



Aspir (*Carthamus tinctorius* L.) Çeşitlerine Uygulanan Farklı Gama Işını Dozlarının *In Vitro* Adventif Sürgün Rejenerasyonu Üzerine Etkileri^A

Hümeyra YAMAN^{*1}, Nilgün BAYRAKTAR²

Öz: Çalışmada bir iyonize radyasyon kaynağı olan Cs 137 kaynağı kullanılarak aspir çeşitlerinin tohumlarına 200,300,400,500,600 Gy dozda gama ışını uygulanmıştır. Çalışmalar Tesadüf Parselleri Deneme Desenine göre 3 tekerrürlü olarak yürütülmüştür. Çalışmalarda ışınlanmamış tohumlara da aynı zamanda uygulamalar yapılmıştır. Araştırmadan elde edilen verilerle çeşitlerin ayrı ayrı varyans analizi yapılmıştır. Aspir çeşitlerinin rejenerasyon kapasitesine gama ışınlarının etkisini gözlemek için farklı doz ve kombinasyonlarda besin ortamları denenmiştir. Çeşitlere göre kullanılan besin ortamındaki hormon dozlarında farklılıklar olmuştur. Temel besin ortamı olarak Murashige ve Skoog (MS) ortamı kullanılmıştır. Denemeler sonucunda; Remzibey çeşidinde 4 mg/L TDZ ve 0.2 mg/L NAA, Dinçer çeşidinde 1 mg/L TDZ ve Shifa aspir çeşidinde ise 2 mg/L NAA ve 2 mg/L BAP içeren MS besin ortamlarında adventif sürgün rejenerasyonunun arttığı sonucuna varılmıştır. Bunun yanısıra her üç çeşitte farklı eksplant tipleri denenmiş ve en iyi sonuçları verenler sırasıyla hipokotil ve sürgün ucu eksplantları olmuştur. Çalışmada kullanılan eksplant tiplerinin verdiği cevaplar ışın dozuna ve genotipe bağlı olarak değişim göstermiştir. Kullanılan eksplant tipine göre kallus oluşumlarında yapısal değişiklikler meydana gelmiştir. Kallusların oluşumu üzerinde meydana gelen bu yapısal farklılıklar sürgün oluşumunu etkilemiştir. Bu sonuçlar canlılık değerlerine yansımıştır. Çalışmada genel anlamda direk olarak elde edilen sürgünlerden gelişen bitkiler daha hızlı sonuç vermiştir. Yapılan çalışmalardaki veriler incelendiğinde genetik çeşitlilikler ve mutagen dozlara bağlı olarak gelişen değişimler en fazla 300-400 Gy dozlarında ortaya çıkmıştır. Mutagen uygulamaların in vitro da tepkisini ölçmek amacıyla yapılan bu çalışmada

^A Yapılan bu çalışma etik kurul izni gerektirmemektedir. Makale araştırma ve yayın etiğine uygun olarak hazırlanmıştır.

^{*} **Sorumlu yazar/Corresponding Author:** ¹Hümeyra YAMAN, Tarım ve Orman Bakanlığı, Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Ankara, Türkiye. E-mail: humeyrayaman@hotmail.com, [OrcID 0000-0002-5873-9401](https://orcid.org/0000-0002-5873-9401)

² Nilgün BAYRAKTAR, Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye. E-mail: nbayrak@agri.ankara.edu.tr, [OrcID 0000-0003-0425-6305](https://orcid.org/0000-0003-0425-6305)

adventif sürgün rejenerasyonu üzerine olumlu etkiler elde edilmiştir. Bu verilerden yola çıkarak genetik varyasyonu ve somaklonal çeşitliliği ortaya çıkarmak için ıslaha yardımcı olarak doku kültürü tekniklerinden de faydalanılacağı açıkça görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Adventif sürgün rejenerasyonu, genetik çeşitlilik, hipokotil eksplantları, iyonize radyasyon, mutasyon.

Effects of Different Gamma Ray Doses on *In Vitro* Adventitious Shoot Regeneration of Safflower (*Carthamus tinctorius* L.) Cultivars

Abstract: In the study, gamma rays were applied to the seeds of safflower cultivars at a dose of 200,300,400,500,600 Gy using an ionizing radiation source, Cs 137. The studies were carried out in 3 replications according to the Random Plots Trial Design. In the studies, applications were also made to the seeds that were not irradiated. Variance analysis of the varieties was made with the data obtained from the research. In order to observe the effect of gamma rays on the regeneration capacity of safflower varieties, different doses and combinations of nutrient media were tried. There were differences in the hormone doses in the nutrient medium used according to the cultivars. Murashige and Skoog (MS) medium was used as the main nutrient medium. As a result of the trials; It was concluded that adventitious shoot regeneration increased in MS nutrient media containing 4 mg/L TDZ and 0.2 mg/L NAA in Remzibey cultivar, 1 mg/L TDZ in Dinçer cultivar, and 2 mg/L NAA and 2 mg/L BAP in Shifa safflower cultivar. In addition, different explant types were tried in all three cultivars and the best results were hypocotyl and shoot tip explants, respectively. The responses of the explant types used in the study varied depending on the radiation dose and genotype. Structural changes occurred in callus formations depending on the explant type used. These structural differences on the formation of calli affected shoot formation. These results were reflected in the vitality values. In general, the plants grown from the shoots obtained directly in the study gave faster results. When the data in the studies were examined, the changes due to genetic variations and mutagen doses emerged at doses of 300-400 Gy at most. In this study, which was carried out to measure the response of mutagen applications in vitro, positive effects on adventitious shoot regeneration were obtained. Based on these data, it has been clearly seen that tissue culture techniques will also be used as an aid to breeding in order to reveal genetic variation and somaclonal diversity.

Keywords: Adventitious shoot regeneration, genetic diversity, hipokotil explants, ionize radiation, mutation.

Giriş

Aspir (*Carthamus tinctorius* L.), ayçiçeği gibi Compositae / Asteraceae familyasının bir üyesi olup, tek yıllık yağlı tohumlu en eski kültür bitkilerinden birisidir. Ayrıca dünyada 25 kadar türü olduğu bildirilmektedir (Arslan ve ark., 2010). Dünyada Asya ve Akdeniz havzasına özgü, kurak ve yarı kurak bölgelerde yetişen bir tür olup geniş bir adaptasyon yeteneğine sahiptir (Köse ve ark., 2016).

Dünyada 60'ın üzerinde ülkede aspir tarımı yapılmaktadır. En fazla üretildiği ülkeler arasında Kazakistan, ABD ve Rusya Federasyonu gelmektedir (FAOSTAT, 2021).

Aspir (*Carthamus tinctorius*) bitkisi, farklı amaçlar için kullanılan değerli agronomik bir türdür. Tohumları kuş ve hayvan yemi olarak, tohum yağı alfatokoferol içeren gıdalarda, çiçekleri arıların bal üretmesinde, çiçeklerinde bulunan kırmızı ve sarı pigmentleri gıda renklendiricisi olarak, hasat sonrası slajı hayvan yemi olarak ve içeriğindeki etken maddeleri ise halk hekimliğinde kullanılır (Ivanova ve Smerea, 2018). Tohumundan elde edilen aspir yağ birleşiminde iki ana doymamış yağ asidi olan oleik ve linoleik asitler toplam yağın %90'nını oluştururken, kalan %10 ise palmitik ve stearik asit gibi doymuş yağ asitlerine karşılık gelir (Anjani ve Yadav, 2017). Bu durumda aspir yağı hem omega-9 bakımından hem de omega-6 bakımından zengin olduğu için yağı kaliteli bir yemeklik yağ olarak kullanılabilir. Yetiştirilen çeşitler kaliteli yağ kaynağı olarak kullanılmasının yanında aspir çeşitleri ve özellikleri hakkında bilgi eksikliği olduğu için çeşit geliştirme çok önemli ve güncel bir konudur (Smerea ve ark., 2018).

Ülkemizde çok sınırlı bir alanda üretimi yapılan bu bitkide varolan çeşitlerin soğuğa ve kurağa yeterli derecede toleranslı olmamaları nedeniyle üretimi sınırlı kalmaktadır (Polat, 2007). Son yıllarda, yağlı tohumlu bitkilere olan talep büyük oranda artmış olup bu talebi karşılayabilmek için hem yağlı tohum hem de ham yağ ithalatı yanında mevcut üretimi de arttırmak gerekir. Ekim alanlarının artışı ile üretim artabileceği gibi kültürel tekniklerin iyileştirilmesi ve yüksek verimli çeşitlerin ekilmesiyle verim artışı sağlanabilir. Daha fazla verim artışı için ıslah çalışmalarında ana hedef ıslaha yardımcı prosesleri geliştirmek olmalıdır (Şanver ve Göksoy, 2019).

Bu amaçlarla ıslahın bir dalı olan mutasyon ıslahından yararlanma fikri ortaya çıkmıştır. Mutasyon ıslahında kültür bitkilerine istenilen özelliklerin kazandırılmasında kalıtsal yapıda ani değişimler (mutasyon) yapacak yöntemlerin kullanılmasıyla kısa zamanda yeni varyasyonlar oluşturulabilmektedir. Çeşitli mutasyon oluşturuvcu etkenler (mutagenler) bitkilerin kromozomlarının yapı ve sayılarında ya da genlerinin fiziksel ve kimyasal yapılarında ani olarak bir takım kalıtsal değişimler yaparak onlara olumlu ya da olumsuz yeni özellikler kazandırabilmektedir. Aspir bitkisinde amaç yağ verimi yüksek soğuğa kurağa toleranslı çeşitleri geliştirmektir. İn vitro teknolojilerin kullanılması bitkilerin genetik çeşitliliğini arttırmada etkili prosedürlerden biridir (Smerea ve ark., 2018). Doku kültürü yöntemleri ile laboratuvar ortamında zamandan tasarruf ederek, kolay bir şekilde yapılacak çalışmalarla ıslah süresinin kısaltılması sağlanabilmektedir. Bu nedenle mutasyon ıslahı ve seleksiyon çalışmalarında bitki doku kültürleri önemli bir yer almaktadır. Doku kültürü teknikleri ile mutagen uygulamaların bir arada kullanılması klasik ıslah metodlarından daha kısa sürede ve daha küçük bir alanda istenilen karakterlerin gelişimini desteklemektedir (Afrasiab ve Javed, 2010). Hem genetik çeşitlilik hem de

somaklonal varyasyonun sağlanması açısından da oldukça önemlidir. Mutasyon ıslahı çalışmalarında anter, protoplast, kallus ve süspansiyon kültürleri kullanılarak doku kültürü çalışmaları yapılmaktadır. Mutasyon kaynakları kullanılarak doku kültürü çalışmalarında in vitro sürgün rejenerasyonu ve mutant rejenerantlarda meydana gelen değişiklikler üzerine birçok uygulama yapılmıştır. Örneğin, bazı araştırmacılar hastalıklara dayanıklı bitki seçimini in vitro da yapmışlardır. (Jain, 2010, Kumar ve ark., 2012).

Mutagen uygulamaların ıslaha yardımcı olarak in vitro da kısa sürede yapılması yanında, gama ışınlaması ile in vitro tekniklerin kombinasyonlu kullanımı gama ışınının bitkilerde açtığı zararı aza indirdiği de bildirilmektedir. Bu sebeple, tohumlar, çelikler, polenler veya doku kültüründe kallus gibi materyallerde mutasyonları indüklemeye mutagen ışınlar kullanılırlar (Beyaz ve Yıldız, 2017).

Literatür verilerine göre doku kültürü yoluyla aspir rejenerasyonu düşük frekanslı olarak belirtilmiştir. Bunun yanısıra çoğu aspir çeşidi için uygun olan etkili bir protokolün olmamasının da çalışmaları sınırlayıcı etkisi üzerinde durulmuştur (Smerea ve ark., 2018).

Bu çalışmada adventif sürgün rejenerasyon kabiliyeti son derece düşük olan aspir bitkisinde farklı gama ışını dozlarının çeşitler bazında sürgün rejenerasyonu üzerine etkileri incelenmiştir. Doku kültürü çalışmalarında elde edilecek bulgular gelecekte aspir ıslah çalışmaları için yapılacak olan anter ve ovul kültürü çalışmalarına ışık tutacaktır.

Materyal ve Yöntem

Aspir bitkisine ait farklı çeşitlerin in vitro adventif sürgün rejenerasyonuna tepkilerini belirlemek amacıyla 200, 300, 400, 500, 600 Gry dozlarda gama ışını kullanılmıştır. Tohumlara Türkiye Atom Enerjisi Kurumu, Sarayköy Nükleer Araştırma ve Eğitim Merkezi'nde Cs 137 kaynağı ile ışınlama yapılmıştır. İn vitro çalışmalar öncesinde her üç çeşidin tüm dozlarına ait tohumlar %0,1 HgCl₂ çözeltisi uygulanarak 8 dakika süreyle sterilizasyona tabi tutulmuştur.

İşinlanmış ve steril edilmiş tohumlar kağıt arasına her petride 10 tohum olacak şekilde 9x9 luk petri kutularında 4 tekrarlı olarak ekilmiştir. Kağıtların üzeri çok sulu olmayacak şekilde ıslatılmıştır. Petriler iklim kabinlerinde (Sanyo MLR 352-H) 25° de, 16 saat aydınlık 8 saat karanlık olacak şekilde fotoperiyotta tutulmuştur.

İşinlanmış ve işinlanmamış (kontrol) tohumlar çimlendirildikten 7-10 gün sonra kotiledon yaprak, hipokotil ve sürgün ucu eksplantları farklı oksin ve sitokinin dozları içeren çeşitli kombinasyonlara ait MS besin ortamına (Murashige and Skoog, 1962, Murashige, 1974) alınmıştır. Ortamlar her üç çeşitte ayrı ayrı ele alınmıştır. Burada amaç hem hangi eksplant tipinin daha iyi sonuç vereceğini hem de hangi ortamın hangi çeşide daha uygun olacağına karar vermektir. Dozlarla, kontrol dozları birbirleri ile eş zamanlı olarak besiyerlerine aktarılmıştır. Asperde farklı hormon konsantrasyonlarında rejenerasyon kabiliyetini belirlemek amacıyla incelenen özellikler şöyledir; kallus oluşturan eksplant oranı, sürgün oluşturan eksplant oranı, eksplant başına sürgün sayısı ve köklenme oranı gözlemleri alınmıştır. Direk sürgün oluşumu gözlenen eksplantlar gündüz

sıcaklığı 25°, gece ise kış aylarında 10° -15° yi sağlayan seralarda köklenmeye alınmıştır. Köklendirme amacıyla 36*36*34 cm lik 25 lt lik içinde 1:1 oranında torf: perlit içeren saksılar kullanılmıştır. Seraya alınan bu köklenmiş bitkilerde belli zaman sonra tabla oluşumları gözlenmiş ve bitkiler çiçek açmıştır. Çiçeklerin tabladaki dönüşümü ve tohum bağlaması sonucunda, en başarılı olan besin ortamını içeren denemeler kayıt altına alınmıştır.

Çeşitlerin rejenerasyon kabiliyetini artırmak amacıyla daha evvelki çalışmalarda aspir bitkisi için kullanılan ve başarılı sonuçlar elde edilen hormonları içeren farklı kombinasyonlar kullanılarak her çeşit için uygun olan dozlar belirlenmiştir. Hormonlar ve konsantrasyonları TDZ 1-4 mg/l, BAP 1-4 mg/l ve NAA 0-4 mg/l'nin farklı kombinasyonlarından oluşan 30 farklı ortamda denenmiştir. Farklı eksplant tipleri ile yapılan ön denemede yapılan istatistik analiz sonucunda hipokotil ve sürgün ucu eksplantları her üç genotip içinde daha uygun görülmüştür.

Çalışmalardaki çeşit, tür, ortam kombinasyonlarında olan farklılıktan dolayı, her çalışmada aynı hormon dozları ile ortamın kullanılabilmesi sonucuna ulaşılamaz. 30 farklı ortam kombinasyonları ile yapılan ön denemeden yola çıkarak hipokotil ve sürgün ucu eksplantlarıyla Remzibey çeşidi 4 mg/L TDZ + 0.2 mg/L NAA, Dinçer çeşidi 1 mg/L TDZ ve Shifa çeşidi 2 mg/L BAP + 2 mg/L NAA numaralı ortamların rejenerasyon çalışmasında kullanılmasına karar verilmiştir.

Bulgular ve Tartışma

Işınlanmış ve ışınlanmamış (kontrol) steril edilmiş tohumlar petri kutularına yerleştirilerek, 25° de, 16 saat aydınlık 8 saat karanlık olacak şekilde fotoperyotta tutulmuştur. 7-10 gün sonra tohumlar çimlenmiş, kotiledon yaprak, hipokotil ve sürgün ucu eksplantları farklı oksin ve sitokinin dozları içeren çeşitli kombinasyonlara ait MS besin ortamına alınmıştır. Kültür başlangıcından 25-30 gün sonra eksplantların bazılarının üzerinde kalluslar oluşmuş ancak bu kallusların üzerinde adventif sürgün uçları gözlenmemiştir. Bunun yanı sıra ilk bir haftada eksplantlardan sürgün oluşumu gözlenmiş bu sürgünlerde adventif olmamasından dolayı ortamdaki uzaklaştırılmıştır. Sürgünler köklenmeye alınabilecek yeterli büyüklüğe ulaşamamıştır. Eksplantların bir kısmında da direkt sürgün oluşumu gözlenmiştir. Direkt sürgün oluşumu gözlenen eksplantlar gündüz sıcaklığı 25°, gece ise kış aylarında 10°, ortalama 15° yi sağlayan seralarda köklenmeye alınmış, büyütülmüştür. Seraya alınan bu köklenmiş bitkilerde belli zaman sonra tabla oluşumları gözlenmiş ve bitkiler çiçek açmıştır.

Her çeşitte de öncelikle sürgün ucundan gelişen sürgünler 10-15 gün sonra oluşmuş ve genellikle eksplant başına sürgün sayısı açısından 1'in altında sürgün oluşturduğu gözlenmiştir. Her üç çeşitte de hipokotil ve yaprak eksplantı karşılaştırıldığında sürgün oluşturan eksplant oranı ve eksplant başına sürgün sayısı açısından hipokotil eksplantlarının daha iyi sonuç verdiği görülmektedir. Yaprak eksplantı değerleri ise süreklilik göstermemesi ve dalgalanmaların olmasından dolayı kallus oluşturan eksplant oranı açısından göz önüne alınmamıştır. Birçok faktör yapılan çalışmalar için sınırlayıcıdır. Örneğin genotip, tohumun yaşı ve kallus (Fan ve Guo, 2013), alınan eksplantın tipi (Smerea ve ark., 2018), ortam bileşenleri, bitki büyüme düzenleyicileri ve

diğer maddeler (Fan ve Guo, 2013, Xue ve ark., 2015). Yapılan ön denemeler sonrasında hipokotil ve sürgün ucu eksplant tipleri her üç genotip içinde daha uygun görülmüştür. Bu iki eksplant kullanılarak çeşide göre değişmekle birlikte; Remzibey çeşidi 4 mg/L TDZ + 0.2 mg/L NAA, Dinçer çeşidi 1 mg/L TDZ ve Shifa çeşidi 2 mg/L BAP + 2 mg/L NAA ortamlarının rejenerasyon çalışmasında kullanılmasına karar verilmiştir.

Remzibey çeşidinde gama ışını dozlarının incelenen parametrelere etkisine ait sonuçlar

Kallus oranı, sürgün oluşturan eksplant oranı ve eksplant başına sürgün sayısı;

Remzibey çeşidi kallus oranı, sürgün oluşturan eksplant oranı ve eksplant başına sürgün sayısına ait değerlerin varyans analizi çizelge 1, ortalama değerler ve oluşan gruplar çizelge 2' de verilmiştir.

Çizelge 1. Remzibey çeşidine uygulanan farklı gama ışını dozlarının kallus oranı, sürgün oluşturan eksplant oranı ve eksplant başına sürgün sayısına ilişkin varyans analizi sonuçları

Varyasyon Kaynakları	Serbestlik derecesi	Kallus Oranı (%)		Sürgün Oluşturan Eksplant Oranı (%)		Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet)	
		K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F
Tekerrür	2	11.056	0.553	7.808	0.809	0.001	3.000
Eksplant	1	3.216	0.161	10361.204	1072.904**	1.868	6723.997**
Hata1	2	20.011		9.657		0.000	
Doz	5	1200.113	167.023**	1170.828	78.823**	0.188	120.857**
Eksplant x Doz int.	5	18.913	2.632	1123.803	75.657**	0.190	122.00 **
Hata2	20	7.185		14.854		0.002	
TOPLAM	35						

* 0.05, ** 0.01 ihtimal seviyesinde önemli

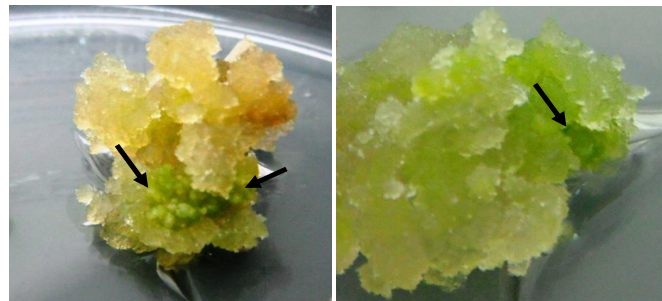
Remzibey çeşidinde kallus oranı açısından farklı dozlar %1 düzeyinde önemli bulunmuştur. Farklı eksplantlar ve interaksiyon (eksplant x doz) önemsiz bulunmuştur. Sürgün oluşturan eksplant oranı ve sürgün oluşturan eksplantlarda eksplant başına sürgün sayısı açısından farklı eksplantlar, farklı dozlar ve interaksiyon (eksplant x doz) istatistikî olarak % 1 düzeyinde önemli bulunmuştur (Çizelge 1).

Çizelge 2. Remzibey çeşidinde uygulanan farklı gama ışını dozlarının kallus oranı, sürgün oluşturan eksplant oran ve eksplant başına sürgün sayısına ilişkin etkilerine ait ortalama değerler ve oluşan gruplar

Doz (Gy)	Kallus Oranı (%)			Sürgün Oluşturan Eksplant Oranı (%)			Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet)		
	Eksplant		Ortalama	Eksplant		Ortalama	Eksplant		Ortalama
	Hipokotil	Sürgün Ucu		Hipokotil	Sürgün Ucu		Hipokotil	Sürgün Ucu	
0 (Kontrol)	50.00	40.00	45.00 a	30.00 ef	100.00 a	65.00 a	0.30 de	1.00 a	0.65 a
200	26.66	30.00	28.33 b	20.00 g	93.33 b	56.66 b	0.20 f	0.93 a	0.57 bc
300	20.00	26.66	23.33 c	20.00 g	100.00 a	60.00 a	0.20 f	1.00 a	0.65 ab
400	23.33	23.33	23.33 c	30.00 ef	73.33 c	51.66 c	0.30 de	0.73 b	0.52 c
500	13.33	16.66	14.99 d	43.33 d	36.66 de	39.99 d	0.43 c	0.37 cd	0.40 d
600	0.00	0.00	0.00 e	10.00 h	23.33 fg	16.66 e	0.10 g	0.23 ef	0.17 e
Ortalama	22.22	22.77	22.49	25.55 b	71.10 a	48.33	0.26 b	0.71 a	0.48
LSD (Doz)	3.228			4.642			0.054		
LSD (Eksplant)	-			4.457			0.014		
LSD (ExD)	-			6.564			0.076		
CV(%)	10.43			8.23			8.16		

Remzibey çeşidinde kallus oluşumunda tek önemli faktör doz olarak çıkmıştır. Kallus oluşturan bitkilerin sayısı oranlandığında doz ortalama değerleri %0-45 aralığında değişmiştir (Çizelge 2). Farklı dozlar 5 grup oluşturmuştur. Dozların ortalama en yüksek değeri %45 ile kontrol dozundan alınmıştır. En yüksek ikinci değer %28.33 ile 200 Gy dozdan alınmıştır. 300-400 Gy dozlar aynı grupta yer almıştır. Sonuç olarak ışınlar rejenerasyon oranını kontrole göre azaltmıştır. Eksplant tiplerinde kallus oranı açısından fark çıkmamıştır.

Özyiğit ve ark. (2007) ayçiçeğinde farklı eksplantların kallus oluşumuna etki ettiğini iletmişlerdir. Aynı çalışmalarında ayçiçeğinin 5 farklı çeşidini kullanmışlar bunların arasında da gözlenen değerler açısından farklar ortaya koymuşlardır. Gama ışınlamasının etkisi de eksplant tipine göre değişiklik gösterebilir. Fakat kallus yoğunluğu daha ziyade genotip etkisine bağlıdır. Nitekim, Smerea ve ark. (2018) gama ışınlaması yapılmış aspir tohumlarından elde ettikleri kallusların yoğunluğunun çalıştıkları genotipe bağlı olarak değiştiğini, fakat eksplant tipinin gama ışınına verdiği tepkinin %95 olarak önemlilik arz etmekle birlikte farklı olduğunu belirtmişlerdir.



Şekil 1. Remzibey çeşidinde 200 Gy dozda hipokotil eksplantlarından 28 gün sonra oluşan kallusların üzerinde somatik embriyo oluşumu (solda), Remzibey çeşidinde 200 Gy dozda sürgün ucu eksplantlarından 28 gün sonra oluşan kallusların üzerinde somatik embriyo oluşumu (sağda)

Hipokotil ve sürgün ucu eksplantlarından oluşan kallusların üzerinde çok sayıda somatik embriyo gözlemede bu emriyolardan oluşan sürgünler yeterli büyüklüğe erişememiştir (Şekil 1).

Sürgün oluşturan eksplant oranı değerleri %16.66-65 arasında değişmiştir (Çizelge 2). Doz ortalamaları açısından 0-300 Gy dozlar aynı grupta yer almış ve farklı dozlar 5 grup oluşturmuştur. En yüksek değerler kontrol ve 300 Gy dozda, sırasıyla %65 ve %60 olarak tespit edilmiştir. Bu dozlar aynı grupta yer almıştır.

Sürgün oluşturan eksplant oranı açısından eksplantlar arası fark da istatistik olarak önemli çıkmıştır. Eksplantlar 2 ayrı grupta yer almıştır. Değerler %10-100 arasında değişiklik göstermiştir. En yüksek değerler sürgün ucu eksplantının kontrol dozu ve 300 dozundan elde edilmiştir. Bu dozlar aynı grupta yer almıştır. En düşük değer ise %10 ile hipokotil eksplantının 600 Gy dozundan elde edilmiştir. Eksplantların sürgün oluşturan eksplant ortalamaları incelendiğinde eksplantların arasında büyük bir fark gözlenmektedir. Sürgün ucu eksplantı %71.10 ile hipokotil eksplantından neredeyse 2.5 kat daha fazla sürgün oluşturmuştur. Hipokotil eksplantında kendi arasında dozlara göre dalgalanmalar olmuş, en yüksek değer %43.33 ile 500 Gy dozundan elde edilmiştir. 500 Gy dozda neredeyse eksplantların yarısı sürgün oluşturmuştur. 600 Gy dozda ise bu oran %10'a düşmüştür. Sujatha ve Kumar (2007) yabancı aspir ve kültür aspirinde BAPxNAA ile TDZxNAA kombinasyonlarında *Carthamus tinctorius* (%71.1) ve *C.arborescens*' in (%100) en iyi sürgün oluşumunu TDZxNAA' nın kombinasyonunda bulmuştur.

Sürgün oluşturan eksplant oranı açısından doz ve eksplant interaksyonu istatistik olarak önemli bulunmuştur. Sürgün oluşturan eksplant oranı bakımından dozlar arasındaki farklılık, eksplantları da etkilemektedir. Sürgün ucu eksplantları dozlara göre kendi arasında incelendiğinde ufak bir dalgalanma olmakla beraber dozlar arttıkça sürgün oluşumunda 300 doza kadar fazla bir değişiklik olmamakla beraber, 300 dozdan sonra bu oran giderek azalmış ve 600 Gy de %23.33'e gerilemiştir. Gerek dozlar ve gerekse eksplantlar açısından ciddi farklar elde edilmiştir. Sujatha ve Kumar (2007) yabancı aspirlerle ve kültür aspiri türünün yaprak eksplantını kullanarak farklı konsantrasyonlarda TDZxNAA içeren ortamlarda sürgün rejenerasyonu sağlamışlardır. Bu çalışma ile paralel olarak *C. tinctorius* yaprak eksplantlarında kallus oluşturmada adventif sürgün oluşumu göstermiştir. Her iki çalışmada da eksplant kaynağı farklı olmakla beraber TDZxNAA içeren ortamlarda kontrol dozlarında %100 sürgün oluşumu gözlenmiş ve oluşan sürgünler direk elde edilmiştir.

Sürgün oluşturan eksplantlarda eksplant başına sürgün sayısı ortalama doz değerleri 0.17-0.65 adet arasında değişiklik göstermiştir (Çizelge 2). Farklı dozlar 5 grup oluşturmuştur. En yüksek ortalama değer kontrol dozu ve 300 Gy dozdan 0.65 adet ile elde edilmiştir. Bu iki doz istatistik olarak aynı grupta yer almıştır.

Farklı eksplantlar istatistik olarak önemli çıkmış ve 2 farklı grup oluşturmuştur. Değerler 0.10-1.00 adet arasında değişiklik göstermiştir. En yüksek değerler sürgün ucu eksplantından elde edilmiş ve 0-200-300 Gy dozları aynı grupta yer almıştır. Eksplant ortalamaları incelendiğinde en yüksek ortalama değer 0.71 adet ile sürgün ucu eksplantından elde edilmiştir.

Doz ve eksplant interaksyonu istatistik olarak önemli bulunmuştur. Sürgün oluşturan eksplantlarda eksplant başına sürgün sayısı değerleri bakımından dozlar arasındaki farklılığın, eksplantları da etkilediği sonucuna ulaşılmıştır.

Aasim ve ark. (2009) bürülce çeşitlerinde yaptıkları *in vitro* çalışmalarda, TDZ konsantrasyonlarının sürgün oluşumunun arttığını gözlemlemişlerdir. Artan TDZ dozlarının kallus ve sürgün oluşumunu artırıcı etki yaptığını, eksplant başına sürgün sayısının ise 0.25 mg/L TDZ dozunda en iyi değere ulaştığını ve sürgün uzunluğunun ise doz arttıkça azaldığını, kontrol dozlarında en yüksek değeri aldığını iletmışlerdir.

Çiftçi ve ark. (2006) bezelye çeşitlerine gama ışını uygulayıp *in vitro* da farklı hormon kombinasyonları deneyerek hem hormonların hem de ışınların etkisini araştırmışlardır. Winner çeşidine 60 Gy dozda 10 µM TDZ veya 50 µM BAP hormonu uygulamasında en yüksek çimlenme değerini almışlardır. En iyi sonucun ise 60 Gy gama + 10 µM TDZ olduğunu iletmışlerdir. En yüksek eksplant başına sürgün sayısı değerini de 60 Gy dozda almışlardır. Karina ve Bolero çeşitlerinde en iyi eksplant başına sürgün sayısı değerini ise kontrolden elde etmişlerdir. Yapılan bu çalışma da bezelye çeşitlerinde farklılıklar olduğu gibi, diğer çalışmalarda da aspirde gama ışınlanması aynı zamanda çeşitlere bağlı olarak genetik kararsızlığı da (Verma ve Shrivastava, 2014, Smerea ve ark., 2018) göstermiştir.

Aspirin sürgün rejenerasyonunda bitkinin genotipinin kullanılan hormon konsantrasyonlarının bu çalışmadaki gibi çok önemli olduğu incelenen çalışmalarda anlaşılmaktadır. Birçok araştırmacı farklı eksplantlar kullanarak sürgün rejenerasyonunu sağlamışlardır (Radhika ve ark., 2006, Sujatha ve Kumar, 2007, Walia ve ark., 2007, Başalma ve ark., 2008, Talat ve Anwar, 2010, Özdemir ve Türker, 2014). Tüm bu çalışmalardan elde edilen en önemli bilgi sürgün rejenerasyonunun kullanılan genotip, hormonlar ve büyüme koşulları ile yakından alakalı olduğu ile ilgilidir.

Köklenme oranı, kök sayısı, kök uzunluğu ve canlılığın devamlılığı:

Remzibey çeşidi köklenme oranı, kök sayısı, kök uzunluğu ve canlılığın devamlılığına ait değerlerin varyans analizi çizelge 3, ortalama değerler ve oluşan gruplar çizelge 4’ de verilmiştir.

Çizelge 3. Remzibey çeşidine uygulanan farklı gama ışını dozlarının köklenme oranı, kök sayısı, kök uzunluğu ve serada canlılığını devam ettirmesine ilişkin varyans analizi sonuçları

Varyasyon Kaynakları	Serbestlik derecesi	Köklenme oranı (%)		Kök sayısı (adet)		Kök uzunluğu (cm)		Canlılığını devam ettirme (%)	
		K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F
Tekerrür	2	1.628	0.015	0.111	1.000	0.228	6.046	2.576	6.153
Eksplant	1	8374.995	75.404*	4.694	42.250*	3.240	85.923*	524.639	1252.944**
Hata1	2	111.069		0.111		0.038		0.419	
Doz	5	4716.163	207.127**	17.894	64.420**	9.830	86.927**	1161.878	235.048**
Eksplant x Doz int.	5	496.862	21.821**	2.294	8.260**	1.217	10.758**	110.415	22.337**
Hata2	20	22.769		0.278		0.113		4.943	
TOPLAM	35								

* 0.05, ** 0.01 ihtimal seviyesinde önemli

Remzibey çeşidinde köklenme oranı, kök sayısı ve kök uzunluğu açısından farklı eksplantlar %5 düzeyinde önemli bulunmuştur. Farklı dozlar ve interaksiyon (eksplant x doz) istatistik olarak %1 düzeyinde önemli bulunmuştur. Canlılığını devam ettirenler açısından farklı eksplantlar, farklı dozlar ve interaksiyon (eksplant x doz) istatistik olarak % 1 düzeyinde önemli bulunmuştur (Çizelge 3).

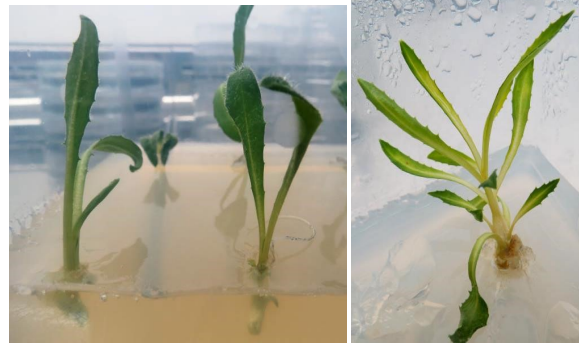
Çizelge 4. Remzibey çeşidine uygulanan farklı gama ışını dozlarının köklenme oranı, kök sayısı, kök uzunluğuna ve canlılığını devam ettirmeye ilişkin etkilerine ait ortalama değerler ve oluşan gruplar

Doz (Gy)	Köklenme oranı (%)			Kök sayısı (adet)			Kök uzunluğu (cm)			Canlılığını devam ettirme (%)		
	Eksplant		Ortalama	Eksplant		Ortalama	Eksplant		Ortalama	Eksplant		Ortalama
	Hipokotil	Sürgün Ucu		Hipokotil	Sürgün Ucu		Hipokotil	Sürgün Ucu		Hipokotil	Sürgün Ucu	
0 (Kontrol)	100.00 a	60.66 d	80.33 a	4.67 b	4.67 b	4.67 a	3.00 bc	3.38 ab	3.19 b	33.30 b	16.66 e	24.98 c
200	100.00 a	59.33 d	79.66 a	3.67 cd	5.67 a	4.67 a	2.67 c	1.20 d	1.93 d	50.00 a	21.47 de	35.74 a
300	100.00 a	57.33 d	78.66 a	2.67 e	4.67 b	3.67 b	2.67 c	1.40 d	2.03 cd	50.00 a	23.33 cd	36.66 a
400	93.33b	76.33 c	84.83 a	3.00 de	4.33 bc	3.67 b	3.17 bc	1.66 d	2.41 c	33.30 b	27.40 bc	30.35 b
500	96.66 ab	36.00 e	66.33 b	3.67 cd	2.67 e	3.17 b	3.57 ab	3.81 a	3.69 a	23.33 cd	27.77 bc	25.55 c
600	0.00 f	0.00 f	0.00 c	0.00 f	0.00 f	0.00 c	0.00 e	0.00 e	0.00 e	0.00 f	0.00 f	0.00 d
Ortalama	81.66 a	48.28 b	64.97	2.94 b	3.67 a	3.31	2.51 a	1.91 b	2.21	31.65 a	19.43 b	25.54
LSD (Doz)	5.747			0.635			0.040			2.678		
LSD (Eks.)	15.120			0.478			0.280			0.928		
LSD (ExD)	8.127			0.898			0.572			3.787		
CV(%)	8.42			15.94			15.21			8.02		

Remzibey çeşidinde sürgün oluşturan eksplantların köklenme oranı açısından dozlar arası fark önemli bulunmuştur. Ortalama doz değerleri %0-84.83 arasında değişmiştir (Çizelge 4). Farklı dozlar 3 grup oluşturmuştur. 0-200-300-400 Gy dozlar aynı grupta yer almıştır.

Köklenme oranı açısından farklı eksplantlar 2 grup oluşturmuştur. Değerler %0-100 arasında değişmiştir Hipokotil ve sürgün ucu eksplantları köklenme oranı ortalamaları sırasıyla %81.66 ve %48.28 olarak bulunmuştur. Hipokotil eksplantında alınan en yüksek değer istatistik olarak aralarında fark olmaksızın 0-200-300-500 Gy dozlarından elde edilmiştir. Sürgün ucu eksplantı ise en yüksek değerini %76.33 ile 400 Gy dozda vermiştir. 600 Gy dozda ise sürgün oluşumu olmasına rağmen her iki eksplant açısından da elde edilen sürgünler köklenip bitkicik oluşturamamıştır.

Köklenme oranı açısından interaksiyon istatistik olarak önemli çıkmıştır.



Şekil 2: Remzibey çeşidinde 200 Gy dozunda hipokotil eksplantlarının kültür başlangıcından 18 gün sonra direk sürgün oluşturanların köklenmeye alınması

Remzibey çeşidinde köklenenlerin (Şekil 2) kök sayısı doz ortalama değerleri 0-4.67 adet arasında değişiklik göstermiştir (Çizelge 4). Farklı dozlar 3 grup oluşturmuştur. 0-200 Gy dozlar ve 300-400-500 Gy dozlar aynı grupta yer almıştır. Dozların kök sayısı ortalamalarının en yüksek değer kontrol ve 200 Gy dozlarından elde edilmiş bu oran giderek düşmüştür.

Kök sayısı bakımından farklı eksplantlar 2 grup oluşturmuştur. Değerler 0-5.67 adet arasında değişmiştir. 600 Gy dozunda köklenme olmadığından kök sayısı da 0 adet olarak kaydedilmiştir. En yüksek kök sayısı değerini 5.67 adet ile 200 Gy dozunda sürgün ucu eksplantı vermiştir. Eksplantlar kendi içinde incelendiğinde hipokotil eksplantı kök sayısı açısından en yüksek değeri kontrol dozunda vermiştir.

Kök sayısı bakımından eksplant, doz interaksiyonunda istatistik olarak önemli çıkmıştır. İki farklı grup oluşturmuştur. Eksplantların kök sayısı ortalamalarına bakıldığında en yüksek değer sürgün ucu eksplantından elde edilmiştir.

Remzibey çeşidinde köklenenlerde kök uzunlukları doz ortalama değerleri 0-3.19 cm arasında değişiklik göstermiştir (Çizelge 4). Farklı dozlar 5 grup oluşturmuştur. En yüksek ortalama kök uzunluğu değerli 3.69 cm ile 500 Gy dozdan elde edilmiştir.

Kök uzunluğu değerleri açısından farklı eksplantlar 2 grup oluşturmuştur. Değerler 1.20-3.81 cm arasında değişmiştir. En yüksek kök uzunluğu değeri sürgün ucu eksplantının kontrol dozu ile her iki eksplantın 500 Gy dozundan elde edilmiştir.

Kök uzunluğu değerleri açısından eksplant, doz interaksiyonu istatistik olarak önemli çıkmıştır. Eksplantların kök uzunluğu ortalamalarına bakıldığında en yüksek değeri hipokotil eksplantı vermiştir. Dozların kök uzunluğu ortalamalarına bakıldığında ise en yüksek değer 500 Gy dozunda ortaya çıkmıştır. 600 Gy dozunda sürgün oluşturan eksplantlar köklenmemiş dolayısı ile kök uzunluklarına bakılamamıştır.

Çiftçi ve ark. (2006) bezelye çeşitlerinde 2.5 µM NAA'nın ve gama radyasyonlarının etkisini araştırmışlardır. 2.5 µM NAA'nın bu çeşitler için uygun olduğunu saptamışlardır. Kök sayısı, köklenme oranı ve kök uzunluğu açısından en iyi sonucu Winner çeşidi için 60 Gy dozdan elde etmişlerdir. Karina ve Bolero çeşitleri içinse bu üç karakter en yüksek değerini kontrol dozundan almıştır.

Remzibey çeşidinde köklenip biraz büyüdüktan sonra 3-4 cm çapında saksılara alınan bitkiciklerin serada canlılığını devam ettirmesi açısından gözlemlenmişlerdir. Canlılığını devam ettirenlerin oranı ortalama doz değerleri %0-36.66 oranında değişiklik göstermiştir (Çizelge 4). Farklı dozlar istatistik olarak önemli çıkmış ve 4 grup oluşturmuştur. 0-500 Gy ve 200-300 Gy dozlar aynı grupta yer almıştır. En yüksek değerler 200-300 Gy dozlarından elde edilmiştir.

Canlılığını devam ettirenler açısından farklı eksplantlar 2 grup oluşturmuştur. Değerler %0-50 arasında değişiklik göstermiştir. En yüksek değeri hipokotil eksplantı 200-300 Gy dozunda %50 ile vermiştir.

Canlılığını devam ettirenlerde eksplant, doz interaksiyonunda istatistik olarak önemli çıkmıştır. Eksplantların canlılığını devam ettirme oranı ortalamalarına bakıldığında en yüksek değer %31.65 ile hipokotil eksplantından elde edilmiştir. Radyasyon artışına bağlı olarak sürgün ucu eksplantlarından elde edilen bitkiciklerin canlılık değerlerinde genel anlamda bir artış olmuştur. 600 Gy dozda eksplantlardan gelişen sürgünler canlı kalamadığı için köklenme olmamış ve dolayısı ile canlılık gözlenememiştir.

Tüm alınan gözlemler incelendiğinde Remzibey çeşidinde kallus oranı dozlar arttıkça azalmıştır. Kök uzunluğu değerlerinin ise 500 Gy dozuna kadar dozlar arttıkça arttığı tespit edilmiştir. Diğer incelenen özelliklerin hepsinde de genel anlamda 400 Gy dozunun hemen hemen en iyi ortalamaları verdiği gözlenmektedir.

Dinçer çeşidinde gama ışını dozlarının incelenen parametrelere etkisine ait sonuçlar

Kallus oranı, sürgün oluşturan eksplant oranı ve eksplant başına sürgün sayısı:

Dinçer çeşidi kallus oranı, sürgün oluşturan eksplant oranı ve eksplant başına sürgün sayısına ait değerlerin varyans analizi çizelge 5, ortalama değerler ve oluşan gruplar çizelge 6' da verilmiştir.

Çizelge 5. Dinçer çeşidine uygulanan farklı gama ışını dozlarının kallus oranı, sürgün oluşturan eksplant oranı ve eksplant başına sürgün sayısına ilişkin varyans analizi sonuçları

Varyasyon Kaynakları	Serbestlik derecesi	Kallus Oranı (%)		Sürgün Oluşturan Eksplant Oranı (%)		Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet)	
		K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F
Tekerrür	2	7.553	0.214	6.636	4.613	0.002	7.000
Eksplant	1	170.564	4.842	508.127	353.286**	0.147	529.000**
Hata1	2	35.226		1.438		0.000	
Doz	5	380.204	48.746**	732.107	70.540**	0.198	80.841**
Eksplant x Doz İnt.	5	14.075	1.804	143.275	13.805**	0.036	14.841**
Hata2	20	7.800		10.379		0.002	
TOPLAM	35						

* 0.05, ** 0.01 ihtimal seviyesinde önemli

Dinçer çeşidinde kallus oluşturan eksplant oranı açısından farklı dozlar %1 düzeyinde önemli bulunmuştur. Farklı eksplantlar ve interaksiyon (eksplant x doz) önemsiz bulunmuştur. Sürgün oluşturan eksplant oranı ve sürgün oluşturan eksplantlarda eksplant başına sürgün sayısı açısından incelendiğinde farklı eksplantlar, farklı dozlar ve interaksiyon (eksplant x doz) istatistikî olarak %1 düzeyinde önemli bulunmuştur (Çizelge 5).

Çizelge 6. Dinçer çeşidine uygulanan farklı gama ışını dozlarının kallus oranı, sürgün oluşturan eksplant oranı ve eksplant başına sürgün sayısına ilişkin etkilerine ait ortalama değerler ve oluşan gruplar

Doz (Gy)	Kallus Oranı (%)			Sürgün Oluşturan Eksplant Oranı (%)			Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet)		
	Eksplant		Ortalama	Eksplant		Ortalama	Eksplant		Ortalama
	Hipokotil	Sürgün Ucu		Hipokotil	Sürgün Ucu		Hipokotil	Sürgün Ucu	
0 (Kontrol)	10.00	10.00	10.00 d	60.00 b	33.33 c	46.66 b	0.60 b	0.33 c	0.47 b
200	23.33	16.66	19.99 b	80.00 a	63.33 b	71.66 a	0.80 a	0.63 b	0.72 a
300	36.66	33.33	34.99 a	76.66 a	60.00 b	68.33 a	0.77 a	0.60 b	0.68 a
400	43.33	36.66	39.99 a	73.33 a	63.33 b	68.33 a	0.73 a	0.63 b	0.68 a
500	26.66	16.66	21.66 b	60.00 b	36.66 c	48.33 b	0.60 b	0.37 c	0.48 b
600	20.00	10.00	15.00 c	16.66 d	33.33 c	24.99 c	0.17 d	0.33 c	0.25 c
Ortalama	26.66	20.55	23.60	61.10 a	48.33 b	54.72	0.61 a	0.48 b	0.55
LSD (Doz)	3.36			3.88			0.054		
LSD (Eksplant)	-			1.72			0.014		
LSD (E x D)	-			5.49			0.076		
CV(%)	9.85			6.75			9.03		

Dinçer çeşidinde kallus oluşturan bitkilerin sayısı bakımından istatistik olarak tek önemli çıkan faktör dozdur. Ortalama doz değerleri %10-39.99 aralığında değişmiştir (Çizelge 6). Farklı dozlar 4 grup oluşturmuştur. 200-500 Gy dozlar ve 300-400 Gy dozlar aynı grupta yer almıştır. En yüksek değer 300-400 Gy dozundan sırasıyla %34.99 ve %39.99 olarak elde edilmiştir. En düşük değer kontrol dozundan %10 olarak elde edilmiştir.

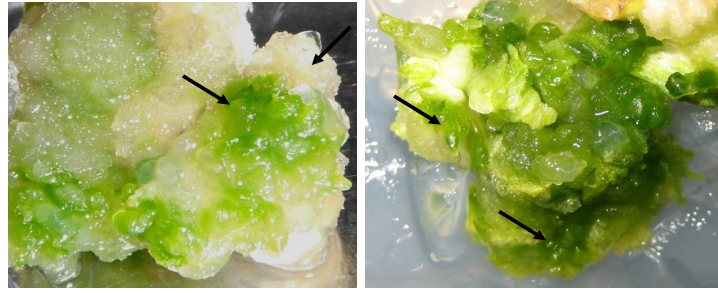
Düşük gama dozlarının kallusa uygulanmasıyla birçok çalışmada olumlu sonuçlar elde edilmiştir (Singh ve Balyan, 2009, Afrasiab ve Javed, 2010). Muthusamy ve ark. (2007). Remzibey çeşidinde kallus oluşumunun azalmış olması da gayet normaldir.

Sürgünler genellikle direk olarak oluşmuş, kallustan gelişen sürgünler büyümemiş, uzamamış ve fazla canlı kalamamıştır. Sürgün oluşturan eksplant oranı değerleri ortalama doz değerleri %34.99-71.66 arasında değişmiştir (Çizelge 6). Farklı dozlar 3 grup oluşturmuştur. 0-500 Gy dozlar ve 200-300-400 Gy dozlar aynı grupta yer almıştır.

Sürgün oluşturan eksplant oranında farklı eksplantlar 2 grup oluşturmuştur. Değerler %16.66- 80 arasında değişmiştir. En yüksek değer hipokotil eksplantının 200-300-400 Gy dozlarından elde edilmiştir. En düşük değer ise yine %16.66 ile hipokotil eksplantının 600 Gy dozundan elde edilmiştir.

Sürgün oluşturan eksplant oranı açısından eksplant, doz interaksiyonu önemli bulunmuştur. En yüksek ortalama değer %61.10 ile hipokotil eksplantından elde edilmiştir.

Smerea ve ark. 2018 de bu çalışmaya benzer olarak aspir bitkisinde ışınlamanın morfogenetik süreçleri hızlandığını ve eksplant başına daha yüksek sürgün eldesini sağladığını bildirmişlerdir. Burada elde edilen sürgün sayısı kontrol dozundan daha yüksek çıkmıştır. Eksplantların sürgün oluşturan eksplant ortalamaları incelendiğinde eksplantlar arasında fark gözlenmekte hipokotil eksplantı %61.10 ile daha fazla sürgün oluşturmaktadır.



Şekil 3. Dinçer çeşidinde sırasıyla 400 ve 500 Gy dozunda sürgün ucu eksplantlarından 35 gün sonra kallus oluşumu ve gözlenen somatik embriyolar

Dinçer çeşidinden alınan gerek hipokotil ve gerekse sürgün ucu eksplantlarından kallus oluşumu gözlenmiştir. Bu kallusların üzerinde somatik embriyolar gözlenirse de, bu embriyolardan bazıları farklılaşmamış ve sürgün oluşturamamıştır. Bazıları ise sürgün oluştursa dahi gelişip uzayamamıştır (Şekil 3).

Smerea ve ark. 2018 de yaptıkları çalışmada aspir tohumlarına 50,100,150 Gy gama dozu uygulamışlardır. Çalışma sonucunda eksplant tipinde olan farklılıklara bağlı olarak kallus oluşumu ve yoğunluğunda değişimler gözlemişlerdir. Kallus dokusunun farklı eksplant tiplerine göre değişim gösterdiğini ve eksplantlardan sürgün oluşumunun da elde edilen kallus dokusuna bağlı olduğunu bildirmişlerdir.

Şahin ve ark. (2008) mürdümükte adventif sürgün rejenerasyonu üzerine çalışmışlar ve en fazla sürgün oranı, en yüksek eksplant başına sürgün sayısı değerini 0.2 mg/L TDZ' li MS ortamından elde etmişlerdir. Araştırmacılar TDZ' nin purin içermeyen bir sitokinin bileşiminin olduğunu ve bitki türlerinin büyük bir çoğunluğunda geleneksel sitokininlerden daha güçlü bir etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Muthusamy ve ark. (2007), doku kültürünü takiben yapılan mutagenik uygulamaların düşük dozlarında sürgün sayısında ve eksplant başına sürgün sayısında artış gözlemişler, artan mutagen dozlarında ise tekrar azalış gözlemişlerdir.

Sürgün oluşturan eksplantlarda eksplant başına sürgün sayısı ortalama doz değerleri 0.25-0.72 adet arasında değişiklik göstermiştir (Çizelge 6). Farklı dozlar istatistik olarak 3 grup oluşturmuştur. 0-500 Gy dozlar ve 200-300-400 Gy dozlar aynı grupta yer almıştır.

Eksplant başına sürgün sayısı açısından farklı eksplantlar istatistik olarak önemli çıkmıştır. Ortalama değerler 2 grup oluşturmuştur ve 0.17-0.80 adet arasında değişmiştir. En yüksek değer hipokotil eksplantının 200-300-400 Gy dozlarından elde edilmiştir. En düşük değer ise 0.17 adet ile yine hipokotil eksplantının 600 Gy dozdan elde edilmiştir. Hipokotil eksplantı 500 Gy dozda kontrol dozu ile aynı değeri vermiştir. Sürgün ucu eksplantında ise 200-300-400 Gy dozlar aynı grupta yer almıştır.

Eksplant, doz interaksyonu açısından ksplant başına sürgün sayısı değerleri istatistik olarak önemli çıkmıştır. Yine eksplantların doz ortalamaları en yüksek ortalama değer 0.61 adet ile hipokotil eksplantından elde edilmiştir.

Barakat ve El-Sammak (2011) *Gypsophila paniculata* L. bitkisinde sürgün ucu ve lateral tomurcuklara 0.25,0.5,0.75 ve 1 Gy dozlarda gama ışını uygulamışlardır. Doz artışına bağlı olarak 0.75 Gy doza kadar değerlerde bir azalış olmuştur. Kallus ve sürgün oluşumu değerleri 0.75 Gy dozda tekrar yükselmiş ve bu dozdan sonra yine düşmüştür. Eksplant başına sürgün sayısı ise doz artışı ile azalmış 0.75 Gy dozda neredeyse kontrolün 2.5 katı kadar artış göstermiş ve daha sonrasında ise azalışa geçmiştir. Sürgün uzunluğu değerleri ise 1 Gy doza kadar düşmüş 1 Gy dozda ise kontrole göre artış göstermiştir. Araştırmacılar en iyi kallus oluşumunu ve eksplant başına sürgün sayısı değerini lateral tomurcuktan, en iyi sürgün oluşumu ve sürgün uzunluğu değerini ise sürgün ucu eksplantından elde etmişlerdir. İnteraksiyonda ise kallus oluşumu lateral tomurcuk eksplantında 0.25 Gy dozda kontrole göre artış göstermiş, 0.5 Gy de düşmüş, 0.75 Gy de tekrar artmış ve sonrasında azalmıştır. Sürgün ucu eksplantında ise doz artışı ile 0.75 Gy doza kadar azalmış, bu dozda artış göstermiştir. Sürgün sayısı açısından lateral tomurcukta 0.25 Gy dozda kontrole göre bir artış, 0.5 Gy dozda azalış, 0.75 Gy dozda kontrole göre 2 katın üstünde bir artış ve sonrasında azalış olmuştur. Sürgün sayısı sürgün ucu eksplantında ise 0.75 Gy doza kadar azalış, 0.75 Gy dozda neredeyse kontrolün 3 katı artış göstermiştir.

Köklenme oranı, kök sayısı, kök uzunluğu ve canlılığın devamlılığı:

Dinçer çeşidi köklenme oranı, kök sayısı, kök uzunluğu ve canlılığın devamlılığına ait değerlerin varyans analizi çizelge 7, ortalama değerler ve oluşan gruplar çizelge 8’ de verilmiştir.

Çizelge 7. Dinçer çeşidine uygulanan farklı gama ışını dozlarının köklenme oranı, kök sayısı, kök uzunluğu ve serada canlılığını devam ettirmesine ilişkin varyans analizi sonuçları

Varyasyon Kaynakları	Serbestlik derecesi	Köklenme oranı (%)		Kök sayısı (adet)		Kök uzunluğu (cm)		Canlılığını devam ettirme (%)	
		K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F
Tekerrür	2	14.144	1.741	0.583	7.000	0.057	0.478	0.938	4.675
Eksplant	1	293.551	36.142*	12.250	147.000**	0.497	4.194	1105.895	5512.710 **
Hata1	2	8.122		0.083		0.119		0.201	
Doz	5	1414.906	151.316**	11.117	37.056**	5.254	45.489**	863.353	316.910**
Eksplant x Doz int.	5	565.889	60.519**	20.317	67.722**	3.861	33.430**	80.923	29.704**
Hata2	20	9.351		0.300		0.116		2.724	
TOPLAM	35								

* 0.05, ** 0.01 ihtimal seviyesinde önemli

Dinçer çeşidi köklenme oranı incelendiğinde farklı eksplantlar istatistik olarak %5 düzeyinde önemli bulunmuştur. Farklı dozlar ve interaksyon (eksplant x doz) istatistik olarak %1 düzeyinde önemli bulunmuştur.

Kök uzunluğu açısından incelendiğinde farklı dozlar ve interaksiyon (eksplant x doz) istatistik olarak %1 düzeyinde önemli bulunmuştur. Farklı eksplantlar istatistik olarak önemsiz bulunmuştur. Kök sayısı ve canlılığını devam ettirenler açısından incelendiğinde farklı eksplantlar, farklı dozlar ve interaksiyon (eksplant x doz) istatistik olarak % 1 düzeyinde önemli bulunmuştur (Çizelge 7).

Dinçer çeşidinde sürgün oluşturan eksplantların köklenme oranı ortalama doz değerleri %25-81.83 arasında değişmiştir (Çizelge 8). Farklı dozlar 4 grup oluşturmuştur. 200-300 Gy dozlar ve 400-500 Gy dozlar aynı grupta yer almıştır. En yüksek ortalama doz değeri sırasıyla 200-300 Gy dozlardan elde edilmiş ve değerler %81.83 ile %77.01 arasında değişmiştir. 600 Gy doz en düşük değeri %25 olarak vermiştir.

Köklenme oranı açısından farklı eksplantlar 2 grup oluşturmuştur. Değerler %0-83.00 arasında değişmiştir. En yüksek değer sürgün ucu eksplantından 200-300 Gy dozları ile hipokotil eksplantı 200 Gy dozundan elde edilmiştir. En düşük değer ise yine sürgün ucu eksplantından 600 Gy dozundan %0 ile elde edilmiştir.

Köklenme oranı açısından eksplant, doz interaksiyonu da istatistik olarak önemli bulunmuştur. Ortalama köklenme oranı açısından en yüksek değeri %66.33 ile hipokotil eksplantı vermiştir.

Çizelge 8. Dinçer çeşidine uygulanan farklı gama ışını dozlarının köklenme oranı, kök sayısı, kök uzunluğu ve canlılığın devamlılığına ilişkin etkilerine ait ortalama değerler ve oluşun gruplar

Doz (Gy)	Köklenme oranı (%)			Kök sayısı (adet)			Kök uzunluğu (cm)			Canlılığını devam ettirenlerin oranı(%)		
	Eksplant		Ortalama	Eksplant		Ortalama	Eksplant		Ortalama	Eksplant		Ortalama
	Hipokotil	Sürgün Ucu		Hipokotil	Sürgün Ucu		Hipokotil	Sürgün Ucu		Hipokotil	Sürgün Ucu	
0 (Kontrol)	60.00 de	55.33 ef	57.66 c	3.67 fg	4.33 ef	4.00 d	2.73 e	3.57 cd	3.15 c	16.70 d	30.53 bc	23.62 b
200	80.66 ab	83.00 a	81.83 a	3.33 g	5.67 c	4.50 cd	3.23 de	4.13 abc	3.68 b	12.50 e	31.73 bc	22.11 b
300	73.70 bc	80.33 ab	77.01 a	3.67 fg	9.33 a	6.50 a	3.73 bcd	4.25 ab	3.99 ab	13.10 e	33.30 b	23.20 b
400	68.16 cd	73.33 bc	70.75 b	4.33 ef	7.33 b	5.83 b	4.23 ab	4.33 a	4.28 a	13.70 de	47.60 a	30.65 a
500	66.00 cd	72.00 c	69.00 b	4.67 de	5.33 cd	5.00 c	3.98 abc	3.58 cd	3.78 b	16.70 d	27.76 c	22.23 b
600	50.00 f	0.00 g	25.00 d	5.33 cd	0.00 h	2.67 e	3.36 d	0.00 f	1.68 d	0.00 f	0.00 f	0.00 c
Ortalama	66.33 a	60.78 b	63.55	4.17 b	5.33 a	4.75	3.54	3.31	3.43	12,11 b	28.48 a	20.29
LSD (Doz)	3.683			0.659			0.410			1.988		
LSD (Eks.)	4.087			0.413			-			0.643		
LSD (ExD)	5.208			0.933			0.580			2.811		
CV(%)	5.88			11.53			9.91			6.82		

Dinçer çeşidinde köklenenler kök sayısı açısından değerler 2.67-6.50 adet arasında değişiklik göstermiştir (Çizelge 8). Farklı dozlar 5 grup oluşturmuştur. En yüksek ortalama değer 300 Gy dozdan 6.50 adet ile elde edilmiştir. Bunu 400 Gy doz 5.83 adet ile izlemiştir. En düşük değer ise 2.67 adet ile 600 Gy dozdan elde edilmiştir.

Kök sayısı açısından farklı eksplantlar 2 grup oluşturmuştur. Değerler 0-9.33 adet arasında değişmiştir. En yüksek kök sayısı değerini 9.33 adet ile 300 Gy dozunda sürgün ucu eksplantı vermiştir.

Kök sayısı eksplant, doz interaksyonu değerleri de istatistik olarak önemli bulunmuştur. Eksplantların kök sayısı ortalamalarına bakıldığında en yüksek değer 5.33 adet ile sürgün ucu eksplantından elde edilmiştir.

Dinçer çeşidinde köklenenlerde kök uzunlukları ortalama doz değerleri 1.68-4.28 cm arasında değişiklik göstermiştir (Çizelge 8). Farklı dozlar 4 grup oluşturmuştur. En yüksek ortalama kök uzunluğu değeri sırasıyla 300-400 Gy dozlardan elde edilmiş, 3.99 ve 4.28 cm değerlerini vermiştir. En düşük değer 1.68 cm ile 600 Gy dozdan elde edilmiştir.

Eksplant, doz interaksyonu da kök uzunluğu değerleri açısından istatistik olarak önemli bulunmuştur. Kök uzunluğu değerler 0-4.33 cm arasında değişmiştir. En yüksek kök uzunluğu değeri sürgün ucu eksplantının 300-400 Gy dozları ile hipokotil eksplantının 400 Gy dozundan elde edilmiştir. En düşük değer sürgün ucu eksplantında 0 cm ile 600 Gy dozundan elde edilmiştir. Eksplant ortalamaları açısından istatistiki olarak fark bulunamamıştır.

Dinçer çeşidinde köklenip biraz büyüdükten sonra 3-4 cm çapında saksılara alınan bitkiciklerin serada canlılığını devam ettirmesi açısından incelenmişlerdir. Canlılığını devam ettirenlerin oranı ortalama doz değerleri %0-30.65 oranında değişiklik göstermiştir (Çizelge 8). Farklı dozlar 3 grup oluşturmuştur. 0-200-300-500 Gy dozlar aynı grupta yer almıştır. En yüksek değer 400 Gy dozunda %30.65 olarak elde edilmiştir.

Canlılığı devam ettirme açısından farklı eksplantlar 2 grup oluşturmuştur. Eksplant değerleri %0-47.60 arasında değişmiştir. En yüksek değeri sürgün ucu eksplantı 400 Gy dozunda %47.60 ile vermiştir. En düşük değer ise %0 ile her iki eksplantın 600 Gy dozundan elde edilmiştir.

Eksplant, doz interaksyonu canlılığı devam ettirme gözlemi bakımından istatistik olarak önemli çıkmıştır. Eksplantların canlılığını devam ettirme oranına bakıldığında ortalama en yüksek değer %28.48 ile sürgün ucu eksplantından elde edilmiştir. Görüldüğü gibi Dinçer çeşidinde eksplantlar canlılığını devam ettirmesi için sera ortamına alınca genel olarak %20 oranına gerilemiştir.

Radyasyona bağlı olarak dozlar arttıkça sürgün ucu eksplantlarında değerlerde belli bir doza kadar artış gözlenmiştir. Hipokotil eksplantlarında ise azalış sonra artış gözlenmiştir. Değerlerdeki bu oynama diğer çalışmalarda da gözlenmektedir.

Turan (2007) Berkmen 469 Double Haploid buğday çeşidine Cs 137 kaynağı kullanarak 50-350 Gy doz aralığında gama ışını uygulamıştır. Uygulanan gama dozlarının canlılık değerlerinde azalmalara neden olduğunu saptamışlardır. Kontrolde canlı bitki sayısı 150 iken, 50 Gy de 147, 100 Gy de 142 ve 150 Gy de 138'e gerilediğini, 200 Gy de tekrar artışla 146 olduğunu ve 300-350 Gy de bu değer tekrar düştüğünü kaydetmişlerdir. Her iki çalışmada da uygulanan gama dozlarının canlılığa etkisi istatistiksel olarak önemli çıkmıştır.

Dinçer çeşidinde incelenen kallus oranı, kök uzunluğu ve canlılığını devam ettirenlerin oranı özellikleri ortalamalarına bakıldığında 400 Gy dozunda en iyi sonucu verdiği gözlenmiştir. Sürgün oluşturan eksplant oranı, sürgün oluşturan eksplantlarda eksplant başına sürgün sayısı ve köklenme oranı özellikleri açısından ise 200 Gy dozu ortalama olarak en iyi sonucu vermiştir. Tüm alınan gözlemler incelendiğinde dozlar arttıkça değerler birbirleri ile ilintili olarak genel anlamda 400 doza kadar artmış ya da sabit kalmıştır. Köklenme oranı değerlerinin ise 500 Gy dozuna kadar dozlar arttıkça arttığı tespit edilmiştir.

Shifa çeşidinde gama ışını dozlarının incelenen parametrelere etkisine ait sonuçlar

Kallus oranı, sürgün oluşturan eksplant oranı ve eksplant başına sürgün sayısı:

Shifa çeşidi kallus oranı, sürgün oluşturan eksplant oranı ve eksplant başına sürgün sayısına ait değerlerin varyans analizi çizelge 9, ortalama değerler ve oluşan gruplar çizelge 10 de verilmiştir.

Çizelge 9. Shifa çeşidine uygulanan farklı gama ışını dozlarının kallus oranı, sürgün oluşturan eksplant oranı ve eksplant başına sürgün sayısına ilişkin varyans analizi sonuçları

Varyasyon Kaynakları	Serbestlik derecesi	Kallus Oranı (%)		Sürgün Oluşturan Eksplant Oranı (%)		Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet)	
		K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F
Tekerrür	2	27.265	4.404	4.790	0.941	0.001	1.000
Eksplant	1	4.459	0.720	102.516	20.138*	0.001	1.000
Hata1	2	6.191		5.091		0.001	
Doz	5	131.405	13.685**	620.208	60.277**	0.092	33.280**
Eksplant x Doz int.	5	71.480	7.444**	482.658	46.909**	0.081	29.200**
Hata2	20	9.602		10.289		0.003	
TOPLAM	35						

* 0.05, ** 0.01 ihtimal seviyesinde önemli

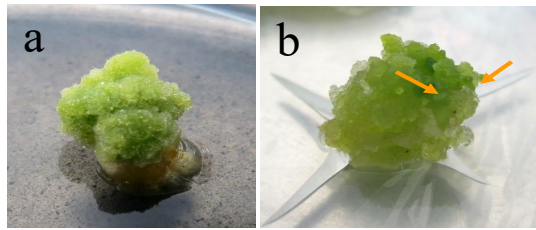
Shifa çeşidi kallus oluşturan eksplant oranı ve eksplant başına sürgün sayısı açısından farklı dozlar ve interaksiyon (eksplant x doz) %1 düzeyinde önemli bulunmuştur. Farklı eksplantlar önemsiz bulunmuştur. Sürgün oluşturan eksplant oranı açısından incelendiğinde farklı eksplantlar istatistik olarak %5 düzeyinde önemli bulunmuştur. Farklı dozlar ve interaksiyon (eksplant x doz) istatistik olarak %1 düzeyinde önemli bulunmuştur (Çizelge 9).

Çizelge 10. Shifa çeşidine uygulanan farklı gama ışını dozlarının kallus oranı, sürgün oluşturan eksplant oranı ve eksplant başına sürgün sayısına ilişkin etkilerine ait ortalama değerler ve oluşan gruplar

Doz (Gy)	Kallus Oranı (%)			Sürgün Oluşturan Eksplant Oranı (%)			Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet)		
	Eksplant		Ortalama	Eksplant		Ortalama	Eksplant		Ortalama
	Hipokotil	Sürgün Ucu		Hipokotil	Sürgün Ucu		Hipokotil	Sürgün Ucu	
0 (Kontrol)	20.00 cd	23.33 bcd	21.66 a	60.00 a	33.33 d	46.66 a	0.60 a	0.33 d	0.47 a
200	26.66 abc	20.00 cd	23.33 a	53.33 ab	26.66 de	39.99 bc	0.53 ab	0.27 de	0.40 bc
300	33.33 a	16.66 de	24.99 a	43.33 c	43.33 c	43.33 ab	0.43 c	0.43 c	0.43 ab
400	16.66 de	30.00 ab	23.33 a	26.66 de	46.66 bc	36.66 c	0.27 de	0.47 bc	0.37 c
500	13.33 ef	13.33 ef	13.33 b	20.00 e	33.33 d	26.66 d	0.20 e	0.33 d	0.27 d
600	10.00 f	10.00 f	10.00 b	0.00 f	26.66 de	13.33 e	0.00 f	0.27 de	0.13 e
Ortalama	19.99	18.89	19.44	33.88 b	34.99 a	34.44	0.34	0.35	0.34
LSD (Doz)	3.732			3.863			0.06596		
LSD (Eks.)	-			3.236			-		
LSD(E.xD)	5.278			5.463			0.09329		
CV(%)	12.07			9.32			15.3		

Şifa çeşidinde kallus oluşturan bitkilerin sayısı oranlandığında doz ortalama değerleri %10-24.99 aralığında değişmiştir (Çizelge 10). Farklı dozlar 2 grup oluşmuştur. 0-200-300-400 Gy dozlar ve 500-600 Gy dozlar aynı grupta yer almıştır.

Kallus oluşturan bitkilerde eksplant, doz interaksyonu istatistik olarak önemli bulunmuştur. En yüksek değerleri %33.33 ile hipokotil eksplantı 300 Gy dozunda ve sürgün ucu eksplantı 400 Gy dozunda %30.00 olarak vermiştir. En düşük değer ise sürgün ucu ve hipokotil eksplantlarının 600 Gy dozundan elde edilmiştir. Şifa çeşidinde ışınlar rejenerasyon oranını kontrole göre artırmıştır. Fakat değerler dalgalanmalı olarak seyretmiş stabil ya da paralel ilerlememiştir.



Şekil 4. a Şifa çeşidi 400 Gy dozda hipokotil eksplantlarından 23 gün sonra kallus oluşumu, b Şifa çeşidi 200 Gy dozda sürgün ucu eksplantlarından 23 gün sonra kallustan somatik embriyo oluşumu

Şekil 4 a’da 23 gün sonra hipokotil eksplantlarından sağlıklı ve yeşil kalluslar gözlenmektedir. Şekil 4 b de ise sürgün ucu eksplantlarının kalluslarından somatik embriyo oluşumu gözlenmektedir. Kalluslar seyrek, yeşil lekelerle kaplı ve yumru halinde oluşmuşlardır (Şekil 4). Kallus oluşumundaki yapısal farklılıkları Smerea ve ark. (2018) aspirde yaptıkları çalışmalarında hipokotil eksplantlarından elde ettikleri kallusların daha seyrek yapıya olduğunu ve yaprak eksplantlarından elde ettikleri kallusların daha kompakt ve yeşil renkte olduğunu belirtmişlerdir. Eksplant tipine göre kallusta yapısal farklılıklar bu çalışmada da kaydedilmiştir. BAPxNAA kullanılarak yapılan diğer çalışmalarda da bu durum aynı gözlenmiştir (Radhika ve ark., 2006). Özyiğit ve ark. (2002) 5 farklı ayçiçeğinde hipokotil ve kotiledon eksplantlarını kullanarak en yüksek oranda direk sürgün rejenerasyonunu 1 mg/L BAP+0.5 mg/L NAA konsantrasyonlarından elde etmişlerdir. Afrasiab ve Javed (2010) patates çeşitlerinin (Desiree ve Diamant) genetiğini geliştirmek için *in vitro* teknikler ve mutagen uygulamalardan faydalanmışlardır Her iki çeşitte inter-nodal eksplantlar kullanılarak kallus elde etmek için NAA (1.0 mg / L) ve BAP (0.5 mg / L) ile desteklenmiş MS ortamı kullanılmıştır. İyi gelişen kalluslar 5-50 Gy lik gama ışınına maruz bırakılmıştır. En uygun kallus oluşum dozunu 20 Gy olarak bulmuşlar, bu doza kadar artış daha sonrasında ise doz artışına bağlı olarak bir azalış gözlenmiştir. Bu çalışmada da BAPxNAA kullanılmış ve kallus oluşumunda hipokotil eksplantları 300 Gy doza kadar, sürgün ucu eksplantları ise 400 Gy doza kadar hemen hemen artış göstermiş; bu dozlardan sonra değerler azalmıştır. Çalışmalar bu sonuçlar açısından paralellik arz etmektedir.

Sürgün oluşturan eksplant oranına bakıldığında ortalama doz değerleri %13.33-46.66 arasında değişmiştir (Çizelge 10). Farklı dozlar 5 grup oluşturmuştur. En yüksek ortalama değerler sırasıyla kontrol ve 300 Gy dozlarında, %46.66 ile %43.33 olarak bulunmuştur. En düşük değer %13.33 ila 600 Gy dozdan elde edilmiştir.

Sürgün oluşturan eksplant oranı açısından farklı eksplantlar 2 grup oluşturmuştur. Değerler %0-60.00 arasında değişmiştir. En yüksek değerler sırasıyla hipokotil eksplantının kontrol dozu ile 200 Gy dozundan %60 ve %53.33 olarak elde edilmiştir. En düşük değer ise yine %0 ile hipokotil eksplantının 600 Gy dozundan elde edilmiştir. Hipokotil eksplantında kendi arasında dozlara göre azalarak ilerlemiş 600 Gy dozda %0 a kadar düşmüştür.

Sürgün oluşturan eksplant oranı bakımından eksplant, doz interaksyonu istatistik olarak önemli bulunmuştur. Eksplantların sürgün oluşturan eksplant ortalamaları incelendiğinde sürgün ucu eksplantı %34.99 ile daha fazla sürgün oluşturmuş ve hipokotil eksplantına göre farklı grupta yer almıştır.

Sürgün oluşturan eksplantlarda eksplant başına sürgün sayısı ortalama doz değerleri 0.13-0.47 adet arasında değişiklik göstermiştir (Çizelge 10). Farklı dozlar 5 grup oluşturmuştur. En yüksek ortalama değerler kontrol dozu ile 200 Gy dozundan sırasıyla 0.47 adet ile 0.43 adet olarak bulunmuştur. En düşük değer 0.13 adet ile 600 Gy dozundan elde edilmiştir.

Eksplant başına sürgün sayısı bakımından eksplantlar arasında istatistik olarak fark çıkmamıştır. Fakat eksplant, doz interaksyonu önemli bulunmuştur. Eksplant başına sürgün sayısı değerleri 0-0.60 adet arasında değişmiştir. En yüksek değerler hipokotil eksplantının kontrol dozu ile 200 Gy dozlardan sırasıyla 0.60 ve 0.53 adet olarak elde edilmiştir. En düşük değer ise yine 0 adet ile hipokotil eksplantının 600 Gy dozundan elde edilmiştir. Hipokotil eksplantlarda ışınlama sonrası rejenerasyon kabiliyetinin yüksek olduğunu (Smerea ve ark., 2018) fakat kullanılan eksplantın yanında genotipik farklılıklarında ışınlamaya bağlı olarak farklı seyredeceğini ve tüm bu süreçlerin genotipe bağlı olarak değişeceğini (Radhika ve ark., 2006, Basalma ve ark., 2008; Motamedi ve ark., 2011) göz önünde bulundurmak gerekir. Sürgün oluşturan eksplant sayısı ve eksplant başına sürgün sayısı bakımından aspirin farklı çeşitleri kullanılarak birçok çalışma yapılmış ve sonuçta çeşitler arasında farklılık ortaya çıkmıştır (Radhika ve ark., 2006). Kalluslardan oluşan sürgünler genellikle 1-3 adet arasında değişmektedir. Direk oluşan sürgünlerde de durum hemen hemen aynıdır. BAP kullanılarak yapılan diğer çalışmalarda da eksplant başına sürgün sayıları benzerdir (Radhika ve ark., 2006).

Mandal ve Gupta (2001) aspirin 8 farklı çeşidinde direk sürgün oluşumu ve bitki rejenerasyonu üzerine yaptığı çalışmalarında BAP' ın farklı konsantrasyonlarını denemişlerdir. Sonuçta eksplant başına sürgün sayısı Bhima çeşidinden MS ortamına ekledikleri 8.87 µM BAP konsantrasyonundan elde etmişlerdir. Bu çalışmada en iyi eksplant başına sürgün sayısı değeri Shifa çeşidinde ışınlanmamışlarda çıkmıştır.

Muthusamy ve ark. (2007) yerfıstığında mutagenlerin somatik embriyo oluşumu ve bitki rejenerasyonuna etkisini araştırmak için embriyogenik kallusları 10-50 Gy dozlarında γ radyasyona maruz bırakmışlar veya 1-5 mM etil metan sülfonat (EMS) ya da sodyum azit (SA) ile muamele etmişlerdir. Somatik embriyoları filizlenmesi için 2.0 mg/L BAP ve 0.25 mg/L NAA ile MS ortamında kültüre almışlardır. Eksplant başına

somatik embriyoların sayısını mutagenlerin düşük konsantrasyonlarda (30 Gy / 3 mM) daha yüksek bulmuşlardır.

Köklenme oranı, kök sayısı, kök uzunluğu ve canlılığın devamlılığı:

Shifa çeşidi köklenme oranı, kök sayısı, kök uzunluğu ve canlılığın devamlılığına ait değerlerin varyans analizi çizelge 11, ortalama değerler ve oluşan gruplar çizelge 12’ de verilmiştir.

Çizelge 11. Shifa çeşidine uygulanan farklı gama ışını dozlarının köklenme oranı, kök sayısı, kök uzunluğu ve serada canlılığını devam ettirmesine ilişkin varyans analizi sonuçları

Varyasyon Kaynakları	Serbestlik derecesi	Köklenme oranı (%)		Kök sayısı (adet)		Kök uzunluğu (cm)		Canlılığını devam ettirme (%)	
		K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F	K.O.	F
Tekerrür	2	21.560	3.294	0.583	1.105	0.057	0.147	2.183	0.062
Eksplant	1	630.680	96.359*	7.111	13.473	0.025	0.065	145.604	4.116
Hata1	2	6.545		0.528		0.388		35.376	
Doz	5	1170.105	122.289**	7.133	27.913* *	4.928	38.783**	1876.732	146.561**
Eksplant x Doz int.	5	585.501	61.191**	1.178	4.609**	1.671	13.149**	296.289	23.138**
Hata2	20	9.568		0.256		0.127		12.805	
TOPLAM	35								

* 0.05, ** 0.01 ihtimal seviyesinde önemli

Shifa çeşidi köklenme oranı açısından incelendiğinde farklı eksplantlar istatistik olarak %5 düzeyinde önemli bulunmuştur. Farklı dozlar ve interaksiyon (eksplant x doz) istatistik olarak %1 düzeyinde önemli bulunmuştur. Kök sayısı, kök uzunluğu ve canlılığını devam ettirme açısından incelendiğinde farklı dozlar ve interaksiyon (eksplant x doz) istatistik olarak %1 düzeyinde önemli bulunmuştur. Farklı eksplantlar istatistik olarak önemsiz bulunmuştur (Çizelge 11).

Shifa çeşidinde; sürgün oluşturan eksplantların köklenme oranına dair ortalama doz değerleri %16.50-67.66 arasında değişmiştir (Çizelge 12). Farklı dozlar 4 grup oluşturmuştur. En yüksek ortalama değer 300 Gy dozda 67.66 olarak kaydedilmiştir. 0-200-400 Gy dozlar aynı grupta yer almışlardır. En düşük değer %16.50 olarak 600 Gy dozda kaydedilmiştir.

Köklenme oranına bakımından farklı eksplantlar istatistik olarak önemli çıkmış ve 2 grup oluşturmuştur. Değerler %0-82 arasında değişmiştir. En yüksek değerler sürgün ucu eksplantında 300-400 Gy dozlarından sırasıyla %82 ile %76.66 olarak elde edilmiştir. En düşük değer ise hipokotil eksplantından 600 Gy dozundan %0 ile elde edilmiştir.

Köklenme oranı bakımından eksplant, doz interaksiyonu da istatistik olarak önemli bulunmuştur. Eksplantların ortalama köklenme oranlarına bakıldığında sürgün ucu eksplantı %54.50 ile en yüksek değeri vermiştir.

Çizelge 12. Shifa çeşidine uygulanan farklı gama ışını dozlarının köklenme oranı, kök sayısı, kök uzunluğuna ve canlılığını devam ettirmeye ilişkin etkilerine ait ortalama değerler ve oluşan gruplar

Doz (Gy)	Köklenme oranı (%)			Kök sayısı (adet)			Kök uzunluğu (cm)			Canlılığını devam ettirme (%)		
	Eksplant		Ortalama	Eksplant		Ortalama	Eksplant		Ortalama	Eksplant		Ortalama
	Hipokotil	Sürgün Ucu		Hipokotil	Sürgün Ucu		Hipokotil	Sürgün Ucu		Hipokotil	Sürgün Ucu	
0 (Kontrol)	66.60 b	44.33 de	55.46 b	3.67 ab	3.33 bc	3.50 ab	3.00 abc	2.40 cde	2.70 b	16.70 d	61.10 a	38.90 c
200	62.20 bc	60.66 bc	61.43 b	3.33 bc	4.33 a	3.83 a	2.67 bcd	2.17 de	2.42 b	37.70 c	61.10 a	49.40 ab
300	53.33 cd	82.00 a	67.66 a	2.67 cd	3.67 ab	3.17 bc	3.17 ab	3.58 a	3.38 a	46.66 bc	46.66 bc	46.66 ab
400	38.86 ef	76.66 a	57.76 b	2.33 de	3.33 bc	2.83 c	3.50 a	3.25 ab	3.38 a	61.10 a	43.33 bc	52.21 a
500	50.00 d	30.33 f	40.16 c	1.33 f	1.67 ef	1.50 d	3.27 ab	2.07 de	2.67 b	50.00 b	38.87 c	44.43 bc
600	0.00 g	33.00 f	16.50 d	0.00 g	2.33 de	1.17 d	0.00 f	1.82 e	0.91 c	0.00 e	0.00 e	0.00 d
Ortalama	45.16 b	54.50 a	49.83	2.22	3.11	2.67	2.60	2.55	2.57	35.35	41.84	38.60
LSD (Doz)	3.725			0.6093			0.4292			4.310		
LSD (Eks.)	3.669			-			-			-		
LSD (ExD)	5.268			0.8617			0.6070			6.095		
CV(%)	7.08			18.96			13.85			10.05		

Shifa çeşidinde köklenenler kök sayısı açısından incelendiğinde ortalama doz değerleri 1.17- 3.83 adet arasında değişiklik göstermiştir (Çizelge 12). Farklı dozlar 4 grup oluşturmuştur. Kontrol dozu ile 200 Gy doz aynı grupta yer almış ve sırasıyla 3.50 ile 3.83 adet değerini almıştır. 500-600 Gy dozlar aynı grupta yer almıştır.

Kök sayısı açısından farklı eksplant tipleri istatistiki olarak önemli çıkmamıştır. Fakat eksplant, doz etkisiyle önemli çıkmıştır. Eksplantların kök sayısı değerleri 0-4.33 adet arasında değişmiştir.

Shifa çeşidinde köklenenlerde kök uzunlukları ortalama doz değerleri 0.91- 3.38 cm arasında değişiklik göstermiştir (Çizelge 12). Farklı dozlar 3 grup oluşturmuştur. 0-200-500 Gy dozlar ve 300-400 Gy dozlar aynı grupta yer almıştır. En yüksek kök uzunluğu değerli 300-400 Gy dozlardan 3.38 cm olarak elde edilmiştir. En düşük değer 600 Gy dozdan 0.91 cm olarak elde edilmiştir.

Kök uzunluğu değerleri açısından eksplantlar arasındaki fark önemli çıkmamıştır. Eksplant, doz etkisiyle önemli bulunmuştur. Kök uzunluğu değerleri 0-3.58 cm arasında değişmiştir. En düşük değer hipokotil eksplantında 0 cm ile 600 Gy dozundan elde edilmiştir.

Shifa çeşidinde köklenip biraz büyüdükten sonra 3-4 cm çapında saksılara alınan bitkiciklerin serada canlılığını devam ettirmesi açısından incelenmişlerdir. Canlılığını devam ettirenlerin doz ortalamaları oranı %0-52.21 oranında değişiklik göstermiştir (Çizelge 12). Farklı dozlar 4 grup oluşturmuştur. 200-300-400 Gy dozlar en yüksek değerleri vermiştir. En düşük değer ise 600 Gy dozdan %0 olarak elde edilmiş ve bu dozda bitkiler serada canlı kalamamışlardır.

Canlılığı devam ettirme açısından farklı eksplant tipleri istatistiki olarak önemli çıkmamıştır. Fakat eksplant, doz etkisiyle önemli çıkmıştır. Eksplantların canlı kalma oranı değerleri %0-61.10 arasında değişmiştir. En yüksek değerler sürgün ucu eksplantının kontrol dozu ve 200 Gy dozlarında ayrıca hipokotil eksplantının 400 Gy dozunda %61.10 ile elde edilmiştir.

Doku kültürü çalışmaları sonunda serada bitkilerin gelişiminde ve tabla oluşturup tohum bağlamasında bazı farklılıklar yaşandı. Bu farklılıklar uygulanan mutagen kaynağından ileri gelmektedir. Bitkinin cılız olmasına, tabla oluşturmamasına, tabla oluştursa dahi küçük olmasına, tohum bağlamamasına, tohum bağlasa dahi az olmasına ve bazende kuruyup gitmesine sebep olmaktadır.

Muthusamy ve ark. (2007) yerfıstığında hipokotil den elde ettikleri embriyogenik kallusları γ -radyasyona maruz bırakmışlar veya 1-5 mM etil metan sülfonat (EMS) ya da sodyum azit (SA) ile muamele etmişlerdir. Canlı kalma yüzdesini mutagenlerin düşük konsantrasyonlarda (30 Gy / 3 mM) eksplantında daha yüksek bulmuşlardır. Bu çalışmada sürgün ucu eksplantlarında gözlenen durum aynıdır. Doz artışına bağlı olarak gama uygulamasının düşük dozları daha etkili sonuç vermiştir. Hipokotil eksplantında ise durum doz artışına bağlı olarak artış göstermiştir.

Shifa çeşidinde incelenen kallus oranı ve köklenme oranı özellikleri ortalamalarına bakıldığında 300 Gy dozunda en iyi sonucu verdiği gözlenmiştir. Sürgün oluşturan eksplant oranı ve sürgün oluşturan eksplantlarda eksplant başına sürgün sayısı açısından değerlerin dozlar arttıkça azalarak ilerlediği gözlenmiştir. Kök uzunluğu ve canlılığı devam ettirenlerin oranları açısından incelendiğinde değerler 400 Gy dozuna kadar artmış, bu dozdan sonra azalarak devam etmiştir. Tüm alınan gözlemler incelendiğinde dozlar arttıkça değerler birbirleri ile ilintili olarak genel anlamda 300-400 doza kadar artmıştır.

Sonuç

İyonize radyasyon uygulamalarının in vitro da verdiği yanıtların, etkinliği standardize edilmiş ve incelenen özelliklere gama ışını dozlarının olumlu etki yaptığına dair başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Kontrol dozları ile yapılan ön çalışmada; Remzibey çeşidinde sürgün ucu eksplantı ve hipokotil eksplantı sürgün oluştururken yaprak eksplantından hiç sürgün elde edilememiştir. Dinçer çeşidinde sürgün ucu eksplantı en iyi sonucu vermiş yaprak ve hipokotil eksplantlarından da sürgünler elde edilmiştir. Shifa çeşidinde en fazla sürgün, sürgün ucu eksplantından ve daha sonra hipokotil eksplantından elde edilirken yaprak eksplantından hiç sürgün elde edilememiştir. Bu sonuçlar ışığında farklı eksplant tiplerinin sürgün rejenerasyonuna etkisinde farklı olduğu söylenebilir. Ayrıca her çeşidin uygulanan hormon kombinasyonlarına cevabı da genotipik farklılıklardan dolayı çeşitli olmuştur. Eksplant tiplerinin değişiminde hormonların etkisinin farklı farklı ortaya çıkmasına yol açmıştır.

Tüm ön uygulamalardaki sonuçlar göz önüne alınacak olursa hipokotil ve sürgün ucu eksplantlarının adventif sürgün rejenerasyonu için aspirde daha uygun olduğu sonucuna varılabilir. Bunun yansira genotipik farklılıklardan dolayı adventif sürgün rejenerasyonunu artıran hormon kombinasyonlarının Remzibey çeşidinde 4 mg/L TDZ ve 0.2 mg/L NAA içeren, Dinçer çeşidinde 1 mg/L TDZ içeren ve Shifa çeşidinde ise 2 mg/L NAA ve 2 mg/L BAP içeren MS besin ortamları olduğu sonucuna varılmıştır. Hormonların ve ortam kombinasyonlarının her üç çeşitte de farklı olması aspir çeşitlerindeki genetik farklılıktan kaynaklanmaktadır. Böylece araştırılan özellikler bakımından her çeşidin cevabıda farklı olacaktır.

Çalışmada her çeşit için ayrı bir ortam elde edilmesi in vitro çalışmalarda adventif sürgün rejenerasyonuna etki eden faktörlerden en önemli olan birinin bitki büyüme düzenleyicileri olduğu ortaya çıkmıştır. Eğer bitki büyüme düzenleyicileri (oksin- sitokininler) iyi bir kombinasyonla ortaya konulursa bu durumun adventif sürgün rejenerasyonunu artıracak bir gerçektir.

Çalışmada kallus oluşumu Remzibey çeşidinde azalırken Dinçer ve Shifa çeşitlerinde doz artışına bağlı olarak her çeşitte değişmek koşuluyla bazı dozlara (300-400 Gy) kadar artmıştır. Bu durum aslında rejenerasyon kapasitesi çok düşük olan aspirin ışınlama yolu bazı parametrelere yine her çeşitten çeşide değişmekle beraber pozitif etkiler yapacağını gözler önüne sermiştir. Karakterlerin etkisi ve ışınlamaya verdiği tepki çeşitten çeşide farklılık göstermektedir ki bu bitkinin genotipik yapısındanır.

Kallus oluşum oranı açısından en yüksek değer kontrol dozlarında Remzibey çeşidinden elde edilmiştir. Dinçer ve Shifa çeşitlerinde ise doz uygulamasıyla kallus oranında artış gözlenmiştir. Sürgün oluşturan eksplant oranı tüm çeşitlerde doz uygulaması ile artmıştır. Remzibey çeşidinin rejenerasyon kabiliyeti diğer çeşitlerden daha yüksek çıkmıştır. Kök sayısı ve kök uzunluğu değerleri incelendiğinde çeşitlere göre farklılıklar olmuştur. Kök uzunluğu değerleri de her iki eksplant için en yüksek değeri Remzibey çeşidinde 500 Gy dozda, Dinçer ve Shifa çeşitlerinde 400 Gy dozda vermiştir.

Canlılık açısından çeşitler incelendiğinde, çalışmada gama ışını dozlarının doku kültürü sonrası çeşide göre değişmekle beraber canlılığında bazı dozlarda artmış olması ve genelde doz arttıkça belli bir noktaya kadar artması olumlu bir sonuçtur. Çalışmada bitkinin rejenerasyon kabiliyetinin artırılmasının yanı sıra canlı kalması ve tohum vermesi de kontrol dozlarına göre artmıştır. Bitkide gama uygulamasıyla canlılığın yani direncin artması; bazı aminoasitlerin biyosentezinde uyarıldığı, ayrıca temel biyokimyasal olayların, fotosentez ve mineral alımında artışının açık bir göstergesidir. Bunun yanı sıra gama uygulaması ile canlılığın artışı çoğunlukla bitkilerin yapraklarında gözlenen polifenol oksidaz, katalazlar ve pyroksidazlar gibi bazı enzimlerin aktivitelerinde değişimlerinde bir sonucudur.

Yapılan çalışmada kallus oluşumunun artması ve bu artışa bağlı olarak kalluslar üzerinde hiç sürgün elde edilememesi, elde edilse dahi bunların uzun süre canlılığını koruyamaması aspride dozların rejenerasyona etkisini belirlemek amacıyla bu çalışma için sürgün oluşumuna bakılması gerekliliğini ortaya koymuştur. Direk olarak sürgün oluşumu daha başarılı olmuştur.

Remzibey çeşidinde sürgün ucu eksplantı, Dinçer ve Shifa çeşitlerinde ise hipokotil eksplantı adventif sürgün rejenerasyonunu çeşitlere göre ve kendine has ortamlarında artıran önemli eksplant tipleridir. Eksplant başına sürgün sayısı değerleri de bu veriler ve sonuçlarla benzerlik göstermektedir. Kallus oluşumu ile ya da kallus oluşturmada eksplant başına sürgün sayısı değerleri bu çalışmada 1-3 adet arasında değişmiştir. Bu çalışmada genotipler arasında farklılık olması ve farklı eksplantların kullanılması alınan gözlemlerin çeşitten çeşide, eksplanttan eksplanta farklılık göstermesine sebep olmuştur.

Köklenme oranı açısından çeşitler birbirleri ile farklılık göstermiştir. Ayrıca ön çalışma sonuçları Remzibey ve Dinçer çeşitlerinin Shifa çeşidinden daha iyi bir köklenme potansiyeline sahip olduğunu göstermiştir. Yine en iyi köklenme oranı Remzibey ve Dinçer çeşitlerinde hipokotil eksplantlarından elde edilmiştir.

Kök sayısı bakımından doz artışına bağlı olarak genelde Remzibey ve Shifa çeşitlerinde azalış, Dinçer çeşidinde artış gözlenmiştir. Kök uzunluğu bakımından Remzibey çeşidinde her iki eksplantta 500 Gy dozda, Dinçer ve Shifa çeşitlerinde her iki eksplantta 400 Gy dozda en yüksek değere ulaşmıştır.

Bu çalışmada 600 Gy dozunda laboratuvar koşullarında araştırılan kriterlerin etkinliğinin ve rejenerasyon oranının düştüğü görülüyor. Mutajenik verimliliğin ve etkinliğin sıklığının daha yüksek dozlarda daha düşük olduğu bir gerçektir. Mutasyon uygulamalarda yüksek mutasyon frekansı elde etmek her zaman istenilen bir özelliktir. Ancak artan dozların öldürücü ve gelişmeyi kısıtlatıcı etkileride göz önüne alınması gerekir.

Bu sonuçlar ışığında görülüyor ki optimize edilmiş bir rejenerasyon sistemi bulunmayan çeşitlerde ileri ki dönemde ıslaha yardımcı olmak ve ışık tutmak amacıyla çalışmalar yapmak oldukça zordur. Bu nedenle bu tip çalışmalar önemlidir. Bu çalışma ile aspir bitkisinin her üç çeşidinde yapılacak in vitro çalışmalara yardımcı olacak bilgiler belirlenmiş olmaktadır. Bundan sonra yapılacak double haploid çalışmaları, protoplast füzyonu çalışmaları ve diğer ıslah çalışmaları özellikle asperde soğuğa ve kurağa toleranslı bitkiler geliştirmek için bu sonuçların elde edilmesi oldukça önemlidir.

Teşekkür

Proje kapsamında bu çalışmayı finanse eden Tarım ve Orman Bakanlığı Tarımsal Araştırma ve Politikalar Genel Müdürlüğü'ne ve tüm çalışmalar süresince her türlü desteği sağlayan Ankara Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'ne teşekkür ederiz. Çalışmanın tüm aşamalarında bilgi birikimi ile desteklerini sunan sayın Prof. Dr. Serkan URANBEY'e de teşekkür ederiz. Makale araştırma ve yayın etiğine uygun olarak hazırlanmış olup, makalenin bilimsel, etik ve hukuki sorumluluğu bütünüyle yazarlara aittir. Makalenin yayımlanması ile ilgili olarak, yazarlar arasında bir çıkar çatışması olmadığını teyit ederiz.

Kaynakça

- Aasim, M., Khawar, K. M. and Özcan, S. 2009. Comparison of shoot regeneration on different concentrations of thidiazuron from shoot tip explant of cowpea on gelrite and agar containing medium. *Notulae Botanicae Horti Agrobotonici Cluj*, 37: 89-93.
- Afrasiab, H. and Javed, I. 2010. In vitro techniques and mutagenesis for the genetic improvement of potato cvs. *Desiree and diamant. Pak. J. Bot.*, 42(3): 1629-1637.
- Arslan, Y., Katar, D., Güneşlioğlu, H., Subaşı, İ., Şahin, B. ve Bülbül, A. S. 2010. Türkiye Florasındaki Yabani *Carthamus L.* Türleri ve Aspir (*C. tinctorius L.*) İslahında Değerlendirme Olanakları. *Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 19 (1-2): 36-43.
- Barakat, M. N. and El-Sammak, H. 2011. In vitro mutagenesis, plant regeneration and characterization of mutants via RAPD analysis in Baby's breath *Gypsophila paniculata L.* *Australian Journal of Crop Science*, 5(2): 214-222.

- Başalma, D., Uranbey, S., Mirici, S. and Kolsarici, O. 2008. TDZ x IBA induced shoot regeneration from cotyledonary leaves and in vitro multiplication in safflower (*Carthamus tinctorius* L.). *African Journal of Biotechnology*, 7 (8): 960-966.
- Beyaz, R. and Yıldız, M. 2017. The Use of Gamma Irradiation in Plant Mutation Breeding. *Plant Engineering*, 34-46.
- Çiftçi, C. Y., Türkan, A. D., Khawar, H. M., Atak, M. and Özcan, S. 2006. Use of Gamma Rays to Induce Mutations in Four Pea (*Pisum sativum* L.) Cultivars *Turk J Biol.*, 30: 29-37.
- Fan, L. and Guo, M. 2013. Progress of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) regeneration through tissue culture. *Journal Med. Coll. of PLA.*, 28(5): 289-301.
- Ivanova, R. and Smerea, S. 2018. Effects of seeds irradiation with gamma-ray on plant growth and yield attributing characters of safflower. *Oltenia-studiisi comunicari stiintele naturii*, 34(2): 51-56.
- Jain, S. M. 2010. In vitro mutagenesis in banana (*Musa* spp.) improvement. *Acta Hortic.*, 879: 605–614.
- Köse, A., Koşar, F. and Bilir, Ö. 2018. Agricultural Performances of Some Safflower (*Carthamus tinctorius* L.) Lines Developed by Single Plant Selection Method. *Journal of Agricultural Sciences*, 24(1): 1-11.
- Kumar, P. and Ratnam, S. 2010. Mutagenic effectiveness and efficiency in varieties of sunflower (*Helianthus annuus* L.) by separate and combined treatment with gamma- rays and sodium azide. *African Journal of Biotechnology*, 9 (39): 6517-6521.
- Kumar, B., Kumar, S. and Thakur, M. 2012. In vitro mutation and selection of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* Tzelev) lines with improved resistance to *Septoria obesa* Syd. *International Journal of Plant Research*, 2(4): 103-107.
- Motamedi, J., Zebarjadi, A., Kahrizi, D. and Salmanian, A.H. 2011. In vitro propagation and Agrobacteriummediated transformation of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) using a bacterial mutated *aroA* gene. *Australian J. Crop Science*, 5(4): 479-486.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15: 473-497.
- Murashige, T. 1974. Plant regeneration through tissue cultures. *Annual Review of Plant Physiology*, 25: 135-166.
- Muthusamy, A., Vasanth, K., Sivasankari, D., Chandrasekar B.R. and Jayabalan, N. 2007. Effects of mutagens on somatic embryogenesis and plant regeneration in groundnut. *Biologia Plantarum*, 51 (3): 430-435.
- Özdemir, F. A. ve Türker, M. 2014. Yabani Aspir'in (*Carthamus persicus* Wild) in vitro Çoğaltımında Farklı BAP-NAA Kombinasyonlarının Etkisi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi*, 5: 30-35.
- Özyiğit, I.I., Bajrovic, K., Gözükırmızı, N., Semiz, B.D. 2002. Direct Plant Regeneration from Hypocotyl and Cotyledon Explants of Five Different Sunflower Genotypes (*Helianthus annuus* L.) From Turkey. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 16(1): 8-11, Doi: 10.1080/13102818.2002.10819148.
- Özyiğit, I.I., Gozukirmizi, N., Semiz, B.D. 2007. Genotype Dependent Callus Induction And Shoot Regeneration in Sunflower (*Helianthus annuus* L.). *African journal of biotechnology*, 6(13).

- Polat, T. 2007. Farklı Sıra Aralıkları ve Azot Seviyelerinin Kuru Şartlarda Yetiştirilen Aspir (*Carthamus tinctorius* L.) Bitkisinin Verim ve Verim Unsurları Üzerine Etkisi. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Radhika, K., Sujatha, M. and Nageshwar, R.T. 2006. Thidiazuron stimulates adventitious shoot regeneration in different safflower explants. *Biologia Plantarum*, 50: 174-179.
- Singh, N. K. and Balyan, H. S. 2009. Induced mutations in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) cv. Kharchia 65 for reduced plant height and improve grain quality traits. *Advances in Biological Research*, 3(5-6): 215-221.
- Smerea, S., Andronic, L. and Schin, V. 2018. Morphogenetic potential of calluses derived from gamma irradiated safflower seeds. *Oltenia-studii si comunicari stiintele naturii*, 34(2): 67-71.
- Sujatha, M. and Kumar, V.D. 2007. In vitro bud regeneration of *Carthamus tinctorius* and wild *Carthamus* species from leaf explants and axillary buds. *Biologia Plantarum*, 51: 782-786.
- Şahin Demirbağ, N. Kendir, H. ve Aasim, M. 2008. Yaygın mürdümük (*Lathyrus sativus* L.)’te Adventif Sürgün Rejenerasyonu. *Tarım Bilimleri Dergisi*, 14(3):297-302.
- Şanver, P. ve Göksoy, A. T. 2019. Hibrid ayçiçeği genotiplerinde korelasyon ve path analizi. *Bursa Uludag Üniv. Ziraat Fak. Derg.*, 33(2): 235-248.
- Talat, K. and Anwar, S. Y. 2010. High frequency somatic embryogenesis and plantlet regeneration via somatic embryos in safflower (*Carthamus tinctorius* L.). *Biosciences Biotechnology Research Asia*, 7: 239-249.
- Turan, H. N., 2007. Gama ışınlamanın makarnalık buğday bitkisinde (*Triticum durum* Desf.) haploid embriyo üretimi ve bitki regenerasyonuna etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı.
- Xue, Y., Li, D., Gao, Y. and Guo, M. 2015. Optimization of *Carthamus tinctorius* L. tissue culture system based on the combination of 1-naphthylacetic acid and 6-benzyl aminopurine. *Pharmaceutical Care and Research*, 15(2): 91-94.
- Verma, R. C. and Shrivastava, P. 2014. Radiation-induced reciprocal translocations in safflower (*Carthamus tinctorius* L.). *Cytologia*, 79(4): 541-545.
- Walia, N., Kaur, A., Babbar, S. B. 2007. Proliferation and differentiation from endosperms of *Carthamus tinctorius*. *Biologia Plantarum*, 51: 49-753.

