

Ayçiçeğinin (*Helianthus annuus* L. cv. Palancı-I) *In Vitro* Tuzlu Koşullarda Gelişimi Üzerine Etil Metansülfonat (EMS) Uygulamalarının Etkisi*

Demet ALTINDAL¹, Nüket ALTINDAL²

ÖZET: Bu çalışmada, Palancı-I ayçiçeği çeşidi tohumlarına ait çekirdek içlerine dört farklı dozda (kontrol, % 1.0, 1.5 ve 2.0) etil metansülfonat (EMS) uygulanmış ve çekirdek içleri farklı NaCl dozu (0.0, 1.25, 2.5 ve 5.0 g/L) içeren besi ortamlarında 4 hafta süreyle *in vitro* koşullarda kültüre alınmıştır. Elde edilen bitkiciklerin boyu (cm), yaş ağırlığı (g), kök uzunluğu (cm), yaprak sayısı (adet), yaprak eni ve boyu (mm), boğum sayısı (adet), toplam klorofil içeriği (µg/g) ve prolin içeriği (Mmol/g YA) incelenmiştir. Boğum sayısı ve yaprak sayısı hariç incelenen tüm özelliklerde artan tuz dozları ve EMS uygulamalarının etkisi istatistiki olarak önemli bulunmuştur. Genel olarak, artan NaCl konsantrasyonlarına bağlı olarak prolin içeriği hariç, diğer incelenen özelliklerde azalma gözlenmiştir. Yine uygulanan yüksek EMS dozları toplam klorofil içeriği hariç incelenen diğer özelliklerde önemli seviyede düşüslere sebep olmuş ancak prolin içeriğini etkilememiştir. Sonuç olarak, EMS uygulamaları artan NaCl dozlarının olumsuz etkilerini azaltmıştır.

Anahtar Kelimeler: Ayçiçeği, *in vitro*, etil metansülfonat, tuzlu koşullar.

Effect of Ethyl Methanesulphonate (EMS) Applications on *In Vitro* Growth of Sunflower (*Helianthus annuus* L. cv. Palancı-I) under Salinity Conditions

ABSTRACT: Four ethyl methanesulphonate (EMS) doses (control, 1.0, 1.5 ve 2.0 %) were exposed to kernels of Palancı-I sunflower variety and this kernels were cultured on MS medium added different 4 NaCl doses (0.0, 1.25, 2.5 ve 5.0 g/L) in *in vitro* for 4 weeks. In this study, plantlet height (cm), plantlet fresh weight (g), root length (cm), leaf number (number), leaf width and length (mm), node number (number), total chlorophyll content (µg/g) and proline content (Mmol/g FW) were investigated. Except for node number and leaf number the effects of EMS applications and salinity levels significantly affected to all characteristics. Generally, according to increasing NaCl concentrations, other characters decreased except proline content. The higher EMS doses caused significantly declines in investigated characters except total chlorophyll content but weren't affect proline content. It was concluded that EMS treatments decreased negative effects of increasing NaCl doses.

Keywords: Sunflower, *in vitro*, ethyl methanesulphonate, salinity conditions.

¹ Demet ALTINDAL (0000-0002-2198-7209), Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Fethiye Ali Sıtkı Meheret Koçman Meslek Yüksekokulu, Bitkisel ve Hayvansal Üretim Bölümü, Organik Tarım Programı, Muğla, Türkiye

² Nüket ALTINDAL (0000-0002-9567-1653), Uşak Üniversitesi, Sivaslı Meslek Yüksekokulu, Bitkisel ve Hayvansal Üretim Bölümü, Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Programı, Uşak, Türkiye

Sorumlu yazar/Corresponding Author: Demet ALTINDAL, daltindal@gmail.com

* Makalenin bir kısmı 03-05 Mayıs 2018 tarihinde Yozgat'ta düzenlenen "Bölgesel Kalkınma ve Sosyo-Kültürel Yapı" temalı III. Uluslararası Bozok Sempozyumu'nda sözlü sunum olarak sunulmuş ve kongre özet kitabında basılmıştır.

GİRİŞ

Günümüzün en önemli yağ bitkileri içinde ayçiçeği önemli bir bitkidir. Ülkemizde ayçiçeği bitkisel yağlar arasında ilk sırayı almakta ve yağı yemeklik kalitesi yönünden tercih edilmektedir. Ayçiçeğinin çerezlik olarak tüketimi de mevcuttur. Ülkemizde üretilen ayçiçeğinin yaklaşık % 2.6'sı çerezlik olarak tüketilmekte ve üretilen çerezlik ayçiçeği ihtiyacımızı karşılayamamaktadır (Saltalı ve Yıldırım, 2016).

Stres faktörlerine dayanıklı çeşitlerin olmayışı ayçiçeğinde verimin düşmesine neden olmaktadır (Fernández-Martínez ve ark., 2010). Stres, canlılar için uygun olmayan herhangi bir çevre faktörü olarak ifade edilmektedir (Levitt, 1980). Dünyada tuzluluk giderek yaygınlaşan önemli bir stres faktörüdür. Tuzluluk, doğal etkenler ve yanlış tarımsal uygulamalar sonucu oluşabilmekte (Kalaji ve Pietkiewicz, 1993) ve stres etmenleri yıllık yaklaşık % 25 ürün kaybına neden olmaktadır (Gill ve ark., 2004).

Tuza tolerans bakımından cins, tür, genotip hatta organlara bakılmaksızın bitkiler arasında önemli farklılıklar bulunmaktadır (Belkhodja ve ark., 1994). Bitkilerin tuza karşı gösterdiği tepkiler; çevresel ve genetik faktörlere bağlıdır. Bu tepkiler bitkinin gelişme dönemi, tuz konsantrasyonu ve tuzun etki süresine göre değişebilmektedir (Greenway ve Munns, 1980). Bitkilerde görülen tuz stresi, genellikle sodyum tuzları nedeniyle ortaya çıkmaktadır. Genelde toprak tuzluluğu ve tuz stresi denildiğinde NaCl'nin varlığından bahsetmek gerekmektedir (Munns ve Termaat, 1986).

Tuzluluğu engellemek için birçok yöntemler kullanılmaktadır. Ancak tüm bu işlemler pahalı ve zaman alıcı olabilmektedir (Aktaş, 2002). Tüm bu nedenlerden dolayı, tuza dayanıklı çeşitlerin belirlenmesi veya genetik olarak elde edilmesini amaçlayan çalışmalar önem kazanmaktadır. Bitkilerde melezleme yoluyla yapılan klasik ıslah yöntemleri uzun zaman almakta ve bazen istenmeyen özelliklerde yeni çeşitlere taşınabilmektedir. Günümüzde, klasik yöntemleri yanında bitki doku kültürü tekniklerinden de tuza toleranslı çeşitlerin geliştirilmesinde faydalanılmaktadır (Winicov, 1996).

Yukarıda bahsedilen tuzluluk konusu ile ilgili birçok çalışma yapılırken, bitki ıslahçıları tarafından bitkilerde tuzluluğa tolerans gibi özelliklerde varyasyon yaratmak amacıyla da klasik ıslah yöntemlerine alternatif olabilen mutasyon yöntemi kullanılmaktadır.

Mutasyon, bitki ıslahı için klasik ıslah yöntemlerine alternatif olabilen bir yöntem olmakla birlikte, kimyasal veya fiziksel mutajenler kullanılarak genetik materyalde değişimlere sebep olan işlem olarak tanımlanmaktadır (Krupa-Mańkiewicz ve ark., 2017). Mutajenlerin kullanımı, birçok bitkide kalitatif ve kantitatif özellikleri ıslah etmede kullanılan hızlı ve etkin bir metottur (Gerami ve ark., 2017).

Kimyasal mutajenler arasında EMS (Etil metansülfonat) en etkili mutajen olarak kabul edilmekle birlikte (Minocha ve Arnason, 1962) bitki ıslahında yaygın olarak kullanılan alkali gruplu kimyasal bir maddedir (Van Harten, 1998). Bitkilerde kullanılan EMS genellikle nokta mutasyonlarına sebep olmaktadır (Okagaki ve ark., 1991).

EMS birçok türlerin *in vitro* eksplantlarında uygulanabilmektedir (Duron, 1992). Bitki doku hücrelerinde mutajenik etkisi mümkün olabilmekte ve bu hücrelere üniform olarak muamele edilebilmektedir. Kimyasal mutajenlerin spesifik ve olası mutasyon oluşturma kabiliyetleri daha fazladır. EMS, bazı küçük DNA bölgelerinde kaybolmaya ve diğer kromozomlarda yeniden oluşumlara neden olmaktadır (Greene ve ark., 2003).

In vivo ve *in vitro* koşullarda ortaya çıkan mutant varyantlar daha sık ortaya çıkabilmekte (Yang ark., 2010) ve sınırlı alanlarda, çok kısa zamanda kendini gösterdiği için kolaylıkla belirlenebilmektedir (Ahloowalia, 1986).

Ayçiçeğinde mutasyon oluşturmada kimyasal mutajenlerin fiziksel mutajenlere göre daha etkili olduğu ifade edilmiştir (Reddy ve ark., 1993). Yapılan çalışmalarla doku kültürü metodu kullanılarak tuza dayanıklı çeşitler belirlenmiştir (Al-jibouri ve ark., 2005). Mutajenik uygulamaların, arpada tuz, çeltikte ise soğuk gibi abiyotik stres faktörlerine karşı tolerans sağlamada başarılı olduğu tespit edilmiştir

(Nehnevajova ve ark., 2007). Ancak literatürde ayçiçeğinde tuz stresine dayanıklılık üzerine yapılan az sayıda çalışma bulunmaktadır (Ahmad ve ark., 2009; Fulda ve ark., 2011).

Tüm bitki türlerinde olduğu gibi ayçiçeğinde yeni çeşitlerin geliştirilmesi ve bunun için ıslah programlarına hız kazandırılması gerekmektedir. Ancak ayçiçeğinde ya da diğer bitkilerde *in vitro* koşullarda daha sık uygulanan kallus eksplantı dışında sürgün ucu, olgunlaşmış ya da olgunlaşmamış embriyo gibi eksplantlara mutagen uygulanarak tuza toleranslı genotiplerin belirlenmesi için herhangi bir çalışmaya henüz rastlanılmamıştır.

Sonuç olarak, bu araştırma ile ayçiçeğinde kallus dışında eksplant olarak çekirdek içlerine farklı dozlarda EMS uygulanarak, farklı NaCl dozlarında EMS'nin etkileri incelenerek ve sonuçlar doğrultusunda ileride yapılacak çalışmalara yaratılmaya çalışılan genetik varyasyonla ıslah çalışmalarında kullanılmak üzere yeni bir kaynak sağlanması planlanmıştır.

MATERYAL VE YÖNTEM

Çalışma, tesadüf parsellerinde faktöriyel deneme planına göre 10 tekerrürlü olarak düzenlenmiştir.

Materyal

Çalışmada, Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nden temin edilen Palancı I çeşidi çerezlik ayçiçeği olarak kullanılmıştır.

Yöntem

Etil metansülfonat (EMS) uygulaması

Bir gece suda bekletilmiş ayçiçeği tohumları yüzey sterilizasyonu için steril kabin içerisinde % 15'lik sodyum hipoklorit çözeltisinde (1-2 damla % 1'lik Tween-20 ilave edilmiş) 20 dakika süre ile bekletmiş ve steril distile su ile 5 defa yıkanmıştır. Yüzey sterilizasyonu yapılan ayçiçeği tohumlarının çekirdek içleri % 0,0-1,0-1,5 ve 2,0 EMS (Kodym ve Afza, 2003) [Etil metansülfonat (SIGMA-moleküler ağırlık: 124.16; yoğunluk: 1.206)] solüsyonunda 90 dakika süreyle bekletilmiştir. Ardından 3-5 kez steril saf su ile mutagen uygulanmış eksplantlar durulanmıştır.

In vitro koşullarda çalışma

EMS uygulanmış eksplantlar bitki rejenerasyonu için litreye 8 g agar, 30 g sükröz, farklı dozlarda (0,0-1,25-2,50-5,0 g/L) NaCl (Hassan ve ark., 2004) ve hormon olarak 0,1 mg GA₃, 0,01 mg NAA ve kinetin eklenmiş (Badoni ve Chauhan, 2010) MS ortamında (Murashige ve Skoog, 1962) 4 hafta boyunca 25 °C'de, 16 saat aydınlık ve 8 saat karanlık koşullarda (Gürel, 1994) ve 2000-2200 lüks ışık altında (Gürel ve ark., 1993) kültüre alınmıştır.

Morfolojik özelliklerin incelenmesi

In vitro koşullarda gelişen bitkiciklerin 4 hafta sonra bitkicik boyu (cm), bitkicik yaş ağırlığı (g), kök uzunluğu (cm), boğum sayısı (adet), yaprak sayısı (adet) ve yaprak eni ve boyu (mm) belirlenmiştir.

Biyokimyasal analizlerin incelenmesi

Taze yapraklarda prolin içeriği (Mmol/g YA) 0,5 g örnekte Bates ve arkadaşları (Bates ve ark., 1973)'na göre toplam klorofil içeriği ($\mu\text{g/g}$) ise 1 g örnekte Arnon (1949)'a göre tespit edilmiştir.

İstatistiki analiz

Çalışma, tesadüf parsellerinde faktöriyel deneme planına göre 10 tekerrürlü olarak düzenlenmiştir. Elde edilen veriler SAS paket programında analiz edilmiştir. Önemli bulunan farklılıklar MSTAT-C programında LSD ve Duncan çoklu karşılaştırma testi ile belirlenmiştir. Sadece sayılabilen özelliklerden boğum sayısı ve yaprak sayısına ait verilere karekök transformasyonu uygulanmıştır (Sokal ve Rohlf, 1995).

BULGULAR VE TARTIŞMA

Bitkicik Boyu (cm)

Ayçiçeğinin *in vitro* koşullarda bitkicik boyu üzerine farklı NaCl ve EMS dozlarının etkisi istatistiki bakımdan önemli bulunmuş ($P<0,01$) ve genel olarak artan NaCl dozlarında bitkicik boyunda kontrole göre azalmalar meydana geldiği belirlenmiştir. Uygulanan EMS dozu arttıkça bitkicik boyu azalmış ve en düşük bitkicik boyu % 2.0 EMS dozunda elde edilmiştir (8.80 cm). NaCl x EMS dozu etkileşimi bitkicik

boyunu önemli seviyede etkilemiş, en yüksek bitkicik boyu NaCl ve EMS dozlarının kontrol gruplarının birlikte uygulanması sonucu elde edilmiş (15.60 cm) ve genel olarak 0.0 ve 1.25 g/L NaCl şartlarında EMS uygulamaları arasında önemli bir farklılık olmamıştır (Çizelge 1). Araştırmamızda NaCl koşullarında % 1.0 EMS uygulaması bitkicik boyunu kontrollere göre artırmıştır.

Kumar ve Kumar Rai (2007), mısır tohumlarıyla yaptıkları çalışmada, % 5'lik dozda EMS uygulamış ve 7 saat EMS uygulamasında yüksek oranda kromozom anormalliklerini belirlemiştir. Araştırmada, uzun sürelerde EMS uygulaması bitki boyuna olumsuz etki yaparken bazı bitkilerde ise hafif oranlarda bitki boyunda artış meydana gelmiştir. Gerami ve ark. (2017) Şeker otu (*Stevia rebaudiana* Bertoni) ile yaptıkları çalışmada, kalluslara 30-60 ve 120 dk. süreyle % 0.1-0.2 ve 0.5 EMS uygulamış ve hormon içeren MS ortamında kültüre alınan kalluslardan 19 mutant hat elde etmişlerdir. Bu mutant hatlar kontrollerle karşılaştırıldığında 3 mutant hatta bitki boyu yüksek bulunmuştur.

Bitkicik Yaş Ağırlığı (g)

Bitkicik yaş ağırlığı NaCl ve EMS dozlarından önemli seviyede etkilenmiş ($p<0.01$) ve en yüksek bitkicik yaş ağırlığı 0.0 g/L NaCl'de elde edilmiş (4.45 g) ve diğer dozlardan farklı grupta yer almıştır. Artan NaCl dozlarında bitkicik yaş ağırlığı rakamsal olarak azalmış, ancak uygulamalar aynı grupta yer almıştır. Yine artan EMS dozları bitkicik yaş ağırlığını olumsuz etkilemiş ve bitkicik yaş ağırlığı en düşük % 2.0 EMS dozunda elde edilmiş (2.07 g) ve genelde diğer dozlardan farklı bulunmuştur.

NaCl ve EMS dozlarının interaksyonu incelendiğinde 0.0 g/L NaCl ve % 0.0 EMS dozlarının birlikte uygulamasında en yüksek bitkicik yaş ağırlığı tespit edilmiştir (6.26 g). Çalışmada NaCl eklenmiş besi ortamında EMS uygulamalarının bitkicik yaş ağırlığı üzerine etkisi benzer olmuştur (Çizelge 1). 1.25 ve 2.5 NaCl dozlarında % 1.0 EMS uygulamaları bitkicik yaş ağırlığını artırmıştır. Elde edilen sonuçlar; (Gerami ve ark. (2017)'nin şeker otunda; Luan ve ark. (2007)'nin tatlı patatada elde ettiği bulgularla desteklenmektedir.

Kök Uzunluğu (cm)

Uygulanan NaCl dozları, EMS konsantrasyonları ve birlikte etkileşimleri kök uzunluğunu $p<0.05$ seviyesinde etkilemiştir. 0.0 g/L NaCl (kontrol) uygulaması kök uzunluğunu artırmış (9.51 cm) ve 1.25 g/L NaCl uygulaması ile benzer olmuş, doz arttıkça kök uzunluğu değerleri düşmüştür. EMS dozunun % 1.0 uygulamasında kök uzunluğu artmış (9.85 cm) ve % 0.0 EMS uygulaması ile aynı grupta yer almış, artan EMS dozlarında kök uzunluğu azalmıştır. NaCl x EMS interaksyonunda kök uzunluğu değerleri değişkenlik göstermiş ve genel olarak NaCl içeren ortamda % 2.0 EMS uygulamaları kök uzunluğunu azaltmıştır. Yine genel olarak NaCl uygulamalarında % 1.0 EMS dozu kök uzunluğunun artmasına neden olmuş ve en uzun kök 0.0 g/L NaCl + % 1.0 EMS uygulamasında elde edilmiştir (11.69 cm) (Çizelge 1). Bahar ve Akkaya (2009), buğdayda uygulanan EMS dozlarının embriyonik kök uzunluğu, kök yaş ve kuru ağırlığını artırdığını belirtmişlerdir.

Boğum Sayısı (adet) ve Yaprak Sayısı (adet)

Farklı NaCl ve EMS uygulamalarının boğum sayısı ve yaprak sayısı üzerine etkisi istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur. Boğum sayıları 2.0 ile 3.0 adet, yaprak sayıları ise 4.24 ile 8.0 adet arasında değişkenlik göstermiştir (Çizelge 1).

Araştırmamızda NaCl uygulamalarının yaprak sayısını etkilemediği tespit edilmiş olup, Arslan (1988) *S. tuberosum* ssp. andigena alt türünün 16 mmhos'luk tuz ve 21 °C'lik sıcaklık ortamında kontrolden daha fazla yaprak oluşturduğunu ancak, artan tuz konsantrasyonlarıyla birlikte diğer çeşitlerde yaprak sayısında azalma meydana geldiğini ortaya koymuştur. Yine çalışmamızda boğum sayısı NaCl uygulamalarından etkilenmemiş ancak soya fasulyesi üzerinde yapılan bir çalışmada, populasyonlara 5 farklı dozda (5-10-15-20 ve 25 mM) EMS uygulanmış M_1 generasyonunda dikimden 30 gün sonra her iki çeşitte de artan mutagen dozlarında bitkide boğum sayısında azalma meydana geldiği tespit edilmiştir (Karthika ve Subba Lakshmi, 2006).

Çizelge 1. Farklı dozlarda NaCl ve EMS uygulamalarının çerezlik ayçiçeğinde incelenen özellikler üzerine etkileri.

NaCl konsantrasyonu g/L	EMS konsantrasyonu (%)	Bitkicik boyu (cm)	Bitkicik yaş ağırlığı (g)	Kök uzunluğu (cm)	Boğum sayısı (adet)	Yaprak sayısı (adet)
Kontrol (0.0)	Kontrol (0.0)	15.60 a	6.26 a	9.20 a-d	3.00	5.10
	1.0	12.46 abc	4.69 ab	11.69 a	2.80	6.40
	1.5	11.28 abc	3.83 bc	7.86 bcd	2.20	5.40
	2.0	12.65 ab	3.00 bcd	9.30 a-d	2.50	6.10
1.25	Kontrol (0.0)	11.45 abc	1.88 cd	8.91 a-d	2.30	4.24
	1.0	12.48 abc	3.45 bcd	10.19 abc	2.70	5.00
	1.5	12.28 abc	2.45 cd	10.20 abc	2.60	6.00
	2.0	8.40 b-e	1.45 d	7.70 bcd	2.50	5.60
2.50	Kontrol (0.0)	10.00 bcd	2.05 cd	8.60 a-d	2.00	4.60
	1.0	11.13 abc	2.86 bcd	10.55 ab	2.60	5.80
	1.5	6.20 de	1.61 d	6.60 de	2.60	7.00
	2.0	5.01 e	2.11 cd	4.60 e	2.70	8.00
5.00	Kontrol (0.0)	7.95 cde	2.24 cd	9.05 a-d	2.20	6.00
	1.0	9.20 b-e	1.60 d	6.95 cde	2.00	5.80
	1.5	10.52 bcd	2.14 cd	7.95 bcd	2.60	4.80
	2.0	9.15 b-e	1.74 d	6.50 de	2.10	5.30
LSD _{NaCl x EMS}		3.961**	1.779**	2.777*	Önemsiz	Önemsiz
NaCl dozları (g/L)						
Kontrol (0.0)		13.00 a	4.45 a	9.51 a	2.63	5.75
1.25		11.15 ab	2.31 b	9.25 a	2.53	5.21
2.50		8.09 c	2.16 b	7.59 b	2.48	6.35
5.00		9.21 bc	1.93 b	7.61 b	2.23	5.48
LSD _{NaCl}		1.981**	0.8895**	1.389*	Önemsiz	Önemsiz
EMS dozları (%)						
Kontrol (0.0)		11.25 a	3.11 a	8.94 ab	2.38	4.99
1.0		11.32 a	3.15 a	9.85 a	2.53	5.75
1.5		10.07 ab	2.51 ab	8.15 bc	2.50	5.80
2.0		8.80 b	2.07 b	7.03 c	2.45	6.25
LSD _{EMS}		1.981**	0.8895**	1.389*	Önemsiz	Önemsiz

*, **: Sırasıyla p<0.05 ve p<0.01 seviyesinde önemlidir.

Yaprak Boyu (mm)

Yaprak boyu üzerine NaCl ve EMS uygulamalarının etkisi önemli bulunmuştur ($p<0.01$). Genel olarak artan NaCl dozlarında yaprak boyu azalmış, en düşük değer 2.5 g/L NaCl dozunda elde edilmiş olup (1.00 mm), elde edilen sonuçlar 5.0 g/L NaCl dozu ile benzer olmuştur. EMS uygulamalarının % 2.0 EMS dozunda en düşük yaprak boyu elde edilirken (1.00 mm), yaprak boyunu artıran diğer dozlarla ayrı grupta yer almıştır. Yaprak boyu üzerine NaCl ve EMS'nin birlikte etkisi önemli bulunmuş ve değerler 0.61-2.0 mm arasında değişkenlik göstermiştir. En uzun yaprak boyu 0.0 g/L NaCl dozu + % 0.0 ve 1.0 EMS uygulamalarında ortaya çıkmış (2.00 mm) ve genel olarak 2.5 ve 5.0 g/L NaCl uygulamalarında tüm EMS dozlarının yaprak boyu üzerine benzer etkiler gösterdiği ve % 1.5 EMS dozunun kontrole göre yaprak boyunu artırdığı tespit edilmiştir (Çizelge 2). Elde ettiğimiz bu sonuç, Bahar ve Akkaya (2009)'nın buğdayda EMS uygulamalarının ilk yaprak oluşumu ve uzunluğunu artırdığını tespit ettiği çalışmasıyla desteklenmektedir.

Yaprak Eni (mm)

Farklı NaCl dozları yaprak en uzunluğunu önemli seviyede etkilemiş ($p<0.01$), 2.5 g/L NaCl dozunda yaprak eninde azalma olmuştur. Diğer uygulamalar kontrol grubundan farklılık göstermemekle birlikte en yüksek değer (0.73 mm) kontrol grubunda elde edilmiştir. EMS dozlarının yaprak en uzunluğuna etkisi önemli bulunmuştur. EMS'nin % 2.0 dozunda yaprak eni azalmış (0.44 mm) ve diğer EMS dozlarından farklı bulunmuştur. NaCl dozu x EMS dozu interaksyonu yaprak enini önemli seviyede ($p<0.01$) etkilemiş, genel olarak NaCl içeren ortamlarda % 1.5 EMS uygulaması yaprak enini artırmıştır (Çizelge 2). *Amaranthus tricolor* bitkisinde yapılan bir çalışmada, tuzluluk stresine karşı bitkilerde ilk tepkinin artan tuz konsantrasyonlarında yaprak yüzey alanında meydana gelen azalmalar şeklinde ortaya çıktığı bildirilmiştir (Wang ve Nii, 2000). Mevcut çalışmaya göre % 1.5 EMS dozunun tuz stresine karşı bitkiciklerin toleranslı olmasına olumlu etkide bulunduğu düşünülmektedir.

Prolin İçeriği (Mmol/g)

Prolin içeriği uygulanan NaCl ve EMS dozlarından önemli seviyede etkilenmemiş, ancak ikili uygulamalarda önemli düzeyde etkilenmiştir ($p<0.01$).

En yüksek prolin içeriği (0.25 Mmol/g YA) 2.5 g/L NaCl + % 1.0 EMS uygulamasında elde edilmiş ve 0.0 g/L NaCl + % 2.0 EMS uygulaması ile (0.23 Mmol/g YA) aynı grupta yer almıştır. En yüksek NaCl dozunda (5.0 g/L) EMS uygulamaları prolin içeriği üzerine benzer etkide bulunarak aynı grupta yer almışlardır (Çizelge 2). Yapılan çalışmalarda genel olarak prolin içeriği tuzlu koşullarda genotiplere göre artmış ya da azalmıştır (Gupta ve ark., 1999; Özcan ve ark., 2000). Ancak çalışmamızda prolin içeriği NaCl dozlarından etkilenmemiştir. Genellikle daha fazla prolin içeren bitkilerin olumsuz çevre koşullarına daha dayanıklı olduğu ve bu durumda prolin birikimindeki değişimlerin tuzluluğa karşı toleransın ölçülmesinde bir parametre olarak kullanılabileninden bahsedilmektedir (Cihahine ve ark., 2013). Ancak bu görüşün aksine tuza toleransın belirlenmesinde prolin miktarının kesin bir parametre olmadığını ifade eden araştırmalar ve bu konu hakkında bulgular mevcuttur. Prolin proteinlerin koruyucusu olmakla birlikte (Kong ve ark., 2001), kuraklık stresinin bitki yapraklarındaki çözünür protein miktarını artırdığı ve proteinlerin bitkilerde kuraklığa adaptasyon yeteneğini sağladığı bildirilmiştir (Riccardi ve ark., 1998).

Toplam Klorofil İçeriği ($\mu\text{g/g}$)

Toplam klorofil içeriği üzerine NaCl dozlarının etkisi önemli bulunmuş, en düşük klorofil içeriği 1.25 g/L NaCl uygulamasında elde edilmiş (23.38 μg) ve yüksek NaCl dozları toplam klorofil içeriğini artırmış ancak kontrol grubu ile aynı grupta yer almıştır. Yine artan EMS dozları da toplam klorofil içeriğini artırmış ve kontrolden farklı grupta yer almıştır. Araştırmada NaCl x EMS dozları toplam klorofil içeriğini önemli seviyede etkilemiş, yüksek dozda NaCl koşullarında % 1.0 ve 1.5 EMS dozlarında toplam klorofil içeriği önemli derecede artmış ve kontrol grubundan önemli seviyede farklı bulunmuştur (Çizelge 2).

Tatlı patatesten (*Ipomoea batatas* L.) tuza dayanıklılık üzerine yapılan bir araştırmada, kalluslara 2 ve 2,5 saat % 0,5 EMS uygulanmış ve bu kalluslardan oluşan somatik embriyolardan mutantlar elde edilmiş, daha sonra bu mutantların tuza dayanıklılıkları (50 ve 100 mM NaCl dozlarında) belirlenmiştir. Mutant bitkilerin tuza dayanımı kontrollerden daha fazla olmuş, araştırmada klorofil içeriklerinin mutant bitkilerde kontrollerden daha fazla olduğu ortaya konulmuştur. (Luan ve ark., 2007).

Çizelge 2. Farklı dozlarda NaCl ve EMS uygulamalarının yaprak boyu ve eni (mm), prolin içeriği (Mmol/g YA) ve toplam klorofil içeriği ($\mu\text{g/g}$) üzerine etkisi.

NaCl Konsantrasyonu (g/L)	EMS konsantrasyonu (%)	Yaprak boyu (mm)	Yaprak eni (mm)	Prolin içeriği (Mmol/g YA)	Toplam klorofil içeriği ($\mu\text{g/g}$)
Kontrol (0.0)	Kontrol (0.0)	2.00 a	0.93 a	0.15 bc	34.46 c-f
	1.0	2.00 a	0.92 a	0.07 d	31.76 c-g
	1.5	1.69 ab	0.61 a-d	0.14 bc	40.61 bcd
	2.0	1.01 bcd	0.46 cd	0.23 a	35.80 cde
1.25	Kontrol (0.0)	1.17 bcd	0.60 a-d	0.16 b	19.31 fg
	1.0	1.98 a	0.86 ab	0.09 cd	24.16 efg
	1.5	1.39 abc	0.60 a-d	0.15 bc	16.98 g
	2.0	1.19 bcd	0.43 cd	0.12 bcd	33.07 c-f
2.50	Kontrol (0.0)	0.89 cd	0.47 cd	0.11 bcd	22.45 efg
	1.0	1.08 bcd	0.57 bcd	0.25 a	27.20 d-g
	1.5	1.40 abc	0.68 a-d	0.10 bcd	62.63 a
	2.0	0.61 d	0.37 d	0.09 cd	54.85 ab
5.00	Kontrol (0.0)	1.24 bcd	0.73 abc	0.14 bc	20.54 efg
	1.0	1.11 bcd	0.44 cd	0.15 bc	65.37 a
	1.5	1.51 abc	0.74 abc	0.09 cd	45.49 bc
	2.0	1.16 bcd	0.48 cd	0.13 bc	33.32 c-f
LSD _{NaCl x EMS}		0.5913**	0.2990**	0.05220**	14.12**
NaCl dozları (g/L)					
Kontrol (0.0)		1.67 a	0.73 a	0.15	35.66 a
1.25		1.44 ab	0.62 ab	0.13	23.38 b
2.50		1.00 c	0.52 b	0.14	41.78 a
5.00		1.25 bc	0.60 ab	0.13	41.18 a
LSD _{NaCl}		0.2957**	0.1495**	Önemsiz	7.061**
EMS dozları (%)					
Kontrol (0.0)		1.33 a	0.68 a	0.14	24.19 b
1.0		1.54 a	0.70 a	0.14	37.12 a
1.5		1.49 a	0.66 a	0.12	41.43 a
2.0		1.00 b	0.44 b	0.14	39.26 a
LSD _{EMS}		0.2957**	0.1495**	Önemsiz	7.061**

*, **: Sırasıyla $p < 0.05$ ve $p < 0.01$ seviyesinde önemlidir.

SONUÇ

Araştırma sonucunda *in vitro* koşullarda farklı dozlarda NaCl ve EMS uygulamalarının bitki gelişimini olumlu ya da olumsuz etkilediği ancak boğum sayısı ve yaprak sayısını önemli seviyede etkilemediği tespit edilmiştir. Genel olarak artan NaCl dozlarında % 1.0 EMS uygulaması morfolojik özellikler üzerinde olumlu etkide bulunmuştur. 2.5 ve 5.0 g/L NaCl dozlarında % 1.0 ve 1.5 EMS uygulamaları prolin ve toplam klorofil içeriğini artırmıştır. Araştırmada, *in vitro* koşullarda farklı EMS uygulamalarının NaCl uygulanan bitkilerdeki gelişimi olumlu yönde etkileyebildiği ortaya konulmuştur. Bu bağlamda çalışma hakkında yeterli literatüre rastlanılmadığı

için konu üzerinde daha çok araştırma yapılması gerektiği sonucuna varılmıştır. Ayrıca bu araştırma ile *in vitro* koşullarda ayçiçeğinde farklı dozlarda EMS uygulanarak tuza toleranslı yeni çeşitler elde edilebileceği ve genetik varyasyon yaratılmaya çalışılarak özellikle ıslah çalışmalarında kullanılmak üzere ıslahçılara yeni bir materyal kaynağı sağlanacağı düşünülmektedir.

TEŞEKKÜR

2016/MF001 No'lu proje numarasıyla bu araştırmayı maddi olarak destekleyip, gerçekleşmesini sağlayan Uşak Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi yönetici ve ilgililerine teşekkürlerimi sunarım.

KAYNAKLAR

- Ahloowalia BS, 1986. Limitations to the Use of Somaclonal Variation in Crop Improvement. Somaclonal Variations and Crop Improvement. Semal, J., Martinus Nijhoff Publishers. Dordrecht, 14-27.
- Ahmad S, Ahmad R, Ashraf M, Ashraf MY, Ashraf M, Waraich EA, 2009. Sunflower (*Helianthus annuus* L.) Response to Drought Stress at Germination and Seedling Growth Stages. Pak. J. Bot, 41(2): 647-654.
- Aktaş H, 2002. Biberde Tuza Dayanıklılığın Fizyolojik Karakterizasyonu ve Kalıtımı, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi.
- Al-Jibouri AAM, Sulaiman AA, Dallulu RA, 2005. Tissue Culture Technique and Gamma Irradiation used in Evaluation of Five Genotypes of Bread Wheat to Salinity Tolerance. Iraqi Journal of Science and Technology, 2: 24-35.
- Arnon DT, 1949. Copper Enzymes in Insolated Chloroplast Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiology, 23: 1-15.
- Arslan N, 1988. Patateste Tuzluluğa ve Sıcaklığa Toleransın İn Vitro Tesbiti Üzerine Araştırmalar. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, 1077, Ankara.
- Badoni A, Chauhan JS, 2010. Conventional vis-a-vis Biotechnological Methods of Propagation in Potato: A Review. Stem Cell, 1 (1): 1-6.
- Bahar B, Akkaya MS, 2009. Effects of EMS Treatment on the Seed Germination in Wheat. Journal of Applied Biological Sciences, 3 (1): 59-64.
- Bates LS, Waldren RP, Teare, ID, 1973. Rapid Determination of Free Proline for Water Stress Studies. Plant and Soil, 39: 205-207.
- Belkhdja R, Morales F, Abadia A, Gomez-Aparisi J, Abadia J, 1994. Chlorophyll Fluorescence as a Possible Tool for Salinity Tolerance Screening in Barley (*Hordeum vulgare* L.). Plant Physiology, 104: 667-673.
- Duron M, 1992. Induced Mutations through EMS Treatment after Adventitious Bud Formation on Shoot Internodes of Weigela cv. Bristol Ruby. Acta Horticulture, 320: 113-118.
- Fernández-Martínez JM, Domínguez J, Pérez-Vich B, 2010. Update on Breeding for Resistance to Sunflower Broomrape. Helia, 33 (52): 1-12.
- Fulda S, Mikkat S, Stegmann H, Horn R, 2011. Physiology and Proteomics of Drought Stress Acclimation in Sunflower (*Helianthus annuus* L.). Plant Biol., 13: 632-642.
- Gerami M, Abbaspour H, Ghasemimran V, Pirdashti H, 2017. Effects of Ethyl Methanesulfonate on Morphological and Physiological Traits of Plants Regenerated from Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) Calli. Applied Ecology and Environmental Research, 15 (3): 373-385.
- Gill BS, Appels R, Botha-Oberholster A-M, Buell CR, Bennetzen JL, Chalhoub B, Chumley F, Dvorak J, Iwanaga M, Keller B, Li W, McCombie WR, Ogihara Y, Quetier F, Sasaki T, 2004. A Workshop Report on Wheat Genome Sequencing: International Genome Research on Wheat Consortium. Genetics, 168: 1087-1096.
- Greene EA, Codomo CA, Taylor NE, Henikoff JG, Till BJ, 2003. Spectrum of Chemically Induced Mutations from a Large-Scale Reverse-Genetic Screen in *Arabidopsis*. Genetics, 164: 731-740
- Greenway H, Munns R, 1980. Mechanisms of Salt Tolerance in Non-Halophytes. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 31: 149-190.
- Gürel A, 1994. Susam (*Sesamum indicum* L.) Anter Kültürü Üzerinde Bir Ön Çalışma. Bitki Islahı Bildirileri, Tarla Bitkileri Kongresi, İzmir, 25-29 Nisan 1994. II: 278-280.
- Gürel A, Tosun M, Demir İ, 1993. Bazı Makarnalık ve Ekmeklik Buğday Genotiplerinin Anter Kültürüne Reaksiyonları. Anadolu Journal of Aegean Agricultural Research Institute (AARI), 2: 98-111.
- Hassan MN, Serag SM, El-Feky MF, 2004. Changes in Nitrogen Content and Protein Profiles Following *In Vitro* Selection of NaCl Resistant Mung Bean and Tomato. Acta Physiologiae Plantarum, 26 (2): 165-175.
- Kalaji MH, Pietkiewicz S, 1993. Salinity Effects on Plant Growth and Other Physiological Processes. Acta Physiologiae Plantarum, 15 (2): 89-124.

- Karthika R, Subba Lakshmi B, 2006. Induced Genetic Variability for Quantitative Traits in M₂ Soybean Population. *Plant Archives*, 6(1), 325-327.
- Kodym A, Afza R, 2003. Physical and Chemical Mutagenesis. Methods and Protocols. *Methods in Molecular Biology*, Grotewold E, Humana Press, Inc., Totowa NJ. *Plant Functional Genomics*, 236, 189-203.
- Kong Y, Zhou G, Wang Y, 2001. Physiological Characteristics and Alternative Respiratory Pathway under Salt Stress in Two Wheat Cultivars Differing in Salt Tolerance. *Russian Journal of Plant Physiology*, 48 (5): 595-600.
- Krupa-Mańkiewicz M, Kosatka A, Smolik B, Sędzik M, 2017. Induced Mutations through EMS Treatment and *In Vitro* Screening for Salt Tolerance Plant of *Petunia x atkinsiana* D. Don. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici*, 45 (1): 190-196.
- Kumar G, Kumar Rai P, 2007. EMS Induced Karyomorphological Variations in Maize (*Zea mays* L.) Inbreds. *TUBİTAK, Turkish Journal of Biology*, 31, 187-195.
- Levitt J, 1980. Responses of Plants to Environmental Stresses. Vol 1, Academic Press, New York.
- Luan Y-S, Zhang J, Gao X-R, An L-J, 2007. Mutation Induced by Ethyl Methanesulphonate (EMS), *In Vitro* Screening for Salt Tolerance and Plant Regeneration of Sweet Potato (*Ipomoea batatas* L.). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 88: 77-81.
- Minocha JL, Arnason TJ, 1962. Mutagenic Effectiveness of Ethyl Methane Sulphonate in Barley. *Nature*, 196, 499.
- Munns R, Termaat A, 1986. Whole-Plant Responses to Salinity. *Australian Journal of Plant Physiology*, 13: 143-160.
- Murashige T, Skoog F, 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497.
- Nehnevajova E, Herzig R, Federer G, Erismann KH, Schwitzguébel JP, 2007. Chemical Mutagenesis- a Promising Technique to Increase Metal Concentration and Extraction in Sunflowers. *International Journal of Phytoremediation*, 9:149-165.
- Okagaki RJ, Neuffer MG, Wessler SR, 1991. A Deletion Common to Two Independently Derived Waxy Mutations of Maize. *Genetics*, 127: 425-431.
- Reddy SK, Rao AMM, Farook SA, 1993. Mutagenic Effectiveness and Efficiency of SA, DES and Gamma Rays on *Helianthus annuus*(L.). *Asian Journal of Plant Sciences*, 5: 51-55.
- Riccardi F, Gazeau P, Vienne DV, Zivy M, 1998. Protein Changes in Responses to Progressive Water Deficit in Maize. *Plant Physiol.*, 117: 1253-1263.
- Saltalı K, Yıldırım ÖF, 2016. Kuru Koşullarda Çerezlik Ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.) Yetiştiriciliğinde Gıda Uygulamasının Bazı Toprak ve Bitki Özelliklerine Etkisi. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Doğa Bilimleri Dergisi*, 19 (1):84-90.
- Sokal RR, Rohlf FJ, 1995. *Biometry: The Principles and Practice of Statistics in Biological Research*. 3rd Edition, WH Freeman and Co., New York.
- Van Harten AM, 1998. *Mutation Breeding Theory and Practical Applications*. Cambridge University (Press Cambridge United Kingdom), 127-140.
- Wang Y, Nii N, 2000. Changes in Chlorophyll, Ribulose Biphosphate Carboxylase-Oxygenase, Glycine Betaine Content, Photosynthesis and Transpiration in *Amaranthus tricolor* Leaves during Salt Stress. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 75: 623-627.
- Winicov I, 1996. Characterization of Rice (*Oryza sativa* L.) Plants Regenerated from Salt-Tolerant Cell Lines. *Plant Science*, 113: 105-111.
- Yang WR, Zhang QX, Pan HT, Sun M, 2010. *In Vitro* Regeneration of *Lilium tsingtauense* Gilg. and Analysis of Genetic Variability in Micropropagated Plants Using RAPD and ISSR Techniques. *Propagation of Ornamental Plants*, 10 (2): 59-66.