

Etil Metan Sülfonat Mutageninin Pamuk Çeşitlerinde (*Gossypium hirsutum* L. ve *Gossypium barbadense* L.) Tohum Çimlenmesine Etkisi

Ramazan Şadet GÜVERCİN^{1*}, Mehtap ERAYMAN², Güven BORZAN², Ahmet Furkan GÜVERCİN³

¹Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Türkoğlu Meslek Yüksek Okulu, Kahramanmaraş, Türkiye

²Doğu Akdeniz Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Kahramanmaraş, Türkiye

³Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Kahramanmaraş, Türkiye

*Sorumlu yazar: rguvercin@ksu.edu.tr

Özet

Bitkilerin genetik yapılarında, doğal veya yapay olarak meydana gelen ani değişimlere mutasyon denir. Bu çalışma, Etil metan sülfonat (EMS) kimyasal mutageninin, pamukta tohum çimlenmesine etkisini belirlemek amacıyla, Doğu Akdeniz Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü/Kahramanmaraş'ta yürütülmüştür. Çalışmada, Teks (*Gossypium hirsutum* L.) ve Aşkabat 100 (*Gossypium barbadense* L.) çeşitleri bitki materyali, EMS % 0.5 v/v, EMS % 1 v/v dozları ve saf su kimyasal materyal olarak kullanılmıştır. Uygulama süreleri ise 6 ve 12 saat olarak belirlenmiştir.

Çalışma sonucunda, tohumların çimlenme oranı, uygulama doz ve süresine göre farklılık göstermiştir. Kontrol uygulamanın çimlenme oranı, uygulama süresi 6 saatten 12 saate yükseldiğinde artarken, EMS % 0.5 v/v ve EMS % 1 v/v dozlarında azalmıştır. En düşük çimlenme oranı, EMS % 1 v/v dozunun 6 saat uygulamasında görülürken, aynı dozun 12 saat uygulaması Aşkabat 100 pamuk çeşidinin çimlenme oranına engelleyici etki yapmıştır

Anahtar Kelimeler: Pamuk, mutasyon, etil metan sülfonat (EMS)

Effect of Ethyl Methanesulfonate on Seed Germination of Cotton (*Gossypium hirsutum* L. and *Gossypium barbadense* L.)

Abstract

Natural or artificial changes in the genetic structure of plants are called mutations. This study was carried out at East Mediterranean Transitional Zone Agricultural Research Institute in Kahramanmaraş in order to determine the effect of Ethyl methane sulfonate (EMS) on germination of cotton (*Gossypium spp.*) seeds. In the study, Teks (*Gossypium hirsutum* L.) and Aşkabat 100 (*Gossypium barbadense* L.) varieties were used as plant materials. Two doses of EMS (0.5% v/v and 1% v/v) and distilled water were used as chemical materials. Furthermore, durations of administration of the doses were determined as 6 and 12 hours.

As a result of the study, the germination rate of seeds differed according to the application dose and duration. The germination rates of seeds in the control application have increased in 12 hour application time in contrast to 6 hour application time, but decreased in the 0.5% v/v and 1% v/v doses of EMS. On the other hand, while the 1% dose of EMS has attracted attention with the lowest germination rate in 6 hour application, and had been showed lethal effect at 12 hour application for Aşkabat 100 cultivar

Keywords: Cotton, mutation, ethyl methane sulfonate (EMS)

1. Giriş

Mutasyon, canlıların genetik yapısını değiştiren bir fenomen olup, bitki ıslahında kullanılmaktadır (Çancı ve ark. 2015). Mutasyon

ıslahının temel amacı, genetik varyasyonun azaldığı, buna karşılık benzerliğin yükseldiği popülasyonlarda, genetik çeşitliliği arttırmaktır. İlk defa Muller (1927) tarafından, meyve sineğinde (*Drosophila melanogaster*) saptanan

mutasyonlar, gen, kromozom veya genom üzerinde kalıcı, geçici, onarıcı ya da yıkıcı etki yapabilmektedir. Dahası, eşey hücrelerinde oluşan mutasyonlar, takip eden kuşaklara aktarılırken, somatik hücrede oluşan mutasyonlar aktarılamadığından, canlının ölümüyle kaybolur.

Mutasyonlar, mutagen olarak isimlendirilen Isı, Ph ve çeşitli ışınlar (Gama ışını, X ışını, Kobalt 60 vd.) gibi çok sayıda fiziksel ya da dietil sülfat, sodyum azide ve etil metal sülfonat (EMS) gibi kimyasalların etkisiyle yapay veya doğal olarak meydana gelirler (Sağel ve ark.1994). Kimyasal mutagenlerin yaygınlığı ise radyasyon (fiziksel) yayanlara oranla daha azdır.

EMS, bitkilerde mutagenik, memelilerde ise kanserojen etkili kimyasal bir ajandır. Bu mutagen, kromozom çoğalması aşamasında nükleotid katlanmaları yoluyla nokta mutasyonları oluşturmaktadır (Brown ve ark. 2013). Mutagen, çoğunlukla Guanin/Citosin'nin Adenin/Timin'e dönüşümünü gerçekleştirerek, yavru döllerde yüksek oranda varyasyon oluşturmakta, bu nedenle de pamuk ıslahında kullanılmaktadır (Brown ve ark. 2013).

Ayrıca, fiziksel mutagenler bitkinin tohum, polen, stolon, yumru, soğan, tomurcuk gibi generatif ve vegetatif üreme organlarına veya bitkinin tamamına uygulanırken, kimyasallar daha çok tohumu uygulanabilmektedir.

Malvaceae familyasının (Gadelha ve ark. 2014) bir üyesi olan pamuk, tohumunda bulunan liflerin yanı sıra, ortalama % 20 yağ, % 19-24 protein içeriğiyle insan ve hayvan beslenmesi yönünden, Türkiye için önemli bir bitkidir (Kaplan ve ark. 2017). Yaklaşık 50 türe sahip bitkinin *Gossypium hirsutum* L., *Gossypium barbadense* L., *Gossypium herbaceum* L. ve *Gossypium arboreum* L. türleri ticari değer taşımaktadır. Bu türlerden *Gossypium hirsutum* L.ve *Gossypium barbadense* L. $2n=52$, *Gossypium herbaceum* L. ve *Gossypium arboreum* L. ise $2n=26$ kromozoma sahiptir (Wendel ve Cronn, 2003).

Pamuğun günümüzde bazı sorunları bulunmaktadır. Örneğin, verim, çırçır randımanı ve lif kalitesi arasında var olan negatif ilişkinin yanı sıra daralmış gen havuzu, tür içi veya türler arası melezlemelerde ilerlemeyi sınırlamaktadır (Erkılınç ve Karaca, 2005). Mutasyon ıslahı, bu durumun çözümü olabilmektedir. Dahası, pamuk tohumunun ıslatılma, kurutma dondurma, ısıtma gibi özelliklere sahip olması bu çalışmaları kolaylaştırmaktadır.

Pamuk genetiğinde varyasyon oluşturan mutagenlerin (Atilla ve Peşkirioğlu, 1990;

Gençer ve ark. 1992) kolay kullanım ve yüksek etkinliğe sahip olduğu bildirilmiştir (Percy ve ark. 2015). Naivar (1996) başarımın sınırlı olduğunu belirlerken, buna karşılık, Ahloowalia ve ark. (2004) çok sayıda tür ve pamukta mutant tipler geliştirildiğini, Silme ve Çağırğan (2006) erkenci mutantlarla (NIAB 78), Pakistan'ın on yılda 3 milyar dolarlık gelir sağladığını, Lowery ve ark. (2007) EMS % 3 v/v dozunun tohum canlılığını % 50'den fazla engellediğini, Kocatürk ve ark. (2015) ise havsız tohumlu mutant pamuk geliştirdiklerini bildirmiştir.

Bu çalışma, Etil metan sülfonat mutageninin, Teks ve Aşkabat 100 pamuk çeşitlerinde, tohum çimlenmesine etkisini belirlemek amacıyla, Kahramanmaraş'ta yürütülmüştür.

2. Materyal ve Metot

Bu çalışma, Doğu Akdeniz Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü/Kahramanmaraş'ta yürütülmüştür. Çalışmada, Teks (*Gossypium hirsutum* L.) ve Aşkabat 100 (*Gossypium barbadense* L.) çeşitleri bitki materyali, Etil metan sülfonat ise kimyasal mutagen olarak kullanılmıştır. Çalışma öncesi, çeşitlerin üç yıllık kendilenmiş tohumları, musluk suyu + 25 °C'de çimlenme testine alınmış ve daha sonra, % 90-95 oranında çimlenen bitkilerin diğer tohumları kullanılmıştır.

Çalışmaya tohumlarda nem içeriğinin sabitlenmesiyle başlanmıştır. Bunun için % 60 gliserol çözeltisi ve kurutucu kullanılmış ve tohum nem içeriği % 8'de sabitlenmiştir. Daha sonra, bu tohumlar, oda sıcaklığında (20-22°C) dört saat distile (saf) suda bekletilmiş ve tohumlara su emdirilmiştir. Şişen her 25'er tohum, kâğıt havluyla kurulandıktan sonra altında ve üstünde iki kat kâğıt havlu olan petrilere aktarılmıştır.

Çalışmada çeşitlere ait konular tesadüf parselleri deneme deseninde, üç tekerrürlü düzenlenmiştir. Çeşitlerin 250 tohumu (10 petri) bir tekerrür olarak kabul edilmiştir. Bu işlemin bitiminde ise hacimde yüzde (% v/v) = (çözünen sıvının hacmi (mL)/çözeltinin hacmi (mL) x 100) yöntemiyle önceden hazırlanan EMS % 0.5 v/v ve EMS % 1 v/v çözeltileriyle kontrol (distile su), tohum başına en az 1 ml olacak şekilde petrilere eklenmiş ve petrilere 24 °C'de karanlık ortamda, çimlenme dolabına aktarılmıştır. 6 ve 12 saatin sonunda, çimlenme dolabından alınan tohumlar 1/3 torf + 1/3 kum + 1/3 toprak içeren viyollere 2 cm derinlikte ekilmiş ve 7 gün sonra çimlenme oranları belirlenmiştir. Uygulamalara ait veriler JMP 5.0.1 programında varyans analizine

tutulduktan sonra, ortalamaların önemlilikleri $LSD_{0.05}$ (*Least significant differences/Asgari önemli fark*) testiyle belirlenmiştir (SAS, 2002).

3. Bulgular ve Tartışma

Çalışma sonucunda varyasyon kaynaklarından çeşitler, uygulamalar ve uygulama sürelerinin yanı sıra interaksyonlar önemli bulunmuştur (Çizelge 1). Kontrol uygulamaya ait çimlenme ortalaması, EMS uygulamalarından daha yüksek bulunurken (Çizelge 3), EMS % 0.5 v/v uygulamasında % 76.6, EMS % 1 v/v uygulamasında % 47.1 saf suda ise (kontrol) % 89.8 çimlenme oranı ortalaması görülmüştür (Çizelge 3).

Ayrıca, uygulamaların çeşitlere olan etkisi benzer olmuştur. Teks ve Aşkabat 100 çeşitleri, en yüksek çimlenme oranına kontrol uygulamada (Teks: % 90, Aşkabat 100: % 89.5) ulaşırken, bunu EMS % 0.5 v/v (Teks: % 83.5, Aşkabat 100: % 69.5) ve EMS % 15 v/v (Teks: % 70.5, Aşkabat 100: % 23.5) izlemiştir (Çizelge 3). Aşkabat 100 çeşidine ait çimlenme oranının kontrol uygulama hariç, hem EMS % 0.5 v/v hem de EMS % 1 v/v uygulamalarında, Teks çeşidinden daha az olduğu ise Çizelge 2 ve Çizelge 3'ten görülmektedir (Çizelge 3).

Diğer yönden, Teks çeşidinin uygulamalar ortalamasına ait çimlenme oranı % 81.3, Aşkabat 100 çeşidinin çimlenme oranı ise % 60.8 bulunmuştur (Çizelge 2 ve Çizelge 3). Mutagen dozu arttıkça, çimlenme oranında görülen azalmanın Atıla ve Peşkirçioğlu (1990)'nun aksine, Yazıcı ve ark. (2006) ile benzerlik gösterdiği bildirilirken, *Gossypium barbadense* L. türünün mutagen uygulamalarına daha duyarlı olduğu yönündeki bildirimler de (Hrishi ve Kamalam, 1969; İbragimov ve Kovalchuk, 1973) sonuçlarımızla uyum göstermiştir.

Çeşitlerin çimlenme oranına uygulama sürelerinin etkisi de önemli bulunmuştur (Çizelge 1 ve Çizelge 4). Aşkabat 100'ün çimlenme oranları; 6 saat uygulamada % 85.0 (kontrol) ile % 47 (EMS % 1 v/v), 12 saat uygulamada ise % 94.0 (kontrol) ile % 00.0 (EMS % 1 v/v) arasında değişirken, Teks'in çimlenme oranları; 6 saat uygulamada % 88.0 (kontrol) ile % 86 (EMS % 0.5 v/v), 12 saat uygulamada ise % 92 (kontrol) ile % 54.0 (EMS % 1 v/v) arasında değişmiştir (Çizelge 2).

Çalışmada, Çeşit x uygulama sürelerinin yanı sıra çeşit x uygulama, uygulama x uygulama süresi ve çeşit x uygulama x uygulama süresine ait interaksyonlar önemli bulunmuştur (Çizelge 1, Çizelge 3 ve Çizelge 4).

Teks ve Aşkabat 100 çeşitleri 12 saat uygulama süresi yerine, 6 saat uygulama süresinde daha yüksek çimlenme oranına ulaşırken, Teks çeşidinin çimlenme oranı, 6 saatlik uygulama % 87.0, 12 saatlik uygulamada % 75.6, buna karşılık Aşkabat 100 çeşidinin çimlenme oranı 6 saat uygulamada % 68.7, 12 saat uygulamada ise % 53.0 oranında gerçekleşmiştir (Çizelge 4). Ayrıca, uygulama süresi, 6 saatten 12 saate yükseldiğinde, kontrol uygulamanın çimlenme oranı % 86.5'ten % 93.0'a yükselirken, EMS % 0.5 v/v uygulamasında % 80.9'dan % 73.0'a, EMS % 1 v/v uygulamasında ise % 67'den % 27.0'a inmiştir (Çizelge 5).

4. Sonuçlar

Çalışma sonucunda, etil metan sülfonatın (EMS) pamuk tohumunda çimlenmeyi etkilediği belirlenmiştir. Bu etki, türe, çeşide, doza ve uygulama süresine göre farklılık gösterirken, Teks çeşidi, farklılıklardan daha az, Aşkabat 100 ise daha çok etkilenmiştir.

En yüksek çimlenme oranı kontrol, en düşük çimlenme oranı ise EMS % 1v/v uygulamasında görülürken, mutagenlerin 6 saat uygulanması, 12 saat uygulanmasından daha önemli bulunmuştur.

Ayrıca, EMS % 1 v/v 6 saat uygulaması Aşkabat 100 çeşidinde % 50, EMS % 1 v/v 12 saat uygulaması ise 100 çimlenmeyi % 100 engelleyici (Lethal doz) uygulamalar olmuştur.

Sonuç olarak, Aşkabat 100 için EMS % 1 v/v dozunun 6 saat, Teks çeşidi için de yine EMS % 1 v/v dozunun 12 saat uygulaması, mutagenik etkinin önemli olduğu doz ve süreler olduğu söylenebilir.

Teşekkür

Yazarlar, verdikleri destekten dolayı Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü'ne teşekkür eder.

Kaynaklar

- Ahloowalia, B.S., Maluszynski, M., Nichterlein, K., 2004. Global Impact of Mutation-Derived Varieties. *Euphytica* 135:187–204.
- Atıla, A.S., Peşkirçioğlu, H., 1990. Gamma Radyasyonunun Çukurova 1518 Pamuk Çeşidi Üzerine Etkisi. *Bilimsel Araştırmalar ve İncelemeler* No: 22. T.A.E.K. Nükleer Tarım Araştırma Merkezi. Ankara.
- Brown, N., Smith, C.W., Auld, D., Hequet, E.F., 2013. Improvement Of of Upland Cotton Fiber

- Quality Through Mutation of TAM 94L-25., Crop Science, 53, 452-459.
- Çancı, H., İnci, N.E., Baloğlu, F.Ö.C., Yıldırım, T., 2015. Inheritance of Rose-Flowered Mutation in Chickpea (*Cicer arietinum* L.). Tarım Bilimleri Dergisi, 23: 208-212.
- Erkılınc A., Karaca M., 2005. Assessment of Genetic Variation in Cotton Varieties (*Gossypium hirsutum* L.) Grown in Turkey Using DNA Microsatellites. Akdeniz Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Dergisi, 18:201-206
- Gadelha, I.C.N., Fonseca, N.Y.S., Oloris, S.C.S., Melo M.M., Blanco, B.S., 2014. Gossypol toxicity from cotton seed products. Hindawi Publishing Corporation The Scientific World Journal, Article ID 231635, 11 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2014/231635>
- Gençer, O., Gülyaşar, F., Şekeroğlu, E., Boyacı, S., Oğlakçı, M., Güveloğlu, M., 1992. Pamuk bitkisinde (*Gossypium hirsutum* L.) Ethyl Methane Sulphonate ve Kobalt 60'ın mutasyon etkileri üzerinde araştırmalar. Doğa Dergisi, 16 (3): 471-4S6486.
- Hrishi, N., Kamalam, P., 1969. Studies on radio sensitivity in tetraploid cottons. Symposium on radiation and radiometric substances in mutation breeding, BARC, Mumbai.
- İbragimov, S.H.I., Kovalchuk, R.I., 1970. Mutagenesis in cotton. Seleksii semenovodstva khlopschatnika, 3: 237-245.
- Kaplan, M., Fidan, MS, Kökten, K., Ülger, İ., 2017. Bazı Pamuk Çeşitlerinin (*Gossypium hirsutum* L.) Çiğitlerinin Kimyasal Kompozisyonu in Vitro Gaz Üretimi. Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Dergisi, 14(2), 93-99
- Kocatürk, H.K., Dolançay, A., Süllü, S., Özbek, B., Anay, A., 2015. Doğu Akdeniz Bölgesi'nde melezleme ve mutasyon ıslahı ile lif kalitesi yüksek ve verimli yeni pamuk çeşitlerinin geliştirilmesi Projesi Sonuç Raporu. TAGEM/TA/11/05/02/002.
- Lowery, C., Auld, D., Bechere, E., Wright, R., Hequet, E., Abidi, N., Smith, W.C., 2007. Use Of Chemical Mutagenesis In Improving Upland Cotton. <https://werc.confex.com/werc/2007/techprogram/P1849.HTM>(30.12.2019)
- Muller, HJ., 1927 Artificial Transmutation of the Gene.Science, 66: 84-87.
- Naivar, K.S., 1996. Fiber Quality Parameters and Within-Boll Yield Components of *Gossypium arboreum* L Putative Mutant Lines. M.S. Thesis. Texas A&M University. 71 p.
- Percy, R., Hendon, B., Bechere, E., Auld, D., 2015. Qualitative Genetics and Utilization Of Mutants. *Cotton*, 155-186.
- Sağel Z, Tutluer M, Peşkirioğlu H., 1994. Bitki Islahında Mutasyonlar. Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi. 3(1-2): 95-112.
- SAS., 2002. A Business Unit of SAS Copyright, 1989-2002, SAS Institute Inc. <http://www.jmp.com>.
- Silme, R. S., Çağırğan, M.İ., 2006. Mutasyon Teknikleriyle Geliştirilmiş Çeşitlerin Ekonomik Katkısı. Tarım ekonomisi kongresi, s: 885-893, Antalya.
- Wenden, J.F., and Cronn, R.C., 2003. Polyploidy and The Evolutionary History of Cotton. inAdvances in Agronomy, p 140-182.
- Yazıcı, L., Çoban, M., Çiçek, S., Tuncel, N., Küçükataban, F., 2016. Nazilli 663 pamuk (*Gossypium hirsutum* L.) Çeşidinde Farklı Gama Işını Dozlarının M₁ Bitkilerinde Fide Gelişimi Üzerine Etkisi Ve Uygun Gama Dozunun Belirlenmesi. Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi, 25 (Özel sayı-2):88-93, Ankara.

Çizelge 1. Varyasyon kaynaklarının serbestlik derecesi, kareler ortalaması ve F değerleri

Table 1. Degree of freedom of variation sources, mean squares and F values

Varyasyon kaynakları Sources	Serbestlik Derecesi Degree of freedom	Kareler ortalaması Mean squares	F _(0.01)
Tekerrür Replication	2	0.335	0.049
Çeşitler Varieties	1	3782.25 *	549.84
Uygulamalar Applications	2	5746.75 *	835.43
Uygulama süresi Applications period	1	1640.25 **	238.45
Çeşitler x Uygulamalar Varieties x Applications	2	1716.75 *	249.57
Çeşitler x Uygulama süresi Varieties x Applications periods	1	42.25 *	6.14
Uygulamalar x Uygulama süresi Applications x Applications period	2	1716.75 *	249.57
Çeşitler x Uygulama x Uygulama süresi Varieties x Applications x Applications period	2	67.75 *	9.85
Hata Error	22	22.58	
Genel Total	35	688.93 *	
(CV (%))			3.69
CV: Değişim katsayısı (Coefficient variation)			

*; P<0.05. **; p<0.01. öd (ns); önemli değil (non-significant)

Çizelge 2. Çeşitlerin uygulama sürelerine ait çimlenme oranları

Table 2. Germination rates on period of applications of cultivars

Çeşitler Varieties	Uygulamalar Application						Ortalamalar Means (%)
	Kontrol Control		EMS % 0.5 v/v		EMS % 1 v/v		
	6 saat 6 hour	12 saat 12 hour	6 saat 6 hour	12 saat 12 hour	6 saat 6 hour	12 saat 12 hour	
Teks	88.0	92.0	86.0	81.0	87.0	54.0	81.3 a
Aşkabat 100	85.0	94.0	74.0	65.0	47.0	0.0	60.8 b
Ortalamalar Means	86.5	93.0	80.0	73.0	67.0	27.0	71.1
LSD _{0.05} Çeşitler LSD _{0.05} Varieties							11.81

Çizelge 3. Çeşitler x uygulamalar interaksyonuna ait çimlenme oranları

Table 3. Germination rates of varieties x applications interactions

Uygulamalar Applications	Çeşitler Varieties		Ortalamalar Means (%)
	Teks	Aşkabat 100	
Kontrol (Control)	90.0 a	89.5 ab	89.8 a
EMS % 0.5 v/v	83.5 ab	69.5 b	76.5 a
EMS % 1 v/v	70.5 ab	23.5 c	47.1 b
Ortalamalar Means	81.3 a	60.8 b	71.1
LSD _{0.05} Uygulamalar LSD _{0.05} Applications			14.46
LSD _{0.05} Çeşitler x Uygulamalar LSD _{0.05} Varieties x Applications			20.45

Çizelge 4. Uygulama süresi x çeşit interaksyonuna ait çimlenme oranları

Table 4. Germination rates of applications period x varieties interactions

Uygulama süresi Application period	Çeşitler Varieties		Ortalamalar Means (%)
	Teks	Aşkabat 100	
6 saat 6 hour	87.0 a	68.7 bc	77.8 a
12 saat 12 hour	75.6 ab	53.0 c	64.3 b
Ortalamalar Means	81.3 a	60.9 b	71.1
LSD _{0.05} Uygulama süresi LSD _{0.05} Application period			11.81
LSD _{0.05} Çeşit x Uygulama süresi LSD _{0.05} Varieties x Application period			16.70

Çizelge 5. Uygulama x uygulama süresine ait çimlenme oranları

Table 5. Germination rates of applications x applications period interactions

Uygulamalar Applications	Uygulama süresi Application periods		Ortalamalar Means (%)
	6 saat 6 hour	12 saat 12 hour	
Kontrol (Control)	86.5 ab	93.0 a	89.8 a
EMS % 0.5 v/v	80.0 ab	73.0 ab	76.5 a
EMS % 1 v/v	67.0 b	27.0 c	47.1 b
Ortalamalar Means	77.8 a	64.3 b	71.1
LSD _{0.05} Uygulamalar LSD _{0.05} Applications			14.46
LSD _{0.05} Uygulamalar x Uygulama süresi LSD _{0.05} Applications x Application period			20.44