	123.21	
0.6	Kontrol	131.96	142.07	115.23^b
	6	117.74	115.27	
	8	111.76	98.51	
	10	101.05	103.46	
0.8	Kontrol	142.56	105.79	105.39^b
	6	117.96	92.80	
	8	123.00	98.42	
	10	75.09	87.55	
Tuz dozu	Kontrol	145.23^{a*}		
	6	126.05^b		
	8	115.55^{bc}		
	10	105.49^c		

(*) Aynı sütunda farklı küçük harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark $p \leq 0.05$ düzeyinde önemlidir.

3.4.5. Toplam Klorofil

Varyans analizi sonuçlarına göre Dadaş ve Tavlaş çeşitlerinde farklı EMS ve tuz dozu uygulamaları sonucunda toplam klorofil miktarı üzerine EMS dozu ve tuz dozlarının etkisi istatistiksel olarak 0.01 düzeyinde önemli bulunmuştur (Tablo 3.27).

Tablo 3.27. Çayır üçgülü çeşitlerinde farklı EMS ve tuz dozlarının toplam klorofil miktarı üzerine etkisine ait varyans analizi

Varyasyon Kaynakları	S.D	Toplam Klorofil	
		KT	F Değeri
Çeşit	1	5199.29	2.039
EMS Dozu	3	89941.09	11.757**
Tuz Dozu	3	115065.66	15.042**
Çeşit × EMS Dozu	3	11244.07	1.470
Çeşit × Tuz Dozu	3	4117.39	0.538
EMS Dozu × Tuz Dozu	9	36731.80	1.601
Çeşit × EMS Dozu × Tuz Dozu	9	30481.38	1.328
Hata	96	244795.01	
Genel	127	537575.70	

****0.01 düzeyinde önemli**

EMS uygulamalarının genel ortalamaları incelendiğinde en yüksek toplam klorofil miktarı 235.17 µg/g ile kontrol uygulamasından elde edilmiş olup, 225.25 µg/g ile %0.4 EMS uygulaması ile aynı istatistiksel grupta yer almıştır (Tablo 3.28). En düşük toplam klorofil miktarı ise 169.26 µg/g ile %0.8 EMS uygulamasında belirlenmiş ve 190.42 µg/g ile %0.6 EMS uygulaması ile aynı istatistiksel grupta yer almıştır. Tuz dozlarında ise en yüksek toplam klorofil miktarı 249.44 µg/g ile kontrol uygulamasında, en düşük ise 167.67 µg/g ile 10 g/L tuz uygulamasında saptanış bu değer 191. 42 µg/g ile 8 g/L tuz uygulaması ile aynı istatistiksel grupta yer almıştır.

Tablo 3.28. Çayır üçgülü çeşitlerinin farklı EMS ve tuz dozlarında toplam klorofil miktarları

Toplam Klorofil (μg klorofil/g doku)				
EMS Dozu (%)	Tuz Dozu (g/L)	Dadaş	Tavlaş	Ortalama EMS dozu
Kontrol	Kontrol	365.67	269.05	235.17^{a*}
	6	252.98	247.47	
	8	172.91	222.36	
	10	194.12	156.84	
0.4	Kontrol	236.52	253.46	225.25^a
	6	213.39	254.64	
	8	207.97	226.61	
	10	209.82	199.56	
0.6	Kontrol	232.22	237.78	190.42^b
	6	202.50	177.16	
	8	182.01	159.56	
	10	167.57	164.57	
0.8	Kontrol	226.93	173.88	169.26^b
	6	197.10	147.27	
	8	207.03	152.94	
	10	113.62	135.26	
Tuz dozu	Kontrol	249.44^{a*}		
	6	211.56^b		
	8	191.42^{bc}		
	10	167.67^c		

(*) Aynı sütunda farklı küçük harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark $p \leq 0.05$ düzeyinde önemlidir.

3.4.6. İyon Sızıntısı

Dadaş ve Tavlaş çayır üçgülü çeşitlerinde farklı EMS ve tuz dozlarının iyon sızıntısı miktarı üzerine etkisini belirlemek amacıyla yapılan varyans analizi sonucunda çeşitlerin etkisi 0.05, EMS ve tuz dozlarının etkisi ise 0.01 düzeyinde istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (Tablo 3.29). Dadaş çeşidinde iyon sızıntısı miktarları %33.33-65.79, Tavlaş çeşidinde ise %30.97-68.36 arasında değişim göstermiştir (Tablo 3.30). EMS uygulamalarında en yüksek iyon sızıntısı miktarı %51.61 ile %0.8 EMS dozunda elde edilmiş ve %48.64 ile %0.6 EMS dozu ile aynı istatistiksel grupta yer almıştır. Tuz dozları incelendiğinde ise en yüksek iyon sızıntısı miktarı %61.75 ile 10 g/L tuz uygulamasından elde edilmiş tuz dozları azaldıkça iyon sızıntısı miktarlarında önemli seviyede bir düşüş saptanmıştır. Çeşitler de Dadaş'ta ortalama %48.52, Tavlaş'ta ise %46.49 iyon sızıntısı miktarı belirlenmiştir.

Tablo 3.29. Çayır üçgülü çeşitlerinde farklı EMS ve tuz dozlarının iyon sızıntısı miktarı üzerine etkisine ait varyans analizi

Varyasyon Kaynakları	S.D	İyon Sızıntısı	
		KT	F Değeri
Çeşit	1	131.407	4.480*
EMS Dozu	3	1063.092	12.079**
Tuz Dozu	3	14045.459	159.596**
Çeşit × EMS Dozu	3	47.033	0.534
Çeşit × Tuz Dozu	3	8.860	0.101
EMS Dozu × Tuz Dozu	9	223.782	0.848
Çeşit × EMS Dozu × Tuz Dozu	9	105.346	0.399
Hata	96	2816.196	
Genel	127	18441.175	

*0.05 düzeyinde önemli, **0.01 düzeyinde önemli

Tablo 3.30. Çayır üçgülü çeşitlerinin farklı EMS ve tuz dozlarında iyon sızıntısı miktarları

İyon sızıntısı (%)				
EMS Dozu (%)	Tuz Dozu (g/L)	Dadaş	Tavlaş	Ortalama EMS dozu
Kontrol	Kontrol	33.33	31.74	45.71^{bc*}
	6	41.75	38.62	
	8	51.33	49.99	
	10	61.39	57.52	
0.4	Kontrol	35.10	30.97	44.06^c
	6	37.89	37.21	
	8	51.07	48.50	
	10	59.01	52.74	
0.6	Kontrol	37.10	35.97	48.64^{ab}
	6	42.06	39.98	
	8	53.81	50.87	
	10	65.79	63.81	
0.8	Kontrol	37.80	34.72	51.61^a
	6	46.67	43.78	
	8	56.80	59.40	
	10	65.36	68.36	
Çeşitler Ortalama		48.52^{b**}	46.49^a	
Tuz dozu	Kontrol	34.59^{d*}		
	6	40.99^c		
	8	52.69^b		
	10	61.75^a		

(*) Aynı sütunda farklı küçük harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark $p \leq 0.05$ düzeyinde önemlidir.

(**) Aynı satırda farklı küçük harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark $p \leq 0.05$ düzeyinde önemlidir.

4. BÖLÜM

TARTIŞMA-SONUÇ ve ÖNERİLER

Çayır üçgülü hayvanların beslenmesi için önemli bir baklagil yem bitkisidir. Çayır üçgülü gibi baklagil yem bitkileri çayır ve meralarda buğdaygil yem bitkileri ile birlikte yer almaktadır. Ancak buğdaygillere göre tuza daha hassastırlar (Rogers, 1997). Mutagenler bitkilerde varyasyon yaratmak amacıyla bitki ıslahında kullanılmaktadır. Mutasyon ıslahı çalışmalarında doku kültürü teknikleri genetik varyasyonun uyarılması ve seçilmesi için birçok bitki türünde başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (Nikam vd., 2014; Bolivar-Gonzales vd., 2018; Abdelnour-Esquivel vd., 2020). Bu nedenle bu çalışma kapsamında çayır üçgülünde farklı in vitro mutagen uygulamalarının tuz toleransına etkileri incelenmiştir.

Çalışma kapsamında öncelikle Dadaş ve Tavlaş çayır üçgülü çeşitlerinin rejenerasyon potansiyelleri incelenmiştir. Bu amaçla iki çeşide ait kotiledon boğumlar TDZ, BAP ve NAA'nın farklı kombinasyon ve konsantrasyonlarını içeren ortamlarda kültüre alınmıştır. Sürgün oluşturan eksplant yüzdesinde çeşitler ve ortamlar istatistiksel olarak 0.01 düzeyinde önemli bulunmuştur. Dadaş çeşidinde rejenerasyon %73.60, Tavlaş çeşidinde ise %80.86 olarak belirlenmiştir. Benzer şekilde Çöçü vd. (2003) yaygın fiğ çeşitleri, Uzun ve Yükselgüngör (2020) ise *Onobrychis* türleri arasında rejenerasyon frekansı bakımından önemli farklılıklar elde etmişlerdir. İn vitro rejenerasyon çalışmalarında rejenerasyonu etkileyen faktörlerden bir tanesi de ortamda bulunan oksin ve sitokininlerdir (Adlinge vd., 2014; Kumari vd., 2021). Çayır üçgülü çeşitleri ile yürütülen bu çalışma da sitokinin ve oksin konsantrasyon ve kombinasyonlarının sürgün oluşturan eksplant yüzdesi, eksplant başına sürgün sayısı ve ortalama sürgün uzunluğuna etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. En yüksek sürgün rejenerasyonu sırasıyla %100, 94.44 ve 91.66 ile 0.5, 0.25 ve 1 mg/L TDZ içeren ortamlardan elde edilmiştir. Ortamda TDZ'nin NAA ile kombinasyonları sürgün

rejenerasyonunun azalmasına neden olmuştur. Ayrıca eksplant başına sürgün sayısı ve ortalama sürgün uzunluğunda 1 mg/L'nin üzerinde TDZ uygulaması olumsuz etkide bulunmuştur. Yıldız vd. (2006), benzer şekilde keten bitkisi üzerinde in vitro ortamda hipokotil eksplantlarını kullanarak yapmış oldukları çalışmada TDZ hormonunun sürgün rejenerasyonu için tek başına kullanılmasının yeterli olduğu ve artan TDZ dozlarında sürgün rejenerasyonunun olumsuz yönde etkilendiğini saptamışlardır. TDZ birçok bitki türü ve baklagillerde in vitro rejenerasyon sistemlerinde başarıyla kullanılmaktadır (Erişen vd., 2011; Kumari vd., 2018; Uzun ve Yükselgüngör, 2020, Kumari vd., 2021). Ancak doğru kullanılmadığında morfolojik anormallik, morfogenik yetenek kaybı, sürgün proliferasyonu ve sürgün uzamasının engellenmesi, sürgün ucu nekrozu, camsılaşma, albinizm ve DNA polimorfizmi gibi sitogenetik varyasyonlar ve köklenme yeteneğinin kaybı gibi farklı etkilerde gösterebilmektedir (Dewir vd., 2018). Dewir vd. (2018) TDZ'nin uygun ve optimal konsantrasyonunun türe özgü olduğunu, düşük konsantrasyonlarda kullanılması, kısa maruz kalma süreleri gibi uygulamaların TDZ'nin neden olduğu anormallikleri önlemek için etkili stratejiler olduğunu bildirmektedir. Sürgün oluşturan eksplant yüzdesi, eksplant başına sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu değerleri birlikte incelendiğinde farklı sitokinin ve oksin konsantrasyon ve kombinasyonlarında en yüksek değerler 0.25 ve 0.5 mg/L TDZ içeren MS besin ortamlarında elde edilmiştir. Elde edilen sürgünlerde en yüksek köklenme yüzdesi ve kök uzunluğu değerlerine 0.5 mg/L IBA veya 0.5 mg/l IAA uygulamalarında ulaşılmıştır.

Kimyasal mutagenler içerisinde EMS mutagenik etkinliği, nispeten düşük maliyeti ve yüksek kullanılabilirlik oranıyla sıklıkla kullanılmaktadır (Melsen vd. 2021). Mutasyon ıslahında ilk aşama uygun mutasyon dozunun çalışılan çeşitler için belirlenmesidir (Hadebe vd., 2017). Daha önce çayır üçgülünde EMS uygulamaları ile ilgili çalışmalara rastlanmadığı için yonca ve korungada Wijekoon vd. (2019) tarafından yürütülen çalışma değerlendirilerek 6 saat ön ıslatma ve 6 saat uygulama süresi kullanılarak %0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1 ve 1.2 EMS dozları denenmiştir. Uygulanan dozların çimlenme yüzdesi, sürgün yaş ve kuru ağırlığı ile fide yaş ve kuru ağırlığına etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. EMS dozlarına bağlı olarak çimlenme yüzdesi ve fide büyüme karakterlerinde önemli düşüşler belirlenmiştir. Benzer şekilde EMS uygulamalarına bağlı olarak tohum çimlenme ve fide büyümesindeki düşüşler buğday (Ndou vd., 2013),

kasava (Kangarasu vd., 2014), yerfıstığı (Chen vd., 2020) ve soğanda da (Singh vd., 2021) bildirilmektedir. Mutant bireylerde negatif değışikliklerin sıklığı artan radyasyon dozları ile arttığından, mutasyonların indüklenmesi için medyan öldürücü dozun (LD50) belirlenmesi de önemlidir. LD50, maruz kalan popülasyonun %50'sinin öldüğü veya azalmış büyüme gösterdiği doza karşılık gelir. Bu oran faydalı mutasyonların ortaya çıkmasını destekleyen aralık olarak kabul edilir (Bolivar-Gonzales vd., 2018; Abdelnour-Esquivel vd., 2020). Bu çalışmada çimlenme yüzdesinde LD50 değeri Dadaş çeşidinde %0.40-0.60 EMS, Tavlaş çeşidinde ise %0.8-1 EMS aralığında ulaşılmıştır. Sürgün uzunluğu ve fide kuru ağırlığındaki LD50 her iki çeşitte de %0.4-0.6 EMS doz aralığında; fide yaş ağırlık azalması dikkate alındığında ise Dadaş çeşidinde %0.6-0.8 EMS, Tavlaş çeşidinde ise %0.4-0.6 EMS doz aralığında belirlenmiştir. Bu nedenle in vitro tuz uygulamalarına %0.4, 0.6 ve 0.8 EMS dozları ile devam edilmiştir.

Mutasyon ıslahında mutantların taranması için büyük popülasyonlar gerektirmekte, ayrıca zaman alıcı ve pahalıdır (Schaart vd., 2016). In vitro kültürler ise sınırlı alan ve zaman ile kontrollü koşullar altında gerçekleştirilebildiğinden, tuza toleranslı mutantların taranması için ideal bir sistemdir (Luan vd., 2007). Farklı EMS dozlarının çayır üçgülü çeşitlerinde tuz toleransına etkilerini belirlemek amacıyla %0, 0.4, 0.6 ve 0.8 EMS uygulanan tohumlar MS besin ortamında çimlendirildikten sonra kotiledon boğumlar izole edilerek kontrol, 6, 8, ve 10 g/L NaCl içeren besin ortamında kültüre alınmıştır. Deneme sonucunda artan tuz dozlarına bağlı olarak sürgün oluşturan eksplant yüzdesi, eksplant başına sürgün sayısı, sürgün uzunluğu, yaş ağırlık ve kuru ağırlık değerleri düşüş göstermiştir. Özellikle 10 g/L tuz dozunda bu azalış daha belirgin (>%50) olarak kaydedilmiştir. Benzer şekilde mürdümük (Piwowarczyk vd., 2016), ayçiçeği (Altındal ve Altındal, 2018) ve *Pistacia* genotiplerinde de (Raoufi vd., 2021) in vitro koşullarda artan tuz dozlarına bağlı olarak büyüme parametrelerinin düştüğünü bildirilmektedir. Raoufi vd. (2021), bu azalışın nedeninin artan tuza bağlı olarak fotosentetik hızın ve hücre bölünmesinin azalmasına ve reaktif oksijen türlerinin birikmesine bağlanabileceğini ifade etmektedir. Klorofil değerleri incelendiğinde artan tuz dozlarıyla beraber Klorofil a, b ve toplam klorofil miktarında azalmalar gözlemlenmiştir. Dubey vd. (2020) ketende, tuz dozunun artmasıyla klorofil a ve klorofil b miktarının azaldığını saptamışlardır. İyon sızıntısı değerlendirildiğinde en düşük sızıntı kontrol grubu elde edilirken artan tuz miktarına bağlı olarak iyon sızıntısı

artmıştır. Oral vd. (2020) tuz dozlarına paralel olarak artan iyon sızıntısının hücre membranı ve stabilitesinde meydana gelen hasardan ileri geldiğini bildirmektedir.

EMS dozlarının in vitro rejenerasyon üzerine etkileri incelendiğinde kontrole göre yüksek EMS dozlarında (%0.6 ve 0.8) sürgün oluşturan eksplant yüzdesinde, eksplant başına sürgün sayısında, klorofil a, b ve toplam klorofil miktarlarında bir azalış meydana gelirken iyon sızıntısında bir artış meydana gelmiştir. Nasri vd. (2021)'de krizantemde artan EMS dozlarına bağlı olarak rejenerasyon oranı, sürgün sayısı ve sürgün oluşumuna kadar geçen sürede düşüş saptamışlardır. Kumar ve Kumari (2021) ise *Artemisia*'da yüksek EMS dozlarında klorofil a, b ve toplam klorofil miktarlarının azaldığını bildirmektedir.

EMS dozu $\times$ tuz dozu interaksiyonları incelendiğinde özellikle %0.4 EMS dozunda, genel olarak EMS uygulaması yapılmayan grupta 6, 8 ve 10 g/L NaCl uygulamalarından sürgün rejenerasyonu parametrelerinde daha iyi sonuçlar sergilemesi artan tuz dozlarının sebep oldukları zararı azalttığı şeklinde yorumlanabilir. Nitekim *Ipomoea batatas* (Luan vd.,2007), *Helianthus annuus* (Altındal ve Altındal, 2018) *Artemisia vulgaris* (Kumar ve Kumari, 2021), *Triticum aestivum* (Lethin vd., 2020) ve *Coffea arabica* (Bolivar-Gonzalez vd., 2021) gibi birçok bitki türünde EMS ile oluşturulmuş mutasyonun tuza dayanıklı bitkilerin geliştirilmesinde etkili olduğu ifade edilmektedir. Bu çalışma ile çayır üçgülü çeşitlerinde EMS uygulamalarının tuz stresine etkileri incelenmiş olup daha sonra yapılacak çalışmalarla mutasyon oluşturulmuş bitkiler seçilerek dış koşullara aktarılması ve tuz toleransı yönünden mutant genotiplerin değerlendirilmesi önerilmektedir.

KAYNAKLAR

- Abdelnour-Esquivel, A., Perez, J., Rojas, M., Vargas, W., Gatica-Arias, A. 2020. Use of gamma radiation to induce mutations in rice (*Oryza sativa* L.) and the selection of lines with tolerance to salinity and drought. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, 56(1): 88-97.
- Açıkgöz, E., 2001. Yem Bitkileri. Uludağ Üniversitesi Güçlendirme Vakfı, Yayın No: 182, Bursa, 584 s.
- Adlinge, P. M., Samal, K. C., Swamy, R. V. K., Rout, G. R. 2014. Rapid in vitro plant regeneration of black gram (*Vigna mungo* L. Hepper) car. Sarala, an important legume crop. **Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences**, 84 (3): 823-827.
- Akbay, G., Ünver, S. 1986. Tokat 157/37 (*Hordeum vulgare* L.) ikisıralı arpa çeşidine uygulanan farklı EMS (ethyl methane sulphonate) dozlarının M1 bitkilerinin bazı özellikleri üzerine etkileri. **Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yıllığı**, 83-94.
- Altındal, D., Altındal, N. 2018. Ayçiçeğinin (*Helianthus annuus* L. cv. Palancı-I) in vitro tuzlu koşullarda gelişimi üzerine etil metansülfonat (EMS) uygulamalarının etkisi. **Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi**, 8(4): 351 - 359.
- Aydın, A. 2018. Farklı Kabak (*Cucurbita maxima* x *C. Moschata* ve *Lagenaria sceraria*) Genotiplerinin Yüksek pH Koşullarına Karşı Toleransı ve Kavuna Anaçlık Potansiyellerinin Belirlenmesi. Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, Kayseri, 77 s.
- Bahar, B. Akkaya, M. 2009. Effects of EMS treatment on the seed germination in wheat **Journal of Applied Biological Sciences**, 3:1 5-64
- Balık, D.T., Akat, A. 2012. Mutasyonlar, pp. 102-116. In: Moleküler Biyoloji (Eds. M. Karataş) (102,116). Nobel Akademik Yayıncılık, Ankara.
- Baydar, H. 2021. Bitki Islahı ve Genetiği. Nobel Akademik Yayıncılık, Ankara, 299 s.
- Carrillo, J. C., Ojeda, V. A., Quiroz, H. A. C., Ortega, F. M. 2004. Optimization of a protocol for direct organogenesis of red clover (*Trifolium pratense* L.) meristems for breeding purposes. **Biological Research**, 37: 45-51.

- Curtis O, Shetty K. 1996. Growth medium effects on vitrification, total phenolics, chlorophyll, and water content of in vitro propagated oregano clones. **Acta Horticulturae**, **426**:498-503.
- Chao, Y., Yuan, J., Li, S., Jia, S., Han, L. Xu, L. 2018. Analysis of transcripts and splice isoforms in red clover (*Trifolium pratense* L.) by single-molecule long-read sequencing. **BMC Plant Biology**, **18**(1):1-12.
- Chen, T., Huang, L., Wang, M., Huang, Y., Zeng, R., Wang, X., Wang, L., Wan, S. Zhang, L. 2020. Ethyl methyl sulfonate-induced mutagenesis and its effects on peanut agronomic, yield and quality traits. **Agronomy**, **10**(5): 655.
- Çöçü, S., Uranbey, S., Sancak, C. 2003. Bazı yaygın fiğ (*Vicia sativa* L.) çeşitlerinde olgunlaşmamış embriyo eksplantlarından adventif sürgün rejenerasyonu. **Tarım Bilimleri Dergisi**, **9** (4): 445-449.
- Çölgeçen, H., Toker, M. C. 2008. Plant regeneration of natural tetraploid *Trifolium pratense* L. **Biological Research**, **41**:25-31.
- Dewir, Y. H., Naidoo, Y., da Silva, J. A. T. 2018. Thidiazuron-induced abnormalities in plant tissue cultures. **Plant Cell Reports**, **37**(11):1451-1470.
- Dubey, S., Bhargava, A., Fuentes, F., Shukla, S., Srivastava, S. 2020. Effect of salinity stress on yield and quality parameters in flax (*Linum usitatissimum* L.). **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, **48**(2): 954-966.
- Egan, L. M., Hofmann, R., Ghamkhar, K., Hoyos-Villegas, V. 2019. Identification of founding accessions and patterns of relatedness and inbreeding derived from historical pedigree data in a red clover Germplasm collection in New Zealand. **Crop Science**, **59**: 2100-2108.
- Erişen, S., Atalay, E., Yorgancılar, M. 2011. The effect of thidiazuron on the in vitro shoot development of endemic *Astragalus cariensis* in Turkey. **Turkish Journal Botany**, **35**(5), 521–526.
- Geren, H., Avcıoğlu, R., Kır, B. 2009. Çayır üçgülü, 353 s. In: Yem Bitkileri (Eds. R. Avcıoğlu, R. Hatipoğlu, Y. Karadağ) Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı Yayınları, İzmir.
- Güvercin, Ş. R., Eryaman, M., Borzan, G., Güvercin, A.F. 2020. Etil metan sülfonat mutageninin pamuk çeşitlerinde (*Gossypium hirsutum* L. ve *Gossypium barbadense* L.) tohum çimlenmesine etkisi. **Uluslararası Anadolu Ziraat Mühendisliği Bilimleri Dergisi**, **1**:24-29

- Hadebe, S.T., Modi, A.T., Shimelis, H.A. 2017. Determination of optimum ethylmethanesulfonate conditions for chemical mutagenesis of selected vernonia (*Centropalus pauciflorus*) accessions. **South African Journal of Plant and Soil**, **34**(4): 311-317.
- Kangarasu, S., Ganeshram, S., Joel, A. J. 2014. Determination of lethal dose for gamma rays and ethyl methane sulphonate induced mutagenesis in cassava (*Manihot esculenta* Crantz.). **International Journal of Scientific Research**, **3**(1): 3-6.
- Kendirli, B., Çakmak, B., Uçar, Y. 2005. Salinity in the southeastern anatolia project (GAP), Turkey. **Issues and Options, Irrigation and Drainage**, **54**: 115-122.
- Khursheed, S., Raina, A., Lasker, A.R., Khan, S. 2018. Effect of gamma radiation and EMS on mutation rate: their effectiveness and efficiency in faba bean (*Vicia faba* L.). **International Journal of Cytology, Cytosystematics and Cytogenetics**, **71**(4): 397-404
- Koyuncu, N. 2012. Determination of in vitro high level salinity tolerance of some durum wheat (*T. durum* Desf.) cultivars. **Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi**, **21**(2): 70-74.
- Kumar, K., Gill, M.I.S., Choudhary, O.P. Gosal, S.S. 2010. In vitro mutagenesis and somaclonal variation assisted salt tolerance in rough lemon (*Citrus jambhiri* Lush.). **Europeana Journal of Horticultural Science**, **75**(6): 233-238.
- Kumar, S.P. Kumari, B.R. 2021. Impact of ethyl methane sulphonate mutagenesis in *Artemisia vulgaris* L. under NaCl Stress. **BioTech**, **10**(18): 1-12.
- Kumari, P., Singh, S., Yadav, S., Tran, L.S.P. 2018. Pretreatment of seeds with thidiazuron delimits its negative effects on explants and promotes regeneration in chickpea (*Cicer arietinum* L.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, **133**(1): 103-114.
- Kumari, P., Singh, S., Yadav, S., Tran, L.S.P. 2021. Influence of different types of explants in chickpea regeneration using thidiazuron seed-priming. **Journal of Plant Research**, **134**: 1149-1154.
- Larcher, W.1995. Physiological Plant Ecology. Published by Springer, ISBN 0-387-09795-3, New York, 506 p.
- Lethin, J., Shakil, S. S., Hassan, S., Sirijovski, N., Töpel, M., Olsson, O., Aronsson, H. 2020. Development and characterization of an EMS-mutagenized wheat

- population and identification of salt-tolerant wheat lines. **BMC Plant Biology**, **20**(1): 1-15.
- Lu X., Liu J., Ren W., Yang Q., Chai Z., Chen R., Wang L., Zhao J., Lang Z., Wang H., Fan Y., Zhao J., Zhang C. 2018. Gene-indexed mutations in maize. **Molecular Plant**, **11**: 496–504.
- Luan, Y. S., Zhang, J., Gao, X. R., 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.
- Masoabi, M., Lloyd, J., Kossmann, J., van der Vyver, C. 2018. Ethyl methanesulfonate mutagenesis and in vitro polyethylene glycol selection for drought tolerance in sugarcane (*Saccharum* spp.). **Sugar Tech**, **20**(1): 50-59.
- Melsen, K., van de Wouw, M., Contreras, R. 2021. Mutation breeding in ornamentals. **HortScience**, **56**(10): 1154-1165.
- Munns, R. 2005. Genes and salt tolerance: bringing them together. **New Phytologist**, **167**(3): 645-663
- Murashige, T. Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiol. Plant**. **15**: 473–497
- Ndou, V. N., Shimelis, H., Odindo, A., Modi, A. T. 2013. Response of selected wheat genotypes to ethylmethanesulphonate concentration, treatment temperature and duration. **Scientific Research and Essays**, **8**(4): 189-196.
- Naeem, M., Iqbal, M., Shakeel, A., Ul-Allah, S., Hussain, M., Rehman, A., Zafar, Z.U., Athar H. Ashraf, M. 2020. Genetic basis of ion exclusion in salinity stressed wheat: Implications in improving crop yield. **Plant Growth Regulation**, **92**: 479-496.
- Nasri, F., Zakizadeh, H., Vafaei, Y., Mozafari, A.A. 2021. In vitro mutagenesis of *Chrysanthemum morifolium* cultivars using ethylmethanesulphonate (EMS) and mutation assessment by ISSR and IRAP markers. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, 1-17.
- Nikam, A. A., Devarumath, R. M., Shitole, M. G., Ghole, V. S., Tawar, P. N., Suprasanna, P. 2014. Gamma radiation, in vitro selection for salt (NaCl) tolerance, and characterization of mutants in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, **50**(6): 766-776.

- Onal-Asci, O. 2011. Salt tolerance in red clover (*Trifolium pratense* L.) seedlings. **African Journal of Biotechnology**, **10**(44): 8774-8781.
- Oral, E., Tunçtürk, R., Tunçtürk, M., Kulaz H. 2020. Silisyumun fasulyede (*Phaseolus vulgaris* L.) Tuz (NaCl) stresini azaltmada etkisi. **KSÜ Tarım ve Doğa Dergisi**, **23**(6): 1616-1625.
- Piwowarczyk, B., Tokarz, K. And Kaminska, I. 2016. Responses of grass pea seedlings to salinity stress in vitro culture conditions. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, **124**:227-240.
- Rogers, M.E. 1997. Salinity Response in Some Forage Legumes Species. Proceedings XVIII IGC 1997, Winnipeg, Manitoba. ID no: 868.
- Raoufi, A., Salehi, H., Rahemi, M., Shekafandeh, A., Khalili, S. 2021. In vitro screening: The best method for salt tolerance selection among pistachio rootstocks. **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences**, **20**(3): 146-154
- Schaart, J. G., van de Wiele, C. C., Lotz, L. A., Smulders, M.J. 2016. Opportunities for products of new plant breeding techniques. **Trends in Plant Science**, **21**(5):438-449.
- Sharavdorj, K., Jang, Y., Byambadorj, S., Cho, J. 2021. Understanding seed germination of forage crops under various salinity and temperature stress. **Journal of crop science and biotechnology**, **24**: 545-554
- Singh, K.P. Sadhukhan, R. 2019. EMS and gamma radiation induced mutation in grasspea (*Lathyrus sativus* L.). **Legume Research**, **42**(3): 300-307
- Singh, H., Verma, P., Lal, S. K., Khar, A. 2021. Optimization of EMS mutagen dose for short day onion. **Indian Journal of Horticulture**, **78**(1): 35-40.
- Snedecor, G. W., Cochran, W.G., 1967. Statistical methods, 6th edn. Ames. Iowa State College Press, IA.
- Spencer-Lopes, M. M., Forster, B. P., Jankuloski, L. 2018. *Manual on mutation breeding* (No. Ed. 3). Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO).
- Tan, M., Serin Y. 2013. Baklagil Yem Bitkileri. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ders Yayınları No: 190, 222 s.

- Tolan T., Uzun S., Kardeş MY., Orman D., Özaktan H., Uzun O. 2017. Çayır üçgülü genotiplerinde çimlenme ve fide gelişimi üzerine NaCl konsantrasyonlarının etkileri. **Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi**, 4(2): 220–226.
- Uzun, S., Yükselgüngör, D. 2020. Micropropagation of some *Onobrychis* species through in vitro shoot regeneration. **ACTA Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus**, 19 (5): 45-52.
- Vahdati, N., Tehranifar, A., Neamati, S. H., Selahvarzi, Y. 2012. Physiological and morphological responses of white clover (*Trifolium repens*) and red clover (*Trifolium pratense*) plants to salinity stress. **Journal of Ornamental and Horticultural Plants**, 2 (4): 233-241.
- Vega, J., Ayling, S., Hegarty, M., et al. 2015. Red clover (*Trifolium pratense* L.) draft genome provides a platform for trait improvement. **Scientific Reports**, 5: 17394.
- Vogel E.W., Natarajan A.T. 1995. DNA damage and repair in somatic and germ cells in vivo. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, 330(1,2):183-208.
- Wang, H., & Holl, F. B. (1988). In vitro culture and the incidence of somaclonal variation in regenerated plants of *Trifolium pratense* L. **Plant Science**, 55(2): 159-167.
- Wijekoon, P.C., Singer, D.S., Weselake, J.R., Petrie, R.J., Sinhg, S., Jayawardhane, N.K., Slah, S., Chen, G., Eastmond, J.P., and Acharya, N.S. 2019. Enhancement of total lipid production in vegetative tissues of alfafa and sainfoin using chemical mutagenesis. **Crop Science**, 60(6): 2990-3003.
- Yıldız, M., Koyuncu, N., Özgen, M. 2006. Adventitious shoot regeneration from hypocoty explants of flax (*Linum usitatissimum* L.), pp. 369–373. **Türkiye VI Tarla Bitkileri Kongresi**. 2005, Antalya.
- Zhao, M.X., Sun, H.Y., Ji, R.R., Hu, X.H., Sui, J.M., Qiao, L.X., Chen, J. Wang, J.S., 2013. In vitro mutagenesis and directed screening for salt-tolerant mutants in peanut. **Euphytica**, 193(1): 89-99.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: Onur OKUMUŞ
Uyruğu: Türkiye (T.C)

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Lisans	Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü (1 yıl hazırlık eğitimi)	2018
Lise	Tez Tur Anadolu Otelcilik ve Turizm Meslek Lisesi	2012

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görev
2020 - halen	Erciyes Üniversitesi	Araştırma Görevlisi

YABANCI DİL

İngilizce, Rusça

YAYINLAR

- Çiftçi, B., Akçura, S., Doran, T., **Okumus, O.**, Kaplam M. ve Kalamak, A. 2021. Vetiver ve soya karışım silajının fermantasyon kalitesi, besleme özellikler ile gaz-metan üretiminin değerlendirilmesi. **Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi**, 8:2 295-300.
- Okumus, O.**, Çiftçi, B., Uzun S. ve Kaplan M. 2021. Determination of quality parameters of leaves and stems of different alfalfa genotypes. **Current Trends in Natural Sciences**, 10:20 118-121.
- Çiftçi, B., **Okumus, O.**, Kaplan M. ve Uzun S. 2021. Effect on maturity stages on potential nutritive value of *Vicia cracca* hay. **Current Trends in Natural Sciences**, 10:20 43-47.