

Aspir (*Carthamus tinctorius* L.) Bitkisinde Zigotik Embriyoları İçeren Tohum Taslaklarının Kültürü ile Melez Islah Hatlarının Geliştirilmesi

Hüseyin UYSAL^{1*} Emine ASLAN¹ Özge ERDEN¹

¹Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü
Sorumlu Yazar: huseyin.uyasal@adu.edu.tr

Özet: Bu çalışmada Aspir (*Carthamus tinctorius* L.) bitkisinde melezlemeden sonraki 12. günde zigotik embriyoları içeren tohum taslaklarının kültürü ile aspride ıslah sürecinin kısaltılması hedeflenmiştir. Araştırmada Dinçer 5-118, Remzibey-05 ve Balcı aspir çeşitleri kullanılmış olup, yarım diallel melezleme yöntemine göre melezleme yapılmıştır. Melezlemede genel başarı oranı %48.55 oranında gerçekleşmiş olup, araştırma süresince toplam 150 tabladan 584 adet tohum taslağı kültüre alınmıştır. Sonuç olarak kültüre alınan embriyolarda meydana gelen rejenerasyon bakımından en yüksek başarı oranı M5519 besi ortamından elde edilirken (%15.82), bunu MSD4 (%13.43), ve LS2.5 besi ortamları (%6.21) takip etmiştir. Sonuç olarak aspride embriyo veya tohum taslağı kültürü tekniği kullanılarak hibrit tohum üretimi sağlanabilir ve bu sayede ıslah süreci kısaltılabilir. Bu sonuçlara dayanarak embriyo kültürü amacıyla kullanılacak besi yerinin BAP ve 2.4-D hormonlarını içermemesi, büyüme düzenleyicilerinin tohum çimlenmesi gerçekleşip bitki elde edildikten sonra ortama dahil edilmesi başarı oranını arttıracaktır.

Anahtar Kelimeler: Aspir, Emriyo Kültürü, Tohum Taslağı Kültürü, Melezleme

Development of Hybrid Breeding Lines by Immature Seeds Culture Containing Zygotic Embryos of Safflower (*Carthamus tinctorius* L.) Plant

Abstract: In this study, the shortening of the breeding period was targeted in safflower (*Carthamus tinctorius* L.) by zygotic immature seeds culture on the 12th day after hybridization. Dinçer 5-118, Remzibey-05 and Balcı varieties were used in this study and the hybridizations were done according to half-diallel hybridization method. The general success rate was 48.55% in hybridization and 584 numbers zygotic immature seeds were cultured from 150 receptacle during the study. As a result, the highest success rate of regeneration in cultured embryos was obtained from M5519 medium (15.82%) followed by MSD4 (13.43%) and LS2.5 mediums (6.21%). As a result, hybrid seed production can be achieved by using the embryo or zygotic immature seeds culture technique in the safflower and the breeding process can be shortened. Based on these results, the nutrient media, used for embryo culture, should not be including hormones such as BAP and 2.4-D. If the growth regulators are added after seed germination and the plant is obtained, will be increase success rate.

Keywords: Safflower, Embriyo culture, Immature seed culture, Hybridization

Giriş

Aspir, Compositae (Asteraceae) familyasından tek yıllık ve otsu yapıda bir yağ bitkisidir. Kültürü yapılan aspir türünün (*Carthamus tinctorius* L.) kromozom sayısı $2n = 24$ olup geleneksel olarak tohumları ve çiçekleri için yetiştirilmektedir (Singh, 2007). Aspir tohumlarında % 13-46 arasında doymamış yağ asitlerince (özellikle oleik ve linoleik asitler) zengin bir yağ bulunmaktadır (Uysal ve ark., 2006; Golkar,

2014). Yağı, hem yemeklik hem de endüstriyel olarak değerlendirilirken, proteince zengin küspesi kaliteli bir hayvan yemidir. Cartharmin ve carthamidin gibi boyar maddeler içeren çiçekleri (yalancı safran) gıda, kozmetik ve tekstil boyamacılığında, ayrıca tıbbi amaçlarla ve tatlandırıcı olarak kullanılmaktadır (Dajue ve Müller, 1996). Aspir tohumlarından elde edilen yağın yüksek oranda doymamış yağ

asitleri (% 78 linoleik asit) ve E vitamini içermesi nedeniyle insan beslenmesindeki önemi her geçen gün artmaktadır (Öztürk ve ark., 2007).

Aspir, kurak, sıcak ve soğuk gibi ekstrem koşullara dayanıklı bir bitki olması nedeni ile gerek kuru ve kıraç tarım alanlarında yetiştirilebilecek, gerekse tuzluluğa ve yabancı otlara karşı toleransı nedeni ile de sulu tarım alanlarında yetiştirilebilecek önemli bir bitkidir. Bu bitkinin ülkemiz kıyı şeridinde hem yazlık hem de kışlık olarak yetiştirilebiliyor olması ülkemiz açısından önemini bir kat daha arttırmaktadır (Baydar ve Erbaş, 2014).

Dünyada 2016 yılı verilerine göre 1.140.002 ha alanda 948.516 ton aspir tohumu üretilirken Türkiye’de 39.352 ha alanda 58.000 ton aspir tohumu üretilmiştir (FAO, 2018). Ülkemizin aspir üretim potansiyeli çok yüksek olmasına rağmen olması gereken üretim miktarının çok altında üretim gerçekleştirilmektedir. Bunun temel nedenleri ise aspirin yağ oranı ve tohum veriminin diğer yağ bitkilerine göre düşük kalması (Culpan ve Arslan, 2017), bitkinin yeteri kadar bilinmiyor olması, ülkemizde geliştirilen çeşit sayısının yetersiz olması ve geliştirilen bu çeşitlerin üreticiye yeteri kadar intikal ettirilememiş olmasıdır. Ülkemizde hali hazırda yerli tohumluk olarak tescil ettirilmiş Yenice 5-38, Dinçer 5-118 (5-18-1), Remzibey-05, Balcı, Linas, Olas, Asol, Göktürk ve Hasankendi çeşitleri ile üretim iznli Zirkon ve Olein çeşit adayları vardır (TTSM, 2018). Yeni geliştirilmiş aspir çeşitleri ile yağ oranı artırılmış olsa da aspirin ülkemizde ekonomik olarak diğer yağ bitkileri (ayçiçeği ve kanola gibi) ile rekabet edebilmesi için en az onlar kadar tohum verimi ve yağ oranı olan yeni aspir çeşitleri geliştirilmelidir (Culpan ve Arslan, 2017).

Aspirde çiçeklerin çok küçük olması nedeni ile melezlemede güçlükler söz konusudur. Özellikle emaskulasyon aşaması geniş çapta melez tohum eldesi için çok ciddi sorun oluşturmaktadır. Bu sorunu aşmak için giberallik asit (GA₃) kullanılarak yapay erkek kısırlığı oluşturularak önemli oranda melez tohum elde edilebilmektedir (Deshmukh and Ranga Rao, 1989; Parmeshwarappa et al., 1996; Payaga et al.

2001; Baydar and Gökmen, 2003; Mayerhofer et al., 2011; Ada, 2012)

Dünyada bitki ıslahında kullanılan biyoteknolojik uygulamalar aspir ıslahı çalışmalarına yeterince yansımamıştır. Aspir bitkisinde ıslah çabalarının istenilen ölçüde ilerleyememiş olması, biyoteknolojik araçların ıslah basamaklarında yeterince kullanılmamasının etkisi büyüktür. Aspirin biyoteknolojik çalışmalara pek fazla konu olmamasının temel nedenlerinin başında bitkinin doku kültürüne uyum yeteneğinin zayıf olması gelmektedir (Narasimha Rao et al., 2008, Sujatha ve Dutta Gupta, 2013). Bitkinin tohum yapısı gereği hem tohumun yüzey sterilizasyonunda sıkıntı yaşanmaktadır hem de bitki özellikle eksplant kültürü aşamalarında besi ortamına salgılanan sekonder metabolitler bitki gelişimini olumsuz olarak etkilenmektedir. Dolayısıyla biyoteknolojik anlamda aspirde yapılacak her türlü çalışma büyük önem arz etmektedir.

Bitki doku kültürü tekniklerinden olan embriyo kültürü başta ıslah sürecinin kısaltılması ve türler arası melezlemelerden fertil bitkilerin elde edilmesi gibi çeşitli amaçlarla kullanılmaktadır. Embriyo kültürüne alternatif olarak yumurta, yumurtalık ve tohum taslağı kültürleri de kullanılmaktadır. Bu anlamda henüz daha olgunlaşmamış tohumları içeren tablaların sterilizasyonu ve içermiş olduğu tohum taslaklarının kültürü sayesinde aspirde yaşanan tohum sterilizasyon problemi önemli oranda aşılabilmektedir.

Bu çalışmada, aspir ıslah çalışmalarında kullanılacak bir tohum taslağı kültürü geliştirilmiştir.

Materyal ve Yöntem

Bu çalışmada Eskişehir Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma Enstitüsünden temin edilmiş olan Dinçer 5-118, Remzibey-05 ve Balcı Aspir çeşitleri kullanılmıştır. Melezlemelerde ebeveyn olarak kullanılacak bu çeşitlere ait tohumlar Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Ziraat Fakültesi araştırma serasında ½ bahçe toprağı ve ½ yanmış ahır gübresi karışımı içeren 3 kg’lık saksılara ekilmişlerdir. Çiçeklenme periyodunu geniş bir zamana yayabilmek

amacıyla ekimler 15'er gün ara ile 8 farklı zamanda gerçekleştirilmiştir. Çıkış yapan bitkilerin günlük sulama ve bakım işlemleri rutin olarak gerçekleştirilmiş ve çiçeklenme döneminde melezleme ve tohum taslağı kültürü çalışmalarına geçilmiştir.

Emaskulasyon (melezlemede ana olarak kullanılacak bitkilerden çiçek tozu keselerinin koparılıp uzaklaştırılması işlemi) ve melezleme Kayaçetin ve ark. (2012)'nin açıkladığı yönteme göre gerçekleştirilmiştir. Sabah erken saatlerinden tablanın ilk çiçek halkasındaki çiçekler kısırlaştırılmış ve ovaryumlar görünene kadar tablanın üzerindeki brakte yapraklar ince uçlu keskin bir makasla kesilerek atılmıştır. Tablanın dış halkasında bulunan çiçekler ovaryumları ile birlikte kesilerek atılmıştır. Döllenen olma ihtimaline karşı en dıştaki iki çiçek halkası da makasla kesilerek atılmıştır. Emaskulasyon sırasında her bir korolla tüpünde yer alan 5 adet anter filamentleriyle birlikte dikkatlice çıkarılmış, dışı organa zarar vermemeye özen gösterilmiştir, diğer çiçeklere polen bulaşmamasına dikkat edilmiştir.

Her bir emaskulasyon işleminden sonra aletler %70'lik etil alkolle sterilize edilerek polen bulaşıklığı engellenmiştir. Emaskulasyon olgunluğunda olan çiçeklerde dişiler tam anlamıyla henüz daha polen tozu kabul edebilecek olgunlukta değildir (Kayaçetin ve ark., 2012). Bu nedenle emaskulasyon işlemi sonrası emasküle edilen çiçekler etiketlenerek izolasyon torbaları ile kapatılmış ve tozlama işlemi ertesi sabah gerçekleştirilmiştir. Melezleme işleminde baba ebeveyn olarak kullanılacak olan bitkilerin tablaları bir gün önceden belirlenerek uzamış olan çiçekler yabancı polen almış olma ihtimaline karşılık kopartılarak uzaklaştırılmıştır. Ertesi sabah anterlerini braktenin dışına çıkarmış olan çiçekler melezlemede kullanılmıştır. Pens yardımı ile koparılarak alınan anterler dışı ebeveynin dişicik tepesi üzerine sürülerek tozlaştırma (polinasyon) işlemi gerçekleştirilmiştir.

Melezleme çalışmaları yarım diallel melezleme yöntemine göre gerçekleştirilmiş; bir çeşit ya ana ya da baba olarak seçilmiştir

(Remzibey x Dinçer, Remzibey x Balcı, Dinçer x Balcı). Burada esas olan bitkilerdeki mevcut çiçeklerin durumuna göre hareket edilmiş olup yapılan melezlerin hem anaları hem de babaları aynı ise hangisinin ana hangisinin baba olduğuna bakılmaksızın aynı kombinasyondan kabul edilmiştir.

Melezlemeden sonraki 12. günde melez tohum taslaklarını içeren tablalar bir makas yardımı ile tablanın hemen alt kısmından kesilerek steril saf su içerisinde laboratuvara getirilmiştir. Embriyo kültürü amacıyla tohum taslaklarını içeren tablaların sterilizasyonu bir bütün halinde gerçekleştirilmiştir. Ön sterilizasyon için öncelikle tablalar kısa süreli alkol ile muamele edilmiş ve sonrasında % 10 ACE marka çamaşır suyu içeren steril saf su çözeltisinde 10 dakika çalkalanarak muamele edilmiş sonrasında ise steril saf su ile 3-5 kez durulama işlemi gerçekleştirilmiştir. Bütün bu işlemler steril kabin içerisinde gerçekleştirilmiştir. Sterilizasyon işlemi sonrası tablalar ortadan ikiye kesilerek zigotik embriyoları içeren tohum taslakları izole edilerek Çizelge 1'de verilen besi ortamlarında kültüre alınmıştır.

Çizelge 1'de verilen besi ortamlarından M5519 hazır besi ortamı olarak temin edilmiş olup (Sigma-Aldrich Katalog no: M5519) besi ortamı hazırlanırken litreye 4.4 g hazır besi ortamından ilave edilmiş şeker ilavesi sonrası pH ayarlanmış ve agar ilave edilerek otoklavda steril hale getirilmiştir. MSD4 ve LS2.5 besi ortamları hazırlanırken ise önce stok solüsyonları hazırlanmış sonrasında bu stok solüsyonlarından besi ortamları hazırlanmıştır. Stok solüsyonları hazırlanırken makro elementler kendi içerisinde ayrı, mikro elementler kendi içerisinde ayrı, Na₂-EDTA ve FeSO₄.7H₂O ayrı bir stok solüsyonu, potasyum iyodür (KI) ayrı bir stok solüsyonu, her bir vitamin ve hormon da ayrı ayrı stok solüsyonu halinde hazırlanmıştır. Myo-Inostol ve şeker besi ortamı hazırlanırken her defasında tartılarak ortama ilave edilmiştir. Besi ortamı hazırlandıktan sonra pH ayarlanmış ve agar da ilave edilerek otoklavda sterilizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 1. Araştırmada kullanılan besi ortamları ve içerikleri (mg/l)
 Table 1. Mediums and their contents (mg/l) used in the study

Kimyasal Madde Chemicals	LS2.5 (mg.l ⁻¹)	MSD4 (mg.l ⁻¹)	M5519 (mg.l ⁻¹)
KNO ₃	1900	1900	1900
CaCl ₂ .H ₂ O	440	440	332.2
NH ₄ NO ₃	1650	1650	1650
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	370	180.7
KH ₂ PO ₄	170	170	170
Na ₂ -EDTA	37.25	37.25	37.25
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.85	27.85	27.85
H ₃ BO ₃	6.2	6.2	6.2
MnSO ₄ .H ₂ O	22.3	22.3	16.9
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6	8.6	8.6
KI	0.83	0.83	0.83
Na ₂ MoO ₄ .H ₂ O	0.25	0.25	0.25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025	0.025	0.025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025	0.025	0.025
Glycin	-	-	2.0
Myo-Inostol	100	100	100
Nicotinic asit	-	0.5	0.5
Pyrodoxine-HCl	-	0.5	0.5
Thiamin HCl	1.0	0.1	0.1
2,4-D	2.5	-	-
BAP	-	0.5	-
Sukroz	10 000	10 000	10 000
Agar	7 000	7 000	7 000
PH	5.8	5.8	5.8

Tohum taslaklarının kültüründen sonra düzenli olarak gözlemler alınmış, kontaminasyona uğrayan tohum taslağı olduğu takdirde kontaminasyonun gözlenmediği diğer tohum taslakları yeni besi ortamına alınarak kontaminasyonun yayılması engellenmiştir. Çimlenen tohum taslakları 30 g şeker içeren MSD4 besi yerinde kültüre alınmışlardır. Yeterli büyüklüğe ulaşan köklü bitkiler ½ oranında bahçe toprağı ve ½ oranında fide toprağı içeren saksılara dikilerek sera koşullarına aktarılmışlardır.

Gerek embriyo kültürüne alınan embriyoların gelişimi ve gerekse embriyo kültürü sonucu elde edilen bitkilerin gelişimi 24 °C sıcaklık, 16 saat aydınlık ve 8 saat karanlık içeren kültür şartlarında gerçekleştirilmiştir.

Araştırma sonucunda elde edilen verilerin değerlendirilmesinde ve grafiklerin

çizilmesinde Microsoft Excel Paket Programı kullanılmıştır.

Bulgular ve Tartışma

Bu araştırma kapsamında emasküle edilen çiçek tablası sayısı, tozlanan çiçek tablası sayısı, elde edilen melez tabla sayısı ve melezleme çalışmasından elde edilen başarı oranlarına ilişkin veriler Çizelge 2'de verilmiştir.

Araştırma kapsamında melezleme çalışmaları çiçeklenme durumuna göre gerçekleştirilmiş olup toplam 333 tabla emasküle edilmiş ve bunlardan sağlıklı dışı organ ihtiva eden 309 tablada tozlaşma işlemi gerçekleştirilmiştir. Tozlanan tablolardan 150 adet tabloda melezlemede başarı sağlanmıştır. Melezlemedeki genel başarı oranı %48.54 olarak gerçekleşmiştir.

Çizelge 2. Melezleme çalışmasına ilişkin veriler
Table 2. The data gained from hybridizations

Kombinasyonlar <i>Combinations</i>	Emasküle Edilen Tabla Sayısı <i>Number of Emasculated Heads</i>	Tozlanan Tabla Sayısı <i>Number of Pollinated Heads</i>	Melez Tabla Sayısı <i>Numbers of Crossed Heads</i>	Melezlemede Başarı Oranı (%) <i>Hybrid Success Rate (%)</i>
Remzibey x Dinçer	103	95	46	48.42
Remzibey x Balcı	121	112	51	45.54
Dinçer x Balcı	109	102	53	51.96
Toplam/Total	333	309	150	48.54

Melezlemedeki en yüksek başarı oranı %51.96 ile Dinçer x Balcı kombinasyonundan elde edilirken bunu %48.42 ile Remzibey x Dinçer ve %45.54 ile Remzibey x Balcı kombinasyonları takip etmiştir (Çizelge 2). Aspir çiçeklerinin küçük olması sebebi ile melezlemede zorluklar yaşanmakta ve başarı oranı düşüktür. Daha önceden yapılan çalışmalar incelendiğinde bu araştırmadan elde edilen bu sonuçlarla uyum içerisinde olduğu söylenebilir. Deshmukh ve Ranga Rao (1989); yapmış oldukları çalışmada elle tozlamada ortalama %49.5, Mayerhofer et al. (2011) %40 oranında, Köse (2016), %30-90 arasında değişen oranlarda melezlemede başarı/tohum tutma oranı tespit etmişlerdir.

Aspir çiçek yapısı itibari ile emaskulasyonu zor olan bir bitkidir (Deshmukh and Ranga Rao, 1989; Parmeshwarappa et al., 1996). Buna bağlı olarak elle yapılan emaskulasyonlarda dış

çiçeğin zarar görmesi buna bağlı olarak da başarı oranının düşmesi veya anterlerde kalıntı kalması nedeni ile elde edilen kapsülün gerçek melez olmaması ihtimali söz konusudur. Bu ise hibrit tohum üretimini olumsuz yönde etkileyen bir durumdur. Bu anlamda geniş çapta hibrit tohum üretiminde giberallik asit (GA₃) kullanılarak yapay erkek kısırlığı oluşturularak %95'e varan oranlarda emaskulasyon sağlanabileceği rapor edilmiştir. (Payaga et al. 2001; Baydar and Gökmen, 2003; Mayerhofer et al., 2011). Ancak Payaga et al. (2001) özellikle yüksek oranda kullanılan GA₃'in bitki boyunda ince ve uzun bir gelişime sebebiyet verdiğini, Baydar (2000) GA₃ uygulanmış bitkilerde tohum tutma ve hibrit tohum eldesinin düşük olduğunu bildirmişlerdir.

Elde edilen melez tablolardan kültüre alınan toplam tohum taslakları sayısı ve çiçek tablası başına düşen ortalama tohum taslağı sayısı Çizelge 3'de verilmiştir.

Çizelge 3. Kültüre alınan tohum taslağı sayılarına ilişkin veriler
Table 3. Numbers of cultured immature seeds

Kombinasyonlar <i>Combinations</i>	Melez Tabla Sayısı (Adet) <i>Number of Crossing Head</i>	Kültüre Alınan Tohum Taslağı Sayısı (Adet) <i>Number of Cultured Immature Seeds</i>	Tabla Başına Tohum Taslağı Sayısı (Adet) <i>Number of Immature Seeds per Head</i>
Remzibey x Dinçer	46	148	3.22
Remzibey x Balcı	51	212	4.16
Dinçer x Balcı	53	224	4.23
Toplam/Total	150	584	3.89

Çizelge 3'ün incelenmesinden de anlaşılacağı gibi toplam 150 adet melez tabladan 584 adet embriyo elde edilmiş olup tabla başına ortalama 3.89 adet embriyo oluşumu sağlanmıştır. Araştırma kapsamında en fazla Dinçer x Balcı kombinasyonundan zigotik tohum taslağı elde edilmiş olup yine tabla başına en fazla sayıda tohum taslağı aynı kombinasyondan elde edilmiştir (4.23 adet). Bunu 212 adet ile Remzibey x Balcı ve 148 adet ile Remzibey x Dinçer kombinasyonları takip etmiştir. Asperde bir çiçek tablası üzerinde ortalama olarak 20 ile 180 arasında çiçek ve dolayısıyla tohum taslağı bulunmaktadır. Bir tablanın çiçeklerinin tamamen açması ise hava şartlarına bağlı olarak 3 ile 7 gün arasında tamamlanmaktadır (Kayaçetin ve ark., 2012). Dolayısıyla melezleme açısından bu ciddi bir problemdir. Çünkü

melezleme olgunluğuna gelmiş bir tablada henüz polen tozu kabul edecek olgunluğu yakalamamış tohum taslakları bulunmaktadır. Bu da melezleme sonrası bir tabladan elde edilecek melez tohum sayısını azaltmaktadır. Bu sayı birkaç gün üst üste tablanın aynı tozlayıcı ile tekrardan tozlanması yöntemiyle belirli oranlarda aşılabılır. Ancak bu çalışmada embriyo kültürü için tozlamadan sonraki 12. günde melez tablalar hasat edildiği için bir kez tozlama yöntemi tercih edilmiştir ve bu yüzden de tabla başına düşen zigotik tohum taslağı sayısı düşük çıkmıştır.

Bu çalışma kapsamında kültüre alınan embriyoların besi ortamlarına göre dağılımları ve çimlenen embriyo sayıları, başarı oranları ve saksıya aktarılan melez bitki sayıları Çizelge 4'te verilmiştir.

Çizelge 4. Kültüre alınan tohum taslaklarının besi ortamlarına göre dağılımları

Table 4. Distribution of cultured seeds according to nutrient mediums

Kombinasyonlar <i>Combinations</i>	Kültüre alınan <i>Cultured</i>	Kontamine olan <i>Contaminated</i>	Kalan Remaning	Çimlenen <i>Germinated</i>	Başarı oranı (%) <i>Success rate (%)</i>	Saksıya Aktarılan <i>Transferred to pots</i>
M5519 Besi Ortamı/M5519 Medium						
Remzibey x Dinçer	52	4	48	6	12.50	2
Remzibey x Balcı	74	3	71	13	18.31	6
Dinçer x Balcı	83	6	77	12	15.58	7
Toplam/ <i>Total</i>	209	13	196	31	15.82	15
MSD4 Besi Ortamı/MSD4 Medium						
Remzibey x Dinçer	62	3	59	7	11.86	3
Remzibey x Balcı	76	2	74	12	16.22	7
Dinçer x Balcı	72	4	68	8	11.76	3
Toplam/ <i>Total</i>	210	9	201	27	13.43	13
LS2.5 Besi Ortamı/L,S2.5 Medium						
Remzibey x Dinçer	34	5	29	1	3.45	-
Remzibey x Balcı	62	8	54	4	7.41	-
Dinçer x Balcı	69	7	62	4	6.45	-
Toplam/ <i>Total</i>	165	20	145	9	6.21	-

Çizelge 4'ün incelenmesinden de anlaşılacağı gibi en yüksek başarı oranının elde edildiği M5519 besi ortamında kültüre alınan toplam 209 adet embriyonun 13 tanesinde kontaminasyon tespit edilmiş olup geriye kalan 196 embriyodan 31 adedi çimlenmiş ve başarı oranı %15.82 olarak gerçekleşmiştir. Elde edilen bu bitkiciklerden sadece 15 adedi saksıya aktarılacak büyüklüğe ulaşmış diğerleri ise gelişim gösterememişlerdir. M5519 besi

ortamı için melezleme kombinasyonları değerlendirildiğinde %18.31 ile en yüksek başarı oranının Remzibey x Balcı kombinasyonundan sağlandığı bunu %15.58 ile Dinçer x Balcı ve 12.50 ile Remzibey x Balcı kombinasyonları takip etmiştir. MSD4 besi ortamında kültüre alınan toplam 210 adet embriyonun 9 tanesinde kontaminasyon tespit edilmiş olup geriye kalan 201 embriyodan 27 adedi çimlenmiş ve başarı oranı %13.43 olarak

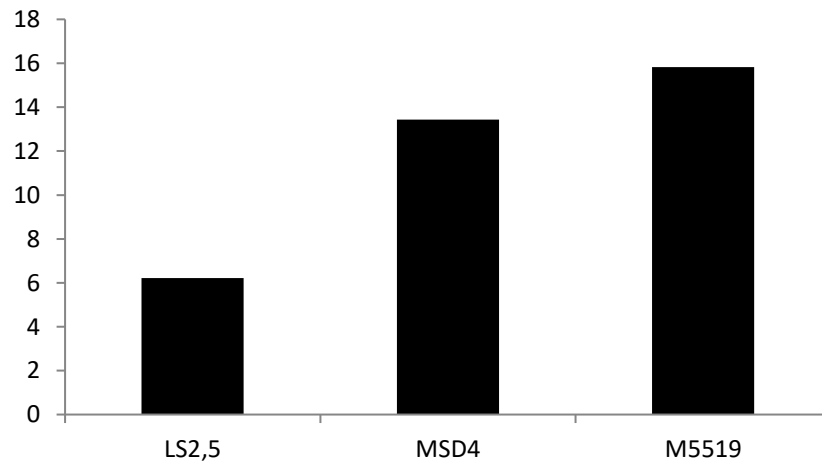
gerçekleşmiştir. Elde edilen bu bitkiciklerden sadece 13 adedi saksıya aktarılacak büyüklüğe ulaşmış diğerleri ise gelişim gösterememişlerdir. MSD4 besi ortamı için melezleme kombinasyonları değerlendirildiğinde %16.22 ile en yüksek başarı oranının Remzibey x Balcı kombinasyonundan sağlandığı bunu %11.86 ile Remzibey X Dinçer ve 11.76 ile Dinçer x Balcı kombinasyonları takip etmiştir (Çizelge 4).

LS2.5 besi ortamında kültüre alınan toplam 165 adet embriyonun 20 tanesinde kontaminasyon tespit edilmiş olup geriye kalan 145 embriyodan 9 adedi çimlenmiş ve başarı oranı %6.25 olarak gerçekleşmiştir. LS2.5 besi ortamı için melezleme kombinasyonları değerlendirildiğinde %7.41 ile en yüksek başarı oranının Remzibey x Balcı kombinasyonundan sağlandığı bunu %6.45 ile Dinçer x Balcı ve 3.45 ile Remzibey x Dinçer kombinasyonları takip etmiştir (Çizelge 4). LS2.5 besi ortamında çimlenme sonrası yeni oluşan bitkiciklerde kallus oluşumu gerçekleşmiştir. Bu bitkicikler 30 gr şeker içeren MSD4 besi ortamına aktarılmasına rağmen bitki gelişimi normle dönmemiş ve bitkiler yeteri kadar kök ve sürgün oluşumu sağlayamamışlardır. Bir oksin hormonu olan 2.4-D (Dichlorophenoxyacetic acid) yüksek konsantrasyonlarda kullanıldığı zaman bitkilerde kallus oluşumuna sebebiyet vermektedir (Zheng and Konzak, 1999;

Malik et al., 2003). Bu yüzden bu araştırmada da tohum taslaklarından çimlenmeye başlayan yeni bitkiciklerde kallus oluşumunun başlamış olması bu bitkiciklerin bir nevi dumura uğramalarına sebebiyet vermiştir. Bitkicikler yeni besi ortamına aktarılmasına rağmen normale dönememiş ve gelişimlerini tamamlayamamışlardır.

Aspirde embriyo kültürü için en uygun besi yerinin M5519 (%15.82) olduğu tespit edilmiş olup bunu MSD4 besi ortamı (%13.43) takip etmiştir (Şekil 1). M5519 besi ortamı hormon içermezken, LS2.5 besi ortamı ise yüksek oranda oksin (2.4D), MSD4 ise stokinin (BAP) hormonu içermektedir (Çizelge 1). Besi ortamının içeriğinde bulunan diğer besin elementlerinin ve vitaminlerin farklılığının yanı sıra hormonların ortamda bulunup bulunmaması da böyle bir etkinin ortaya çıkmasına sebebiyet vermiş olması muhtemeldir. Ayrıca M5519 besi ortamı hazır olarak temin edilmiştir. Diğer besi ortamları ise Çizelge 1'de belirtilen miktarlar üzerinden stok solüsyonları hazırlanmış ve bu stok solüsyonlarından besi ortamları hazırlanmıştır. Dolayısıyla M5519 için kişisel hata payı çok daha düşüktür. Bu yüzden besi ortamının içeriğinin yanı sıra M5519 besi ortamından daha yüksek başarı elde edilmiş olmasında bu durumun etkisinin de olması muhtemeldir.

Genel Başarı Oranı (%)/Success rate (%)



Şekil 1. Araştırmaya konu besi ortamlarından elde edilen genel başarı oranları
Figure 1. The overall success rate in the study are obtained from the mediums

Sonuç

Aspir, diğer yağ bitkilerine oranla olumsuz iklim ve toprak koşullarına daha toleranslı bir yağ bitkisidir. Bu çalışmada, aspir ıslah çalışmalarında gerek tür içinde ve gerekse türler arası melezlemlerde etkin olarak yararlanılabilecek embriyo kültürü tekniğinin geliştirilmesi hedeflenmiştir. Araştırmadan elde edilen sonuçlara göre, aspirde embriyo/tohum taslağı kültürü sonrası doğrudan embriyo rejenerasyonu için yüksek oksin konsantrasyonlarından kaçınılması, oksin ve stokinin grubu hormonların çimlenme gerçekleşikten sonra ortama ilave edilmesinin daha uygun olacağı söylenebilir. Bu çalışmaya konu olan besi ortamları içerisinde en yüksek başarı oranının elde edildiği M5519 besi ortamının hormon ihtiva etmeyen bir ortam olması bu durumu ispatlar niteliktedir. Araştırmadan elde edilen sonuçlara istinaden aspir ıslahında klasik ıslaha destek olarak embriyo veya tohum taslağı kültüründen yararlanılarak bu sayede ıslah süreci kısaltılabilir ve bu teknoloji türlerarası melezlemeler gibi daha ileri uygulamalar için de kullanılabilir.

Teşekkür

Bu çalışma TÜBİTAK 2209A projeleri kapsamında desteklenmiştir. Proje No: 1919B011501475. Vermiş olduğu maddi destek için TÜBİTAK'a ve çalışmada kullanılan tohumları temin ettiği için Eskişehir Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma Enstitüsüne teşekkür ederiz.

Kaynaklar

Ada, R. 2012. Aspir İslahında Melezleme ve Kendileme Teknikleri. Selçuk Üniversitesi Selçuk Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi, 26(2):87-92. <http://stgbd.selcuk.edu.tr/stgbd/article/view/274/188>.

Baydar, H. 2000. Gibberellik Asidin Aspir (*Carthamus tinctorius* L.)'de Erkek Kısırlık, Tohum Verimi ile Yağ ve Yağ Asitleri Sentezi Üzerine Etkisi. Turk J Biol, 24: 159-168.

<http://journals.tubitak.gov.tr/biology/issues/biy-00-24-1/biy-24-1-14-98086.pdf>

Baydar, H. and Gökmen, O.Y. 2003. Short Communication. Hybrid seed production in safflower (*Carthamus tinctorius*) following the induction of male sterility by gibberellic acid. Plant Breeding 122, 459-461.

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1046/j.1439-0523.2003.00901.x>

Baydar, H ve Erbaş, S. 2014. Yağ Bitkileri Bilimi ve Teknolojisi. Süleyman Demirel Üniversitesi Yayın No: 97.

Culpan, E. ve Arslan, B. 2017. Aspir Bitkisinde (*Carthamus tinctorius* L.) İslah Çalışmaları. International Congress of the New Approaches and Technologies for Sustainable Development September 21-24, 2017 Isparta / TURKEY https://www.researchgate.net/profile/Emrullah_Culpan/publication/320449850_Breeding_Studies_on_Safflower_Carthamus_tinctorius_L/links/59e5f92ea6fdcc1b1d97022f/Breeding-Studies-on-Safflower-Carthamus-tinctorius-L.pdf

Deshmukh, A.K. and Ranga Rao, V., 1989. A New and Efficient Method to Achieve Mass Hybridization in Safflower Without Emasculation. A Re-appraisal of Currently Followed Emasculation Techniques. Second International Safflower Conference 9-13 January, Hyderabad, India, 157-161.

Dajue L. and H. H. Mündel 1996. Safflower, Promoting The Conservation and Use of Underutilized and Neglected Crops. 7. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben/International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. 85 pp. https://www.biodiversityinternational.org/fileadmin/_migrated/uploads/tx_news/Safflower__Carthamus_tinctorius_L._498.pdf

FAO 2008. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. Erişim Tarihi: 07.04.2018.

Golkar, P. 2014. Breeding Improvements in Safflower (*Carthamus tinctorius* L.): A Review. Australian Journal of Crop Science, 8 (7):1079-1085.

- http://www.cropj.com/golkar_8_7_2014_1079_1085.pdf
- Kayaçetin, F., Katar, D. ve Arslan, Y. 2012. Aspir (*Carthamus tinctorius* L.)'in Döllenne Biyolojisi ve Çiçek Yapısı. Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi, 21 (2): 75-80. <http://dergipark.gov.tr/download/article-file/118431>
- Köse, A. 2016. Aspir (*Carthamus tinctorius* L.)'de Tane Tutma Oranının Belirlenmesi Üzerine Bir Araştırma. Türkiye Tarımsal Araştırmalar Dergisi, 3:152-158. <http://dergipark.gov.tr/download/article-file/262526>
- Malik, S.I., Rashid, H., Yasmin, T. and Minhas, N.M. 2003. Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic Acid on Callus Induction from Mature Wheat (*Triticum aestivum* L.) Seeds. International Journal of Agriculture & Biology. 1: 156–159. https://www.researchgate.net/publication/242453014_Effect_of_24-dichlorophenoxyacetic_Acid_on_Callus_Induction_from_Mature_Wheat_Triticum_aestivum_L_Seeds
- Mayerhofer, M., Mayerhofer, R., Topinka, R., Christianson, J., Good, A.G. 2011. Introgression potential between safflower (*Carthamus tinctorius*) and wild relatives of the genus *Carthamus*. BMC Plant Biology, 11:47. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3068944/pdf/1471-2229-11-47.pdf>
- Narasimha Rao, N., Sujatha, M., Lakshmi, N., Dinesh Kumar, V. 2008. Establishment of regeneration and transformation protocols in safflower (*Carthamus tinctorius* L.). Proceedings of the 7th International Safflower Conference, Wagga Wagga, New South Wales, Australia. <https://s3.wp.wsu.edu/uploads/sites/2171/2017/11/Biotech-Sujatha-poster-paper.pdf> Erişim Tarihi: 26.11.2018.
- Öztürk Ö., Akınerdem, F., Bayraktar, N. ve Ada, R. 2007. Konya Koşullarında Bazı Aspir Çeşitlerinin Verim, Verim Unsurları ve Yağ Oranlarının İncelenmesi. I. Ulusal Yağlı Tohumlu Bitkiler ve Biyodizel Sempozyumu, 28-31 Mayıs, Samsun, s 191-202.
- Parmeshwarappa, K.G., Gulganji, G.G., Kulkarni, M.S., Hulihalli, U.K. and Mallapur, C.P. 1996. Rate and Efficacy of Polythene Method of Crossing in Safflower. Karnataka J. Agric, Sci 10(3):896-897. <http://14.139.155.167/test5/index.php/kjas/article/viewFile/4981/5207>
- Payaga, L., Lakshamma, P. ve Anjani, K., 2001. Enhancement of Male Sterility in Safflower by Growth Regulators and Chemicals. Sesame and Safflower Newsletter, 16. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/FullTextPDF/2009/20093312374.pdf>
- Singh, R.J. 2007. Genetic Resources, Chromosome Engineering and Crop Improvement. CRC Press Inc. Boca Raton, Florida, USA.
- Sujatha, M. and Dutta Gupta, S. 2013. Chapter 12. Tissue Culture and Genetic Transformation of Safflower (*Carthamus tinctorius* L.). Eds. S. M. Jain and S. Dutta Gupta, Biotechnology of Neglected and Underutilized Crops, p 310. https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-007-5500-0_12
- TTSM, 2018. Tohumluk Tescil ve Sertifikasyon Merkez Müdürlüğü. <https://www.tarimorman.gov.tr/BUGEM/TTSM/Sayfalar/Detay.aspx?SayfaId=85>. Erişim Tarihi: 26.11.2018.
- Uysal, N., Baydar, H. ve Erbaş S. 2006. Isparta Populasyonundan Geliştirilen Aspir (*Carthamus tinctorius* L.) Hatlarının Tarımsal ve Teknolojik Özelliklerinin Belirlenmesi. Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 1 (1):52-63. edergi.sdu.edu.tr/index.php/zfd/article/download/204/103
- Zheng, M.Y. and Konzak, C.F. 1999. Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic Acid on Callus Induction and Plant Regeneration in Anther Culture of Wheat (*Triticum aestivum* L.). Plant Cell Reports, 19 (1): 69–73. <https://link.springer.com/article/10.1007/s002990050712>.