



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü



KASIMPATI MUTASYON ISLAHINDA *IN VITRO* ÇALIŞMALAR

Doktora Tezi

Ümran ŞENEL

Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

İzmir
2023

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü

KASIMPATI MUTASYON ISLAHINDA *IN VITRO* ÇALIŞMALAR

Ümran ŞENEL

Danışmanlar:
Prof. Dr. M. Ercan ÖZZAMBAK
Dr. K. Yaprak KANTOĞLU

Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı
Bahçe Bitkileri Doktora Programı

İzmir
2023

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Doktora Tezi olarak sunduğum “**Kasımpatı Mutasyon Islahında *In Vitro* Çalışmalar**” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

21/09/2023

Ümran ŞENEL

ÖZET**KASIMPATI MUTASYON ISLAHINDA *IN VITRO* ÇALIŞMALAR**

ŞENEL, Ümran

Doktora Tezi, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. M. Ercan ÖZZAMBAK

İkinci Danışmanı: Dr. K. Yaprak KANTOĞLU

Eylül 2023, 202 sayfa

Çalışmada mutasyon ıslahı ile farklı özelliklerdeki kasımpatı bitkilerinin eldesine yönelik, *in vitro* rejenerasyon protokollerinin ve mutasyon tekniklerinin geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Araştırmada beyaz renkli Miral White (MW) ve pembe renkli Pusan kasımpatı (*Chrysanthemum morifolium* L.) çeşitlerinin farklı eksplantlarında (dils çiçek, yaprak, boğum ve boğum arası), farklı oksin ve sitokinin hormonlarının kombinasyonları ile *in vitro* rejenerasyon protokolleri geliştirilmiştir. En iyi rejenerasyon ortamının 2.0 mg/l 6-Benzilaminopürin (BAP) +0.5 mg/l 1-Naftelin Asedik Asit (NAA) ile desteklenmiş Murashige ve Skoog (MS) ortamı olduğu saptanmıştır. MW kasımpatı çeşidinin yaprak eksplantında %90, dils çiçek eksplantında %55, boğum eksplantında %100 ve boğum arası eksplantında %100 sürgün oluşumu elde edilirken, Pusan kasımpatı çeşidinin yaprak eksplantında %60, boğum eksplantında %100 ve boğum arası eksplantında %65 sürgün oluşumu elde edilmiştir. MW ve Pusan kasımpatı çeşidinin üç farklı eksplantına (yaprak, boğum ve boğum arası) yapılan *in vitro* gama ışını (Co^{60} -Kobalt-60) uygulaması sonrasında boğum eksplantı için etkili mutasyon dozu (EMD_{50}) MW çeşidinde 24 Gray (Gy), Pusan çeşidinde 22 Gy olarak belirlenmiştir. EMD_{50} ile ışınlanan eksplantlar rejenerasyon ortamında M_1V_1 - M_1V_4 dönemi boyunca alt kültüre alınmıştır.

Aklimatizasyonu sağlanan bitkiler ieklendirilerek gözlemleri yapılmıştır. MW kasımpatı mutantlarında %0.7 oranında mutasyon frekansı ile sarı dilsı iek rengi tespit edilirken, Pusan kasımpatı mutantlarında %1 açık pembe, %1 koyu pembe, %0.3 beyaz, %0.2 bej, %0.06 somon ve %0.3 oranında çizgili dilsı iek değişimleri saptanmıştır. MW kasımpatı çeşidine ait 2 mutant birey ve Pusan kasımpatı çeşidine ait 5 mutant birey geliştirilebileceği düşünülerek ileriki çalışmalar için seçilmiştir.

Anahtar sözcükler: Kasımpatı, *in vitro* rejenerasyon, mutasyon, *Chrysanthemum*.



ABSTRACT**IN VITRO STUDIES ON CHRYSANTHEMUM MUTATION
BREEDING**

ŞENEL, Ümran

PhD in Horticulture Sciences

Supervisor: Prof. Dr. M. Ercan ÖZZAMBAK

Co-Supervisor: Dr. K. Yaprak KANTOĞLU

September 2023, 202 pages

In this study, the aim was to develop *in vitro* regeneration protocols and mutation techniques for obtaining chrysanthemum plants with different traits through mutation breeding.

Different explants (inflorescence, leaf, node, and internode) of white Miral White (MW) and pink Pusan chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium* L.) varieties were used to develop *in vitro* regeneration protocols using various combinations of auxin and cytokinin hormones. The best regeneration medium was determined to be Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with 2.0 mg/l 6-benzyl amino purine (BAP) and 0.5 mg/l 1-Naphthaleneacetic acid (NAA). Regeneration efficiencies varied among the different explants and cultivars, with MW exhibiting shoot formation of 90% in leaf explants, 55% in inflorescence explants, 100% in node explants, and 100% in internode explants. Similarly, Pusan chrysanthemum showed shoot formation of 60% in leaf explants, 100% in node explants, and 65% in internode explants. *In vitro* gamma irradiation (⁶⁰Co-Cobalt 60) was applied to three different explants (leaf, node, and internode) of MW and Pusan chrysanthemum varieties, and an effective mutation dose (EMD₅₀) was determined to be 24 Gray (Gy) for MW and 22 Gy for Pusan chrysanthemum in node explants. The irradiated explants at EMD₅₀ were subcultured in the regeneration medium during the M₁V₁-M₁V₄ stages.

The acclimatized plants were then flowered, and observations were made. Mutant individuals with yellow inflorescence color were identified in MW chrysanthemum mutants with a mutation frequency of 0.7%. In Pusan chrysanthemum mutants, changes in inflorescence color were observed, including 1% light pink, 1% dark pink, 0.3% white, 0.2% beige, 0.06% salmon, and 0.3% striped inflorescences. Two mutant individuals from MW chrysanthemum cultivar and five mutant individuals from Pusan chrysanthemum cultivar were selected for further studies.

Keywords: Chrysanthemum, *in vitro* regeneration, mutation, *Chrysanthemum*.



ÖNSÖZ

Tüketici taleplerini karşılayabilecek, iç ve dış piyasada tercih edilebilecek yerli çeşitlerin geliştirilmesi süs bitkileri sektörünün öncül ihtiyaçlarındandır. Süs bitkilerinde yeni çeşitlerin geliştirilmesi için biyoteknolojik yöntemler ile mutasyon ıslahının birlikte kullanımı hızlı ve pratik bir yol sunmaktadır. Bu yolda, gerek görev aldığım projelerde olsun gerekse birlikte çalıştığımız değerli hocalarımın tecrübelerinden faydalananarak bilgi birikimimi artırmaya çalıştım. Ülke ekonomisine ve kalkınmasına fayda sağlayacak olan ileriki çeşit geliştirme çalışmaları için bu tez çalışmasındaki *in vitro* mutasyon tekniklerinin detaylı incelenmesinin fayda sağlayacağı kanaatindeyim.

Umarım, bu tez sadece benim bilimsel yolculuğumu anlatmakla kalmaz, aynı zamanda ilgilenen herkese ilham verir ve gelecekteki araştırmalara yol açar.

İZMİR

21 / 09 / 2023

Ümran ŞENEL

İÇİNDEKİLERSayfa

İÇ KAPAK	ii
KABUL ONAY	iii
ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI.....	v
ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
ÖNSÖZ	xi
İÇİNDEKİLER	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xvi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xxiii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xxvi
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	4
2.1 Kasımpatı ile İlgili Genel Bilgiler	4
2.2 Kasımpatıda <i>In Vitro</i> Rejenerasyon Çalışmaları	19
2.3 Kasımpatıda Mutasyon Islahı Çalışmaları	44

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

3. GEREÇ VE YÖNTEM	80
3.1 Çalışmanın Yürütüldüğü Yer ve Yıl	80
3.2 Tez Çalışmasında Kullanılan Bitkisel Materyaller	80
3.3 <i>In Vitro</i> Rejenerasyon Denemeleri.....	81
3.3.1 Eksplant hazırlığı ve sterilizasyonu	84
3.3.2 Rejenerasyon denemelerinde incelenen özellikler	88
3.4 <i>In Vitro</i> Gama (Co^{60}) Işınlamaları	88
3.4.1 EMD ₅₀ ışınlamaları	89
3.4.2 EMD ₅₀ ile yapılan ışınlamalar ve mutant bireylerin eldesi.....	94
3.5 Dış Koşullara Alıştırma ve Araziye Dikim.....	96
3.6 Seçilen Bitkilerin Muhafazası ve Çoğaltılması.....	104
3.7 İstatistiksel Analizler.....	104
4. BULGULAR.....	105
4.1 <i>In Vitro</i> Rejenerasyon Bulguları	105
4.2 <i>In Vitro</i> Fiziksel Mutagen Uygulamasına Ait Bulgular	124
4.2.1 EMD ₅₀ belirleme çalışmasına ait bulgular	136

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

4.3 EMD ₅₀ ile Yapılan Işınlamalar ve Mutant Bireylerin Eldesine Ait Bulgular	137
4.4 Temel Koordinat Analizleri.....	148
4.5 Kümeleme Analizleri.....	150
5. TARTIŞMA.....	153
5.1 <i>In Vitro</i> Rejenerasyon Denemeleri	153
5.2 <i>In Vitro</i> Fiziksel Mutagen Uygulaması Denemeleri.....	157
5.2.1 EMD ₅₀ belirleme çalışmaları	161
5.2.2 Etkili doz ile yapılan ışınlamalar ve mutant bireylerin eldesi	162
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	168
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	171
TEŞEKKÜR	200
ÖZGEÇMİŞ.....	202

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Kasımpatının çiçekcik (flore) yapıları	11
2.2. Kasımpatının çiçek yapısı	12
2.3. Amerika Ulusal Kasımpatı topluluğu tarafından çiçek şekillerine göre tanımlanan 13 farklı kasımpatı sınıfı.....	16
3.1. Çalışmada kullanılan kasımpatı çeşitlerine ait çiçekler, a) Pusan, b) MW	81
3.2. Boğum eksplantlarının sterilizasyonu	84
3.3. Çiçeklenme dönemindeki kasımpatı bitkileri a) tam açmış kasımpatı çiçekleri, b) laboratuvara getirilen dils çiçekler (Pusan) c) petride kültüre alınan dils çiçekler	85
3.4. Yaprak eksplantlarının a) kesimi, b) petriye aktarımı, c) petriye dikimi gerçekleşen eksplantlar	86
3.5. Büyütme odasında petrilere kültüre alınan yaprak eksplantları	86
3.6. Kasımpatı bitkisinde boğum ve boğum arası eksplantlarının alındığı bölgeler.....	87
3.7. İzotop, Ob-servo Sanguis B/01 model 360° döner tablalı klimatize Gama (Co ⁶⁰) kaynağı.....	89
3.8. Yaprak, boğum ve boğum arası eksplantları için etkili doz belirleme ışınlamaları a) magenta içinde ışınlanan <i>in vitro</i> bitkicikler b) ışınlama kaynağı	90

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.9. Işınlama için hazırlanan dilsî çiçek eksplantları a) MW b) Pusan.....	92
3.10. Dilsî çiçek eksplantlarının gama kaynağında ışınlaması (a, b, c).....	92
3.11. Işınlama sonrası petrilerde kültüre alınan dilsî çiçekler a) MW b) Pusan.....	93
3.12. Işınlamalardan sonra yapılan alt kültüre alma çalışmaları.....	95
3.13. Işınlanmış <i>in vitro</i> eksplantlarda ardışık alt kültüre alma şeması (M ₁ V ₁ , M ₁ V ₂ , M ₁ V ₃) Her döngüde ışınlanmış meristemlerden (mavi) oluşan aksiller sürgünlerin kesilmesi ve yeni besi yerine aktarılması (Suprasanna et al, 2012' den modifiye edilmiştir).....	95
3.14. Bitkilerde aktarma çalışmaları (etiketleme, yıkama, dikim, üzerini naylon ile örtme, seraya aktarım)	96
3.15. Aklimatizasyonu tamamlanan seradaki bitkiler.....	97
3.16. Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü arazisinde bitkilerin dikimi.....	98
3.17. Enstitü arazisindeki mutant bitkilerden alınan çelikler.....	99
3.18. Üretici serasında a) bitki dikimi ve b) karartma uygulaması.....	99
3.19. Üretici serasında ek aydınlatma işlemi	100
3.20. Çiçek ile ilgili incelenen özelliklerin şematik olarak açıklaması.....	103
3.21. Yaprak ile ilgili incelenen özelliklerin şematik olarak açıklaması	103

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil

Sayfa

3.22.	Mutant bitkilerin/dokuların <i>in vitro</i> koşullarda kültüre alınması	104
4.1.	MW çeşidinin yaprak eksplantında 5. haftadaki sürgün gelişimleri (No1= 1.0 mg/l Kinetin + 0.5 mg/l NAA, No2=2.0 mg/l Kinetin + 0.5 mg/l NAA, No3=1.0 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA, No4=2.0 mg/L BAP + 0.5 mg/l NAA, No5=1.0 mg/L 2,4-D + 1.0 mg/l BAP, No6=2.0 mg/L 2,4-D + 1.0 mg/l BAP, No7=1.0 mg/L 2,4-D + 1.0 mg/l Kin, No8=2.0 mg/L 2,4-D + 1.0 mg/l Kin, No9=1.0 mg/l 2,4-D, No10=Kontrol).....	106
4.2.	MW çeşidinde dilsli çiçek eksplantında 5. haftadaki sürgün oluşumları (No1= 1.0 mg/l Kinetin + 0.5 mg/l NAA, No2=2.0 mg/l Kinetin + 0.5 mg/l NAA, No3=1.0 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA, No4=2.0 mg/L BAP + 0.5 mg/l NAA, No5=1.0 mg/L 2,4-D + 1.0 mg/l BAP, No6=2.0 mg/L 2,4-D + 1.0 mg/l BAP, No7=1.0 mg/L 2,4-D + 1.0 mg/l Kin, No8=2.0 mg/L 2,4-D + 1.0 mg/l Kin, No9=1.0 mg/l 2,4-D, No10=Kontrol).....	107
4.3.	Pusan çeşidinde yaprak eksplantında 5. haftadaki sürgün oluşumları (No1= 1.0 mg/l Kinetin + 0.5 mg/l NAA, No2=2.0 mg/l Kinetin + 0.5 mg/l NAA, No3=1.0 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA, No4=2.0 mg/L BAP + 0.5 mg/l NAA, No5=1.0 mg/L 2,4-D + 1.0 mg/l BAP, No6=2.0 mg/L 2,4-D + 1.0 mg/l BAP, No7=1.0 mg/L 2,4-D + 1.0 mg/l Kin, No8=2.0 mg/L 2,4-D + 1.0 mg/l Kin, No9=1.0 mg/l 2,4-D, No10=Kontrol).....	108
4.4.	On farklı ortamın MW çeşidinde yaprak eksplantları üzerine etkisi (8. hafta) (P1= 1.0 mg/l Kinetin + 0.5 mg/l NAA, P2=2.0 mg/l Kinetin + 0.5 mg/l NAA, P3=1.0 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA, P4=2.0 mg/L BAP + 0.5 mg/l NAA, P5=1.0 mg/L 2,4-D + 1.0 mg/l BAP, P6=2.0 mg/L 2,4-D + 1.0 mg/l BAP, P7=1.0 mg/L 2,4-D + 1.0 mg/l Kin, P8=2.0 mg/L 2,4-D + 1.0 mg/l Kin, P9=1.0 mg/l 2,4-D).....	111

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil	Sayfa
4.5. On farklı ortamın Pusan çeşidinde yaprak eksplantları üzerine etkisi (8. hafta) (P1= 1.0 mg/l Kinetin + 0.5 mg/l NAA, P2=2.0 mg/l Kinetin + 0.5 mg/l NAA, P3=1.0 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA, P4=2.0 mg/L BAP + 0.5 mg/l NAA, P5=1.0 mg/L 2,4-D + 1.0 mg/l BAP, P6=2.0 mg/L 2,4-D + 1.0 mg/l BAP, P7=1.0 mg/L 2,4-D + 1.0 mg/l Kin, P8=2.0 mg/L 2,4-D + 1.0 mg/l Kin, P9=1.0 mg/l 2,4-D)	112
4.6. Yaprak ve dils çiçek eksplantlarından sürgün yapılarının gelişimi (6. hafta).....	119
4.7. Yaprak eksplantlarından sürgün yapılarının gelişimi a) MW yaprak eksplantının 1 numaralı besin ortamında gelişimi, b) Pusan yaprak eksplantının 3 numaralı besin ortamında gelişimi, c-d) Pusan yaprak eksplantlarının 4 numaralı besin ortamında gelişimi	119
4.8. Boğum (solda) ve yaprak (sağda) eksplantlarında rhizogenesis.....	123
4.9. MW çeşidi yaprak eksplantında 1.0 mg/l 2,4-D içeren 9 numaralı besin ortamında köklenme (8 hafta sonra).....	123
4.10. MW çeşidinin boğum eksplantlarında farklı gama ışını dozlarının rejenerasyon üzerine etkisi.....	124
4.11. MW çeşidinin boğum arası eksplantlarında farklı gama ışını dozlarının rejenerasyon üzerine etkisi	124
4.12. MW çeşidinin yaprak eksplantlarında farklı gama ışını dozlarının rejenerasyon üzerine etkisi.....	125

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.13. Pusan çeşidinde a) boğum, b) boğum arası ve c) yaprak eksplantlarında farklı gama ışını dozlarında rejenerasyon durumları	127
4.14. MW çeşidinde sürgün uzunluğunun artan ışınlama dozlarına göre değişimi	136
4.15. Pusan çeşidinde sürgün sayısının artan ışınlama dozlarına göre değişimi	137
4.16. <i>In vitro</i> koşullardaki mutant kasımpatı bitkileri (farklı boylardaki ve/veya albino mutant <i>in vitro</i> bitkicikler)	138
4.17. <i>In vitro</i> koşullardaki mutant bitkiler ve yapraklarda meydana gelen şekil ve renk değişimleri	138
4.18. Alt kültür çalışmaları yapılan ve iklim odasında tutulan mutant bitkiler	139
4.19. Pusan mutantı kasımpatı bitkilerinin çiçeklenmesi (üretici serası)	140
4.20. MW mutantı kasımpatı bitkilerinin çiçeklenmesi (üretici serası)	140
4.21. Pusan mutantlarının bazı bitkisel özelliklere göre dağılımı, a)bitki boyunun genotipler arası dağılımı b)dils çiçek sayısının genotipler arası dağılımı, c)toplam çiçek sayısının genotipler arası dağılımı, d)çiçek renginin genotipler arası dağılımı (1-pembe, 2-açık pembe, 3-koyu pembe, 4-beyaz, 5-bej, 6-somon, 7-çizgili).....	143
4.22. Farklı renk ve şekillerdeki Pusan mutantı çiçekler	143

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.23. Farklı renk, şekil ve boyutlardaki Pusan mutantı çiçekler.....	144
4.24. Pusan mutantı bitkilerden görünüm.....	144
4.25. Pusan mutantı kasımpatı çiçeklerinde meydana gelen renk ve şekil değişiklikleri (bar=2cm)	144
4.26. MW mutantı kasımpatı çiçeklerinde meydana gelen renk ve şekil değişiklikleri (bar=2cm)	145
4.27. Pusan mutantı kasımpatı çiçeklerinde oluşan farklı dilsî çiçek şekilleri a) spatulate ve quilled dilsî çiçekler aynı çiçek üzerinde b) UPOV' a göre dilsî çiçek şekilleri c) quilled dilsî çiçekler d) ligulate, spatulate ve quilled dilsî çiçekler aynı çiçek üzerinde	146
4.28. Pusan mutantı kasımpatı çiçeklerinde oluşan farklı çiçek renkleri.....	146
4.29. Pusan mutantı kasımpatı çiçeklerinde meydana gelen değişimler.....	147
4.30. Pusan mutant çiçeklerde meydana gelen negatif mutasyonlar (bar=2cm).....	148
4.31. MW mutantı çiçeklerde meydana gelen negatif mutasyonlar (bar=2cm).....	148
4.32. MW Çeşidi mutantlarının morfolojik özellikleri üzerinde yapılan Temel Bileşenler Analizi Grafikleri.....	149
4.33. Pusan Çeşidi mutantlarının morfolojik özellikleri üzerinde yapılan Temel Bileşenler Analizi Grafikleri.....	150

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)ŞekilSayfa

- 4.34. MW çeşidi mutantlarının morfolojik özellikleri üzerinde yapılan kümeleme analizi sonuçlarını gösteren grafik (solda) ve fan dendogram (sağda)151
- 4.35. Pusan çeşidi mutantlarının morfolojik özellikleri üzerinde yapılan kümeleme analizi sonuçlarını gösteren grafik (solda) ve fan dendogram (sağda)152

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
3.1. MS bazal besi ortamında bulunan makro-mikro elementler, vitaminler, aminoasitler, diğer maddeler ve konsantrasyonları	82
3.2. <i>In vitro</i> rejenerasyon deneme planı ve rejenerasyon ortamı içerikleri.....	83
3.3. EMD ₅₀ Işınlamaları deneme planı (yaprak, boğum, boğum arası)	91
3.4. EMD ₅₀ Işınlamaları deneme planı (dils çiçek)	93
4.1. MW çeşidinde <i>in vitro</i> rejenerasyon denemeleri sonucunda sürgün oluşturan eksplant oranı (%)	106
4.2. Pusan çeşidinde <i>in vitro</i> rejenerasyon denemeleri sonucunda sürgün oluşturan eksplant oranı (%)	108
4.3. <i>In vitro</i> rejenerasyon denemeleri sonucunda sürgün oluşturan eksplant oranı (%)	109
4.4. <i>In vitro</i> rejenerasyon denemeleri sonucunda MW çeşidinde eksplant başına düşen sürgün sayısı (adet).....	113
4.5. <i>In vitro</i> rejenerasyon denemeleri sonucunda Pusan çeşidinde eksplant başına düşen sürgün sayısı (adet).....	114
4.6. <i>In vitro</i> rejenerasyon denemeleri sonucunda eksplant başına düşen sürgün sayıları (adet)	115
4.7. <i>In vitro</i> rejenerasyon denemeleri sonucunda MW çeşidinde sürgün uzunluğu (cm)	116

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
4.8. <i>In vitro</i> rejenerasyon denemeleri sonucunda Pusan çeşidinde sürgün uzunluğu (cm)	117
4.9. <i>In vitro</i> rejenerasyon denemeleri sonucunda sürgün uzunlukları (cm)	118
4.10. <i>In vitro</i> rejenerasyon denemeleri sonucunda MW çeşidinde kök oluşturan eksplant oranları (%)	120
4.11. <i>In vitro</i> rejenerasyon denemeleri sonucunda Pusan çeşidinde kök oluşturan eksplant oranları (%)	121
4.12. <i>In vitro</i> rejenerasyon denemeleri sonucunda kök oluşturan eksplant oranları (%)	122
4.13. Gama ışınlamaları sonrası MW çeşidinde canlı eksplant oranı (%)	126
4.14. Gama ışınlamaları sonrası Pusan çeşidinde canlı eksplant oranı (%)	128
4.15. Gama ışınlamaları sonrası canlı eksplant oranları (%).....	129
4.16. Gama ışınlamaları sonrası MW çeşidinde gelişen eksplant oranı (%).....	130
4.17. Gama ışınlamaları sonrası Pusan çeşidinde gelişen eksplant oranı (%)...	131
4.18. Gama ışınlamaları sonrası gelişen eksplant oranları (%).....	132
4.19. Gama ışınlamaları sonrası MW çeşidinde eksplant başına düşen sürgün sayısı (adet).....	133
4.20. Gama ışınlamaları sonrası Pusan çeşidinde eksplant başına düşen sürgün sayısı (adet).....	134

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)ÇizelgeSayfa

- 4.21. Gama ışınlamaları sonrası eksplant başına düşen sürgün sayıları
(adet) 135
- 4.22. MW mutantı kasımpatı bitkilerine ait bazı veriler 141
- 4.23. Pusan mutantı kasımpatı bitkilerine ait bazı veriler 142
- 4.24. Geliştirilebileceği düşünülen Pusan ve MW mutantlarına ait veriler 147

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
MW	Miral White
%	Yüzde
°C	Santigrad Derece
g	Gram
GA ₃	Giberellik Asit
cm	Santimetre
m	Metre
Gy	Gray
ha	Hektar
l	Litre
mg	Miligram
mM	Milimolar
μM	Mikromolar
μL	Mikrolitre
Ca	Kalsiyum
Cl	Klor

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
CO ₂	Karbon Dioksit
HgCl ₂	Civa Klorür
dk	Dakika
BAP	6-Benzilaminopürin
IAA	İndol Asetik Asit
IBA	İndol Bütirik Asit
NAA	1-Naftalin Asetik Asit
TDZ	Thidiazuron
2,4-D	2,4 Diklorofenoksiasetik Asit
2 İP	İzopentenil Adenin
CW	Coconut Water (Hindistan cevizi suyu)
Ads	Adenin Sülfat
PG	Floroglusinol
CH	Kazein Hidrosilat
PFA	Perfloro Alkoksi
NH ₂ OH	Hidroksilamin

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
EB	Ethidyum Bromit
EMS	Etil Metan Sülfonat
DMS	Dimetil Sülfat
TEM	Trietilen Melamin
MS	Murashige ve Skoog Besin Ortamı
½ MS	Yarı güçlü Murashige ve Skoog Besin Ortamı
BBD	Bitki Büyüme Düzenleyicisi
pH	Power of Hydrogen (Hidrojenin Gücü)
H	Hidrojen
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
NaClO	Sodyum Hipoklorit
C ₂ H ₆ O	Etil Alkol
HCl	Hidroklorik Asit
K	Potasyum
KNO ₃	Potasyum Nitrat

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
TILLING	Targeting Induced Local Lesions In Genomes
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
ISSR	Inter Simple Sequence Repeats
IRAP	Inter-retrotransposon Amplified Polymorphism
TCL	Thin Cell Layer
SEM	Scanning Electronic Microscope
γ	Gama ışını
X ışını	Röntgen ışını
8-HQC	8-Hydroxyquinoline Citrate
VDE	Violaxanthin Deepoxidase
LD	Lethal Dose (ölümcül doz)
Co ⁶⁰	Kobalt-60
LCYE	Lycopene e-cyclase

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
rad	Radiation Absorbed Dose
Krad	Kilorad
Ghz	Gigahertz
RHS	Royal Horticultural Society
TENMAK	Türkiye Enerji, Nükleer ve Maden Araştırmaları Kurumu
NÜKEN	Nükleer Enerji Araştırma Enstitüsü
ETAE	Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu
lux	Lüks
PCA	Principal Component Analysis
RD ₅₀	%50 kısıalma sağlayan doz
CV(%)	The Coefficient of Variation (%)
UPOV	Uluslararası Yeni Bitki Çeşitlerini Koruma Birliği
EMD ₅₀	Etkili Mutasyon Dozu
LD ₅₀	Yarı ölümcül doz
UAEA	Uluslararası Atom Enerjisi Ajansı

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
SE	Somatik Embriyogenesisiz
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
MS	Milattan sonra
MÖ	Milattan önce
LSD	Least Significant Difference (En Önemsiz Fark)

1. GİRİŞ

Kasımpatı, Asterales takımı, Asteraceae familyasında yer alan *Chrysanthemum* cinsine ait olup, kültürü yapılan türü *Chrysanthemum x morifolium* Ramat. (*Dendranthema x grandiflora* Tzvelv. = *Chrysanthemum x grandiflorum* Ramat.)'dır (Anderson, 2006). "Doğunun Kraliçesi" ve "Sonbahar Kraliçesi" olarak bilinir. Karl Linnaeus 1753 yılında, Yunanca 'Chrysos' (altın) ve 'Anthemion' (çiçek) kelimelerini birleştirerek, kasımpatının cins ismini '*Chrysanthemum*' olarak belirlemiştir. *Chrysanthemum* cinsi içinde 160 tür bulunmaktadır (Singh, 2006). Kasımpatıların anavatanı Doğu Asya (Çin, Kore ve Japonya), Avrupa, Afrika, Cezayir ve Kanarya Adaları merkezli olmak üzere Akdeniz bölgesidir (Anderson, 2006). Türkiye'de doğal olarak yayılış gösteren iki farklı kasımpatı türü (*Chrysanthemum segetum* L.=*Glebionis segetum* L. ve *Glebionis coronarium* L.=*Chrysanthemum coronarium* L.) bulunmaktadır. *Chrysanthemum segetum* tamamen sarı yalınkat çiçekli, Mayıs-haziran ayları içinde çiçeklenen ve ülkemizin kuzeybatısı, Batı ve Güney Anadolu'da yayılış gösteren bir türdür. *Chrysanthemum coronarium* yalın ve beyaz çiçekleri ile Trakya, Batı ve Güney Anadolu'da yayılış göstermektedir (Haspolat vd., 2021). Kasımpatıda temel kromozom sayısı $x=9$ 'dur (Tanaka ve Watanabe, 1972; Watanabe, 1977). Akdeniz'de yayılış gösteren türlerin tamamına yakını diploiddir ($2n=2x=18$). Doğu kökenli türlerde poliploidi oldukça yaygındır ve diploidden, dekaploide kadar olan türler vardır (Singh, 2006).

Dünyada en fazla ithalatı ve ihracatı yapılan kesme çiçek türleri arasında olan kasımpatı, 2022 yılı itibarıyla 1.035.591.000 dolar (ithalat), 749.202.000 dolar (ihracat) değerleri ile gülden sonra ikinci sırada yer almaktadır. Royal Flora Holland mezarlarında işlem gören kesme çiçek türleri içerisinde 2020 yılı verilerine göre kasımpatı 915 milyon adet satış miktarı ve 1.34 € birim fiyatı ile dördüncü sırada yer almaktadır. Birim fiyatının yüksek olması dikkat çekicidir (Trademap, 2022; Özzambak ve Zeybekoğlu, 2023). Kasımpatı ülkemizde de en fazla üretimi yapılan kesme çiçek türlerinden biri olup İzmir bölgesi ilk sırada yer almaktadır. Bu nedenle kasımpatıda çeşit geliştirme çalışmalarının yapılmasının ülke tarımı ve sektör için oldukça önemli olduğu düşünülmektedir. Ülkemizde ıslah edilmiş ticari süs bitkisi çeşidimiz henüz istenilen seviyede değildir. Bu durum üretim materyali açısından üreticilerimizi dışa bağımlı hale getirmiş ve oldukça yüksek ıslahçı hakkı

ödeyerek üretim materyali ithal etmelerine neden olmuştur. Bu nedenle tüketici taleplerini karşılayabilecek, iç ve dış piyasada tercih edilebilecek yerli çeşitlerin geliştirilmesi sektörün birincil önceliği olmalıdır (Kazaz vd., 2015).

Mutagen uygulamalarından sonra ekonomik olarak değer taşıyan kısımları (çiçek özellikleri ve büyüme yapıları) kolaylıkla değiştirilebildiği için, süs bitkilerinde mutasyon ıslahı çok ideal bir yöntemdir. Ayrıca pek çok süs bitkisi türü heterozigottur ve genellikle vejetatif olarak çoğaltılmaktadır. Bu da mutantların M₁ generasyonunda belirlenmesine, seçilmesine ve korunmasına olanak sağlamaktadır (Schum ve Preil, 1998). Kasımpatı gibi poliploid türlerin mutasyonunda ışınlamalar ile kombine olarak *in vitro* tekniklerin kullanımı hızlı bir başarı sağlamaktadır. Vejetatif çoğalan bitkilerde kullanılan çeşitli *in vitro* teknikler, mutasyon çalışmaları için homojen ve hastalıklardan arı materyal teminine olanak sağlamaktadır. Ayrıca çok sayıdaki vejetatif eksplant ile çalışmak için küçük bir laboratuvar alanı yeterli olmaktadır. Günümüzde vejetatif çoğalan süs bitkilerinde mutasyon ıslahı rutin bir tekniktir ve bu teknik çeşit geliştirme çalışmalarında sıkça kullanılmaktadır (Schum, 2003). Nükleer Enerji Araştırma Enstitüsü ve Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü işbirliği ile kasımpatı bitkisinde yürütülen mutasyon ıslahı çalışmaları sonucu Kaan, Ozan, Bademler Beyazı ve Ege Meltemi adlı ilk yerli kasımpatı çeşitleri geliştirilmiştir (Bitki Çeşitleri Bülteni, 2022).

Kasımpatı bitkisinde kendine uyumsuzluk görülmesi, yüksek ploidi seviyesine sahip olması ve heterozigot bir yapı göstermesi nedeniyle, melezleme ve seleksiyon gibi klasik ıslah metotlarında zorluklar yaşanabilmektedir. Mutasyon ıslahı, süs bitkileri ıslahında her zaman diğer teknikleri tamamlayan bir unsur olmuştur. Islah programları için gerekli genetik materyal kaynağının ve genetik varyasyonun artırılmasına yardımcı olduğu için dikkat çekici bir ıslah metodudur. Uygulamalara çabuk cevap veren bir tür olmasından dolayı ve klasik ıslah metotlarında yaşanan bazı kısıtlamalardan dolayı kasımpatı bitkisinde sıkça kullanılmaktadır (Basiran, 2000). Süs bitkilerinde mutasyon çalışmaları çiçek karakterleri (renk, boyut, morfoloji, koku), yaprak karakterleri (şekil, boyut, pigmentasyon), büyüme yapısı (kompakt, tırmanıcı, dallanmış), fotoperiyodik tepki, erken çiçeklenme gibi fizyolojik özelliklerin değiştirilmesi ile biyotik ve

abiyotik stres faktörlerine tolerans gibi kaliteyi korumaya yönelik özellikleri içermektedir (Schum ve Preil, 1998).

Süs bitkilerinde yeni renk ve şekildeki mutant varyetelerin geliştirilmesinde büyük rol oynayan mutasyon uygulamalarında bazı darboğazlar yaşanabilmektedir. Kasımpatı gibi genellikle vejetatif çoğalan bitkilerdeki temel darboğaz, fiziksel ya da kimyasal mutagen uygulamalarından sonraki meydana gelen mutasyonların kimera olarak ortaya çıkışıdır. Dal ya da çiçekte meydana gelen mutant kısmın izolasyonu klasik çoğaltım teknikleri ile pek mümkün olmamaktadır (Datta ve Chakrabarty, 2009). Bu aşamada da *in vitro* teknikler devreye girmektedir. *In vitro* rejenerasyon ile birlikte mutasyon ıslahının birlikte kullanımı saf formda yeni mutantları oluşturmak ve yeni elde edilen farklı renk ve tipteki kasımpatı çeşitlerinin çok miktarda üretimini kolaylaştırmak için yararlı bir yaklaşım olmaktadır. Böylece, bu *in vitro* yaklaşım süs bitkileri sektörü için yeni çiçek renkleri ve tiplerinin büyük miktarlarda üretiminde yeni ufuklar açmaktadır (Verma, 2012). Mutasyon ıslahı ve *in vitro* rejenerasyonun birlikte kullanımı, mutant dokuların *in vitro* izolasyonu için boğum, boğum araları ve dilsî çiçeklerden rejenerasyon ile mutant bitkilerin eldesine yönelik olarak uygulanmaktadır (Datta ve Chakrabarty, 2009).

Yukarıda belirtilen nedenlerle bu tez çalışmasında öncelikle boğum, boğum arası, yaprak ve dilsî çiçek eksplantlarından direkt organogenesis eldesine yönelik rejenerasyon protokollerinin geliştirilmesi araştırılmıştır. Sonrasında Pusan ve MW kasımpatı çeşitlerinin eksplantlarında yapılan *in vitro* gama ışınlamaları ile farklı eksplantların *in vitro* mutagen uygulamasına verdikleri tepkiler ve mutasyon frekansları ile ileriki çalışmalarda geliştirilebileceği düşünülen farklı tipteki mutant bireylerin belirlenmesi hedeflenmiştir.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1 Kasımpatı ile İlgili Genel Bilgiler

Kasımpatının tarihsel gelişiminin 3.000 yıldan daha uzun bir süreye dayandığı bilinmektedir. M.Ö. 500 civarında ortaya çıkmış olduğu düşünülmekle birlikte, bugünkü çeşitlerinin ebeveynleri olarak *Chrysanthemum indicum* ve *Chrysanthemum sinense*'nin iki formu olduğu kesin gibi görünmektedir. Çinli filozof Konfüçyüs "Li-Ki" veya "Dokuzuncu Ay" adlı eserinde kasımpatıyı "sarı ihtişamıyla kasımpatı" olarak tanımlamıştır. Diğer kaynaklarda "altın çiçek" olarak bahsedilmiştir. İlk bitkiler yabani karakterli, genellikle sarı renkli, küçük ve tekli çiçeklere sahipti. Çinli bir kasımpatı uzmanı olan T'ao-Yuan-Ming'in (MS 365-427) kültürel yöntemlerin geliştirilmesinde büyük katkı sağladığı bilinmektedir. Çinli şairlerin kasımpatıdan eserlerinde bahsettiği, ayrıca kasımpatı replikalarının on beşinci yüzyıl Çin seramiklerinde bulunduğu vurgulanmaktadır. Kasımpatı ilk kez MS 386'da Japonya'ya ulaştı. Japonlar, kasımpatının gelecekteki potansiyelini fark ettiler ve MS 9. yüzyılda İmparator Uda, çeşitli kasımpatı türlerinin sürekli olarak geliştirildiği İmparatorluk Bahçeleri'ni kurdu. 1910 yılında kasımpatı Japonya'nın ulusal çiçeği ilan edildi. Kasımpatının Japonlar tarafından yetiştiricilik sırları gizlense de dünyaya yayılımı engellenemedi. Batı dünyası, kasımpatılarla ilk kez 1688 yılında Hollanda aracılığıyla tanıştı. Bu dönemde *Matricaria japonica* olarak yetiştirildiler, ancak bilinmeyen nedenlerle bu çeşitlerin kaybolduğu görüldü. Kasımpatılar daha sonra 1754 yılında Büyük Britanya'ya ve 1798 yılında Amerika Birleşik Devletleri'ne yayıldı (Clark, 1962; Dowrick, 1953; Emsweller et al., 1937; Anderson'dan, 2006). 1789 yılında Marsilya'dan gelen bir Fransız tüccar olan Pierre Louis Blancard'ın, Çin'den getirdiği üç çeşitten sadece bir tanesi hayatta kaldı ve Old Purple adı verildi. Sonunda bu çeşit Kew Bahçelerine ulaştı ve 1796 yılında Botanical Magazine'de yer alarak Batı dünyasında büyük ilgi uyandırdı. Kasımpatının büyük olasılıkla Asya'da melezlenmiş olabileceği düşünülmekle beraber, ilk kaydedilen melezlenmesi ve üstün fidelerin seçimi 1827 yılında M. Bernet tarafından gerçekleştirilmiştir. Ancak şüphesiz ki bundan yüzyıllar önce başka melezlemeler de yapılmış olduğu düşünülmektedir (Emsweller et al., 1937). Robert Fortune, 1843-1846 yıllarında İngiliz bahçıvanlara iki 'küçük çiçekli' tip (pompon çiçek tipleri) olan 'Pompon' ve 'Chusan Daisy' çeşitlerini tanıttı (Dowrick,

1953; Emsweller et al., 1937). Bu çeşitler İngiltere'de çok ilgi görmedi, ancak Fransa'ya gönderildi ve orada yaygın olarak melezlemelerde kullanıldı. Bu birkaç genotipin günümüzün "küçük çiçekli çeşitlerinin" atası olabileceği düşünülmektedir (Emsweller et al., 1937). Simon Delaux ve Auguste Nonin gibi Fransız kasımpatı üreticileri 1800'lerin sonlarında birçok geliştirilmiş çeşit melezlemiştir (Jones, 1958), bugün hala popüler olan melezler yaratmışlardır. ABD'ye tanıtıldıktan 28 yıl sonra, Prince's Nursery 26 çeşidi satışa sunmuştur; 1835 yılında ise Hovey's American Gardener's Magazine and Register'da 50'den fazla çeşit listelenmiştir (Emsweller et al., 1937).

Kasımpatının bir diğer adı krizantemdir. Doğuda bu çiçek o kadar popülerdir ki, Çinliler Chu-hsien şehrine "Krizantem Şehri" adını vermiştir (Randall and Wren, 1983; Anderson'dan 2006). Kasımpatı yetiştiriciliği, Japonya'da sevilen bir zaman geçirme şekli haline gelmiştir. Japonya, kasımpatı onuruna birkaç kültürel sembol veya etkinlik düzenlemiştir, bunlardan biri "Chrysanthemum Day" adlı bir mutluluk festivalidir. Estetik değerlerinin yanı sıra kasımpatılar aynı zamanda bir gıda kaynağıdır, hoş kokulu olabilir veya tıbbi amaçlarla kullanılabilir. Petalleri salatalarda yenir veya çaylarda kullanılır, yeni sürgünler (saplar/yapraklar) sebzeler gibi buharda pişirilir veya kızartılır (Woolman, 1953). Amerikan ve İngiliz Ulusal Kasımpatı Dernekleri, bahçıvanlar arasında kasımpatıların sürekli popülerleştirilmesi ve birçok amatör kasımpatı üretim programının oluşturulmasında uzun süreler görev almışlardır (Scott, 1957; Jones, 1958; Clark, 1962). ABD'de bilinen ilk kasımpatı üreticisi, Robert Kilvington, 1841 yılında Pennsylvania Horticultural Society'nin yıllık toplantısında yeni bir çeşit olan 'William Penn' adlı bir kasımpatı sergilemiştir. 1846 yılında yapılan bir başka toplantıda dernek, bir kasımpatı sergisine ev sahipliği yaparak kasımpatıları "geleceğin çiçeği" olarak tanıtmıştır (Emsweller, et al., 1937). Şu anda, sonbahar mevsimlerinde İngiltere ve Kuzey Amerika'da özel kasımpatı sergileri düzenlenmeye devam edilmektedir. Sera kasımpatılarıyla tanınmış amatör veya özel sektör üreticileri arasında Charles Totty (Madison, New Jersey, ABD), Eugene H. Mitchel (Dreer Co., Philadelphia, Pennsylvania, ABD) ve Elmer Smith (Adrian, Michigan, ABD) (Crook, 1942) bulunmaktadır. Elmer Smith, 30 yıl süren üretim çalışmaları sonucunda 1928 yılına kadar 445 çeşit tanıtmıştır (Viehmeyer and Uhlinger, 1955). ABD'de kasımpatı çılgınlığı, 1888 yılında Mr. ve Mrs. Alpheus

Hardy'ye 1.500 ABD Doları karşılığında büyük beyaz bir sera çeşidi satılmasıyla sıklıkla gösterilir (Crook, 1942); daha sonra bu çeşide 'Mrs. Alpheus Hardy' adı verilmiştir. Çoğu sera kasımpatıları olmakla birlikte 3000'den fazla çeşit bulunmaktaydı. Bu popüler çiçeğin tarihi birçok yayında kayıt altına alınmıştır (Anderson, 2006). Böylesine bir tarihsel geçmişle, kasımpatı yetiştiriciliğinin bir Ulusal kuruluşun oluşmasına yol açması beklenen bir sonuçtur ve Dünya genelinde tanınan Ulusal Kasımpatı Topluluğu (N.C.S) bu görevi üstlenmiştir.

Süs bitkilerinin kültüre alınıp yetiştirilmesi 4000 yıl öncesine dayanmakla birlikte dünyada ekonomik olarak değer görmesi 1900'lerin başlarında bazı gelişmiş ülkelerin (ABD, Hollanda, Japonya, Almanya, İngiltere, İtalya ve Fransa) kesme çiçek üretimine başlamasıyla gerçekleşmiştir. Yıllar itibariyle yeni ülkelerin de kesme çiçek, dış mekan, iç mekan süs bitkileri ve çiçek soğanları üretimine katılımıyla günümüzde yaklaşık 76 milyar dolar üretim değerine ulaşarak tarım sektöründe katma değeri en yüksek sektörlerden biri olmuştur. Türkiye' de ise süs bitkileri sektörünün başlangıcı 80 yıl öncesine dayanmaktadır. 1940'lı yıllarda İstanbul, Adalar, Yalova ve çevresinde başlamış, 1970'li yıllarda Ege Bölgesi (İzmir) ve 1980'li yıllarda Akdeniz Bölgesi (Antalya)'ne yayılmıştır. 1985 yılında Antalya'da ilk ihracatın başlamasıyla ivme kazanmıştır. Günümüzde 38 ilde süs bitkileri üretimi yapılmaktadır. Türkiye'de dış ticareti yaklaşık 124 milyon dolara, iç tüketimi yaklaşık 215 milyon dolara ulaşan süs bitkileri sektörü her geçen yıl büyümeye devam etmektedir (Kazaz, 2021).

Ülkemizde toplam süs bitkisi üretimi 2022 yılı verilerine göre 2.059.512.671 adet olmakla birlikte kesme çiçeklerin bu üretimdeki katkısı 1.404.473.345 adet ile %68.2'dir. Üretim miktarlarına göre 986.298.552 adet ile karanfil ilk sırada yer alırken, 99.417.885 adet ile gül ikinci sırada yer almakta ve 84.133.160 adet ile kasımpatı en çok üretimi yapılan üçüncü tür olarak yer almaktadır. Kasımpatı yetiştiriciliği 2016 yılında 637.2 da alanda yapılmakta iken son yıllarda gösterdiği artış ile 2020 yılında 1119.2 da, 2021 yılında 1133.4 da ve 2022 yılında 1271.7 da alana ulaşmıştır. Kesme çiçek olarak; İzmir, Antalya, İstanbul, Yalova ve Mersin illerinde yetiştirilmekle beraber üretimin %80' i İzmir ilinde gerçekleştirilmektedir. İzmir ilinde kasımpatı yetiştiriciliği 2022 yılı verilerine göre 1019.9 da alanda yapılmış ve yaklaşık 73.260.000 adet üretilmiştir (TÜİK, 2022). Yazları açık alanda

biçme tabir edilerek yapılan yetiştiricilik, diğer aylarda örtü altında gerçekleştirilmektedir. İzmir ilinde genellikle spreyci çeşitlerin yetiştiriciliği hakimdir (Özzambak ve Zeybekoğlu, 2023).

Dünya kesme çiçek ticaretinde gülden sonra en fazla ticareti yapılan tür kasımpatıdır. Dünyada 2022 yılında 1.035.591.000 dolar değerinde kasımpatı ithalatı gerçekleşmiştir. ABD 306.666.000 dolar ile en çok kasımpatı ithal eden ülke iken bunu Birleşik Krallık (152.615.000 dolar) ve Rusya (122.036.000 dolar) takip etmiştir. Türkiye ise 2022 yılında 700.000 dolar kasımpatı ithal etmiştir. Yine 2022 yılı verilerine göre dünyada 749.202.000 dolar değerinde kasımpatı ihracatı gerçekleşmiştir. Kasımpatı ihracatı konusunda Hollanda (445.773.000 dolar) en çok kasımpatı ihraç eden ülke olmuştur. Hollanda'yı Malezya (78.400.000 dolar) ve Kolombiya (72.083.000 dolar) takip etmiştir. Türkiye' de ise 24.000 dolar değerinde kasımpatı ihracatı gerçekleştirilmiştir (Trademap, 2022).

Kasımpatının orijini incelendiğinde, kuzey yarımkürede, özellikle Avrupa (Cezayir ve Kanarya Adaları merkezli Akdeniz bölgesi) ve Asya'da (Çin, Kore ve Japonya) doğal olarak yaygın olduğu bildirilmiştir (Dowrick, 1952; Hemsley, 1889; Anderson'dan, 2006). Bu çeşitlilik merkezlerinden, birçok tür Avrasya'nın geneline yayılmıştır. Yeni Dünya türlerinin çoğu tanıtılmış egzotik türlerdir, ancak *Tanacetum* spp. ve *Dendranthema arcticum*, *Dendranthema angustifolium*, *Dendranthema camphoratum* ve *Dendranthema cespitosum* dahil olmak üzere on iki tür yerli türlerdir. Akdeniz bölgesinde bulunan türler diploid ($2n=2x=18$) olup, *Leucanthemum maximum* ($2n=10x=90$) dışında tümüyle aynı sayıdadır. Oryantal türler ise diploid'den dekaploid'e kadar daha geniş bir ploidi aralığına sahiptir ki bu durum Dowrick'i (1952) poliploidinin enlem artışıyla pozitif bir ilişki içinde olduğunu düşündürmüştür. Çoğu diploid tür, muhtemel köken merkezi olan Akdeniz bölgesinde bulunurken, *Dendranthema arcticum* ($2n=8x=72$) gibi poliploid türler yalnızca Sibiry gibi uzak kuzey bölgelerinde bulunmaktadır. Kültür kasımpatıları, somatik kromozom sayıları $2n=47-63$ arasında değişen alloheksaploid ($2n=6x=54$) türlere aittir (Dowrick, 1953). *Dendranthema x grandiflora* çeşitleri, *Dendranthema erubescens*, *D. indicum*, *D. japonense*, *D. makinoi*, *D. ornatum*, *D. sinense* ve *D. zawadskii* var. *latilobum* dahil olmak üzere on veya daha fazla çoğunlukla heksaploid türe dayanan karmaşık melezlerdir

(Ackerson, 1967; Dowrick, 1953). Birçok tür, genetik iyileştirme için üreticilerin ilgisini çekmiştir ve çoğu *Dendranthema x grandiflora* gen havuzuna dahil edilmiştir (Cumming, 1939). Longley (1949, 1950), *D. zawadskii*'den türeyen 'Deanna Durbin' adlı erken çiçeklenen bir anaç kullanarak kış dayanıklılığını ve sap dayanıklılığını iyileştirmek için birçok ebeveyn türü kullanmıştır. *Dendranthema coreanum*, *D. arcticum* 'Astrid', *D. nipponicum*, *D. rubellum* (şimdi *D. zawadskii* olarak yeniden sınıflandırılmıştır) ve *D. sibiricum* da yaygın olarak kullanılmıştır (Cumming, 1939; Anderson'dan, 2006).

Kasımpatı türlerinin ve dahil oldukları cinslerin taksonomisinde zamanla değişimler yaşanmış ve yeni tanımlamalar yapılmıştır. Bu türlerin yer aldığı cinslerin tamamı kasımpatı cins birleşimi olarak da anılmıştır. Yaklaşık 200 kadar tür *Chrysanthemum* L. cinsinin altında olsa da, çoğunluğu kasımpatı cins birleşiminin altındaki 38 ayrı cins içinde yer almıştır (Haspolat vd., 2021; Anderson, 1987). Anderson' a göre (1987) başlangıçta *Chrysanthemum* cinsinin içinde yaklaşık 200 tür bulunuyordu, ancak çoğu daha sonra *Chrysanthemum* kompleksi içindeki 38 yardımcı cinslere ayrıldı. Linnaeus, bu komplekse ait türleri *Argyranthemum* Webb ex Schultz Bip., *Chrysanthemum sensu stricto* L., *Dendranthema* Des Moul., *Leucanthemum* Miller ve *Tanacetum* L. olmak üzere beş ana cinse sınıflandırdı. Günümüzde taksonomik sınıflandırma, embriyo kesesi gelişimi, bitki büyüme şekli, moleküler işaretçiler ve fitokimyasal özellikler temel alınarak yapılmaktadır (Anderson, 2006).

Kasımpatı bitkisinde taksonomik hiyerarşi;

Alem: Bitkiler

Alt Alem: Tracheobionta

Üst Şube: Spermatophyta

Şube: Magnoliophyta

Sınıf: Magnoliopsida

Alt Sınıf: Asteridae

Takım: Asterales

Familiya: Asteraceae

Cins: *Chrysanthemum* L.'dir.

Chrysanthemum cinsine ait 681 bilimsel bitki adı, tür düzeyinde sınıflandırılmıştır. Bu türler arasında kabul edilmiş 43 tür adı aşağıda sunulmuştur (The Plant List, 2023).

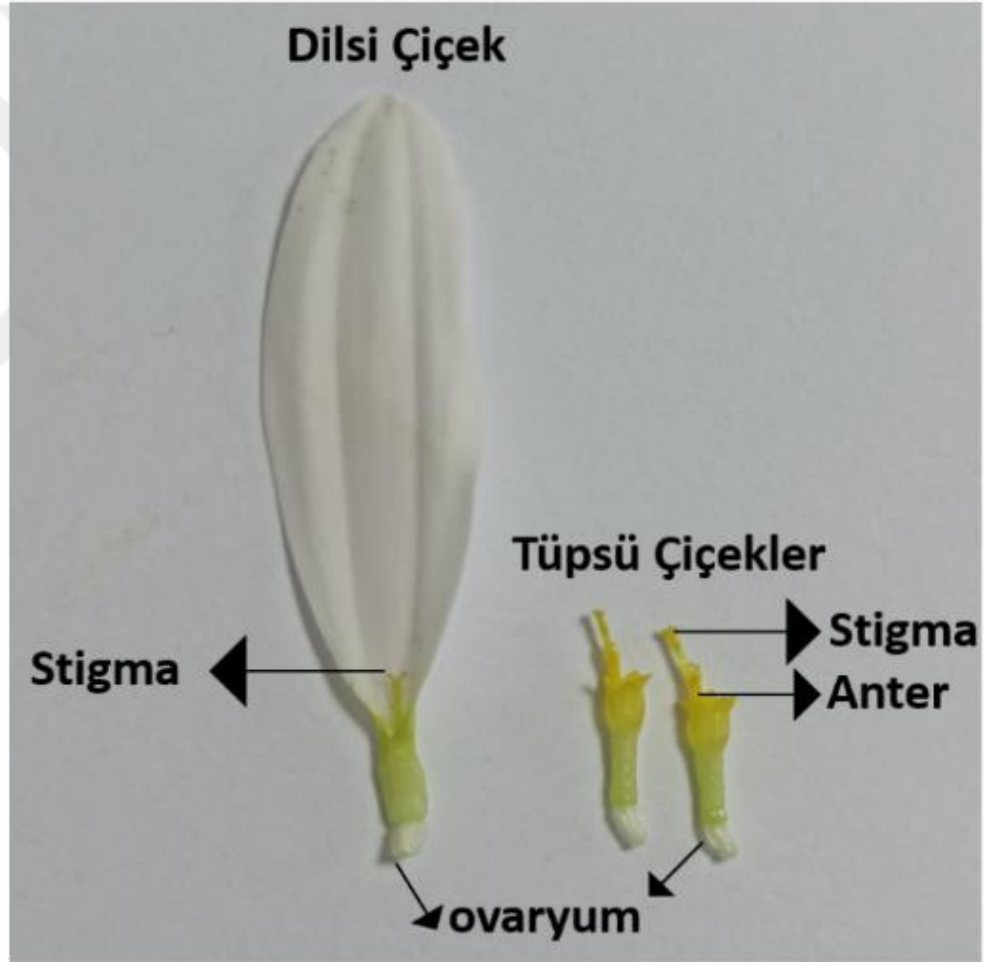
- 1- *Chrysanthemum achillaea* Linn.
- 2- *Chrysanthemum alabasicum* (H.C.Fu) H.Ohashi & Yonek.
- 3- *Chrysanthemum alabasium* (H.C. Fu) H. Ohashi & Yonekura
- 4- *Chrysanthemum brachyanthum* (C.Shih) H.Ohashi & Yonek.
- 5- *Chrysanthemum carinatum* Schousb
- 6- *Chrysanthemum chalchingolicum* Grubov
- 7- *Chrysanthemum coreanum* (H.Lév. & Vaniot) Naka
- 8- *Chrysanthemum coronarium* L.
- 9- *Chrysanthemum decaisneanum* N.E.Br.
- 10- *Chrysanthemum delavayanum* H.Ohashi & Yonek.
- 11- *Chrysanthemum dichrum* (C.Shih) H.Ohashi & Yonek.
- 12- *Chrysanthemum fastigiatum* (C.Winkl.) H.Ohashi & Yonek.
- 13- *Chrysanthemum* × *grandiflorum* Ramat.
- 14- *Chrysanthemum hypoleucum* (C.Shih) H.Ohashi & Yonek.
- 15- *Chrysanthemum indicum* L.
- 16- *Chrysanthemum junnanicum* (Poljakov) H.Ohashi & Yonek.
- 17- *Chrysanthemum kelleri* Krylov & Plotn.
- 18- *Chrysanthemum kinokuniense* (Shimot. & Kitam.) H.Ohashi & Yonek
- 19- *Chrysanthemum konoanum* Makino
- 20- *Chrysanthemum lineare* Matsum.
- 21- *Chrysanthemum marginatum* (Miq.) N.E.Br.
- 22- *Chrysanthemum mawei* Hook.f.
- 23- *Chrysanthemum maximum* L.
- 24- *Chrysanthemum miyatojimense* Kitam.
- 25- *Chrysanthemum morifolium* Ramat.
- 26- *Chrysanthemum multifidum* Desf.
- 27- *Chrysanthemum nitidum* (C.Shih) H.Ohashi & Yonek.
- 28- *Chrysanthemum parvifolium* Chang
- 29- *Chrysanthemum przewalskii* (Poljakov) H.Ohashi & Yonek.
- 30- *Chrysanthemum purpureiflorum* H.Ohashi & Yonek.

- 31-*Chrysanthemum ramosum* (C.C.Chang) H.Ohashi & Yonek.
- 32-*Chrysanthemum rhombifolium* H.Ohashi & Yonek.
- 33-*Chrysanthemum roborowskii* (Muldashev) H.Ohashi & Yonek.
- 34-*Chrysanthemum* × *rubellum* Sealy
- 35-*Chrysanthemum segetum* L.
- 36-*Chrysanthemum shihchuanum* H.Ohashi & Yonek.
- 37-*Chrysanthemum shimotomaii* Makino
- 38-*Chrysanthemum* × *superbum* Bergmans ex J.W.Ingram
- 39-*Chrysanthemum trilobatum* (Poljakov ex Poljakov) H.Ohashi & Yonek.
- 40-*Chrysanthemum tripinnatisectum* H.Ohashi & Yonek.
- 41-*Chrysanthemum vestitum* (Hemsl.) Stapf
- 42-*Chrysanthemum yoshinyanthemum* Makino
- 43-*Chrysanthemum zawodskii* Herbach

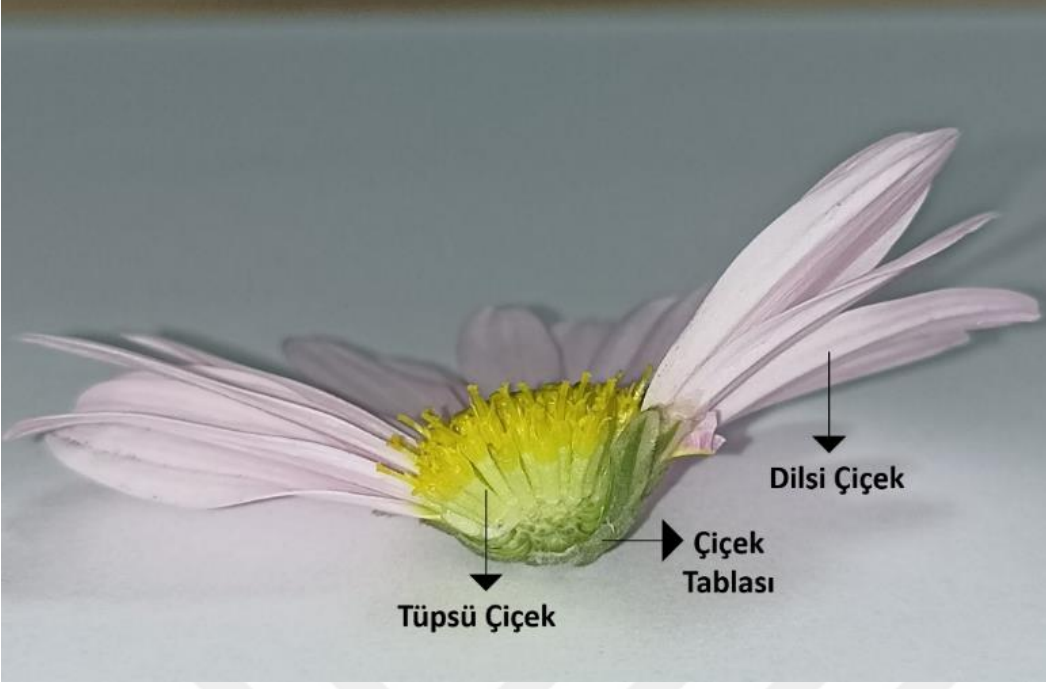
Vejetatif olarak çoğaltılan kasımpatı, *Asteraceae* familyasına ait bütün bireylerde görülen yüksek oranda kendine uyumsuzluk gösterir. Mevcut çeşitler karşılaştırıldığında morfolojik olarak petal sayıları ve çiçek renkleri çok çeşitlilik gösterir (Palai ve Rout, 2011). Doğadaki çok yıllık kasımpatılar yabancı döllen türler gibi generatif olarak (tohumla) ya da vejetatif yollarla (tepe çeliklerinin köklendirilmesi, ayırma, doku kültürü) çoğalabilirler. Ticari üretimde ise sürgün uçlarının kesilmesiyle (*in vitro* & *ex vivo*), kök sürgünleriyle veya ayırma ile çoğalabilirler (Anderson, 2004; Singh, 2006).

Kasımpatı bitkisinin yüzeysel kökleri 15-20 cm derinliğe inebilmektedir. Üst tarafta yoğunlaşan kökler bitkiyi aşırı suya ve susuzluğa karşı hassas kılar. Kasımpatının gövdesi (çiçek sapı) köşelidir ve 100-120 cm boya kadar ulaşabilmektedir. Bir bitkide bulunan gövde sayısı uç alma işlemine göre farklılık göstermektedir. Uç alma işlemi yapılmaz ise bitki tek gövdeli gelişirken, uç alma işlemi yapıldığında birden fazla gövde oluşturabilmektedir. Kasımpatıda yaprak şekli ve rengi türlere göre farklılık göstermektedir. Yaprak kenarları girintili çıkıntılı ve lobludur. Ana ve yan damarlar yaprak rengine göre daha açık yeşildir. Gövde üzerindeki her boğumdan bir yaprak çıkmaktadır, yaprak koltuklarında da bir göz bulunmaktadır (Özzambak ve Zeybekoğlu, 2023).

Kasımpatı bitkisinin bulunduğu Asteraceae familyasının en dikkat çeken özelliği çiçek durumu ve çiçek yapısıdır. Çiçek durumu, çiçek tablası (reseptakulum) üzerinde dizilmiş çok sayıda çiçek ve bu çiçekleri çevreleyen braktelerin oluşturduğu kapitulum (başcık) şeklindedir. Kasımpatıda kapitulum çok sayıda birbirinden ayrı çiçekçikten (flore) oluşmaktadır. Kapitulumu oluşturan bu çiçekler, korolla tüplerinin ucu 5 kısa dişten oluşan tüpsü (disk) tipinde ya da korolla tüplerinin uzantısı belirgin bir şerit veya dilcik halinde olan dilsî (ray) tipindedir (Şekil 2.1 ve Şekil 2.2). Tüpsü çiçekler genellikle kapitulumun orta kısmında yer alır ve erseliktirler. Dilsî çiçekler pistillidir ve tüpsü çiçekçiklerin dış çevresinde dizilmişlerdir (Cockshull 1985; Anderson, 2006; Haspolat vd., 2021).



Şekil 2.1. Kasımpatının çiçekcik (flore) yapıları

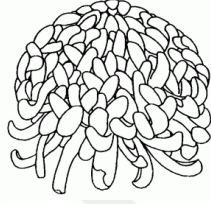


Şekil 2.2. Kasımpatının çiçek yapısı

Kasımpatılar bitki gelişim formuna, çiçeklenme tipine ve kültürel uygulamalara göre üç grup altında toplanmaktadır. Bir çiçek sapında iri ve tek bir çiçek bulunduran tipler “standart”, bir dal üzerinde birden fazla çiçek bulunduran tipler “sprey” ve sprey tiplerden farklı olarak bir dal üzerinde birden fazla küçük çiçek bulunduran tipler ise “santini” olarak ifade edilmektedir (Kazaz, 2019). Standart çeşitlerde ana tomurcuk gelişimi hakimdir ancak yan tomurcuklar da gelişip çiçek oluşturma özelliğine sahiptir. Bu durum ana çiçeğin kalitesini düşürmektedir. Bu nedenle yan tomurcukların alınması gerekmektedir. Çiçek çapı 12-15 cm’dir. Bitki boyu 1 metrenin üzerindedir. Sprey çeşitler ise çiçek sapı ucunda standart çeşitlere göre daha küçük ve çok sayıda çiçek bulunduran çeşitlerdir. Ana tomurcuk hakimiyeti bu çeşitlerde ana tomurcuğun alınması ile ortadan kaldırılmalıdır. Ana tomurcuk alınmaz ise bu tomurcuk daha iri olur ve önce çiçek açar. Sprey çeşitler ülkemizde genellikle biçme olarak adlandırılmaktadır. Santini çeşitlerde ise bitki boyu daha kısa, çiçekler sprey tiplerin çiçeklerinden daha küçük ve daha fazla sayıda çiçeğe sahip çeşitlerdir. Son yıllarda çiçek tipi nedeniyle daha çok tercih edilir hale gelmiştir (Ertan, 1982; Özzambak ve Zeybekoğlu, 2023).

Her bir çiçekciğin konumu, şekli ve sayısı çiçek biçimini belirler. Çiçek şekli ve formu kasımpatıların tanımlanmasında rehberlik yapmaktadır. Amerika Ulusal Kasımpatı Topluluğu (The National Chrysanthemum Society) tarafından tanımlanan çeşitli çiçek biçimlerine sahip 13 farklı kasımpatı sınıfı aşağıda sunulmuştur (New York Botanical Garden, 2023; The National Chrysanthemum Society Inc. USA, 2023).

Sınıf 1 - Düzensiz İçekivrik (Irregular Incurve)



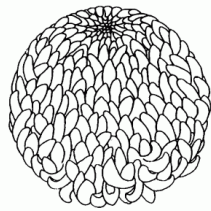
Kasımpatı dünyasının dev çiçekleridir. Çiçekler gevşekçe içekivriktir. Yukarı doğru kıvrılır ve bitkinin merkezine katlanır. Çiçeğin alt kısımlarındaki çiçekçikler düzensiz bir görünüm oluşturur. Bu kategorideki birçok çiçek çap olarak 15-20 cm arasındadır

Sınıf 2 – Refleks (Reflex)



Bu kategoride çiçekçikler aşağı doğru kıvrılır. Çiçekler tamamen açıldığında üst kısımları biraz düzleşmiş bir görünüme sahiptir. Bu çiçekler Düzensiz İçekivrik kadar büyük değildir, ancak hala çap olarak 15-20 cm arasında olabilirler.

Sınıf 3 - Düzenli İçekivrik (Regular Incurve)



Bu gruptaki çiçekçikler bir top gibi düzenli yuvarlak bir çiçek oluşturur. Çiçek boyutu çap 15-20 cm kadar ulaşabilir.

Sınıf 4 – Dekoratif (Decorative)



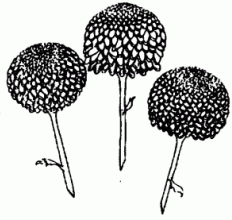
Bu kategori kasımpatıların çok yaygın olduğu bir sınıftır. Çiçekler, ilk üç sınıfa göre daha düz bir şekle sahiptir. Çiçekçikler genellikle kısadır. Üst çiçekçikler genellikle içekıvrıktır (yukarı kıvrılır) ve alt çiçekçikler genellikle refleks (aşağı doğru bükülme) eğilimindedir.

Sınıf 5 - Yarı İçekıvrık (Intermediate Incurve)



Bu popüler sınıf, Düzensiz İçekıvrıktan daha küçük olup, daha kısa ve kısmen içekıvrık olan çiçekçikleri, daha açık bir görünüme sahiptir. Düzensiz İçekıvrık ve Düzenli İçekıvrık arasında bir melez gibi görünmektedir.

Sınıf 6 - Pompon (Pompon)



Bu kasımpatıların küçük küremsi olan çiçekleri gençken daha düz iken, yaşlandıkça yuvarlaklaşır. Dilsî çiçekler düzenli bir şekilde ya içekıvrık ya da refleks olabilir. Çiçek boyutu 2.5 ile 10 cm arasında değişebilir.

Sınıf 7 - Yalın Kat ve Yarı Katmerli (Single and Semi Double)



Asteraceae familyasının birçok üyesinde gördüğünüz tipik papatya şekilli çiçekler bu grupta yer alır. Çiçeğin merkezinde yer alan tüpsü çiçeklerin etrafı, genellikle 1 ile 7 sıra arasında değişen dilsî çiçekler tarafından çevrilmiştir.

Sınıf 8 – Anemon (Anemone)



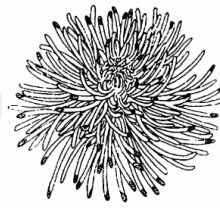
Bu sınıftaki çiçekler, yarı katmerli çiçekli kasımpatılara benzer, ancak yükseltilmiş bir merkeze sahiptirler.

Sınıf 9 – Kaşık (Spoon)



Bu sınıftaki çiçeklerde uzun, tüp şeklindeki dilsî çiçekleri spatulate olarak adlandırılan bir şekle sahiptir, yani bir kaşık gibi görünürler. Bu çiçeğin merkezinde yuvarlak ve görünür bir disk bulunur. Yarı katmerli çiçeklere oldukça benzer, ancak dilsî çiçekleri kaşıklara benzemektedir.

Sınıf 10 - Saçaklı, Kuş tüyü (Quill)



Bu sınıftaki çiçekler tamamen çift katmerli olup açık bir merkeze sahip değildir. Çiçekçikler düz ve tüp şeklinde, uçları açıktır.

Sınıf 11 - Spider (Örümcek)



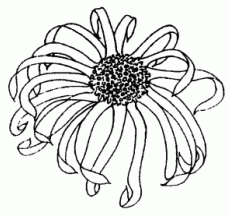
Bu sınıftaki çiçeklerin uzun, tüp şeklinde dilsî çiçekleri vardır ve uçlarında kanca veya kıvrımlar bulunur. Çiçekçikler ince veya kalın olabilir. Çiçekçikler gevşek bir kümelenme şeklinde düşer ve uçlarında dikenlere benzeyen

Sınıf 12 - Fırça ve Deve Dikenî (Brush and Thistle)

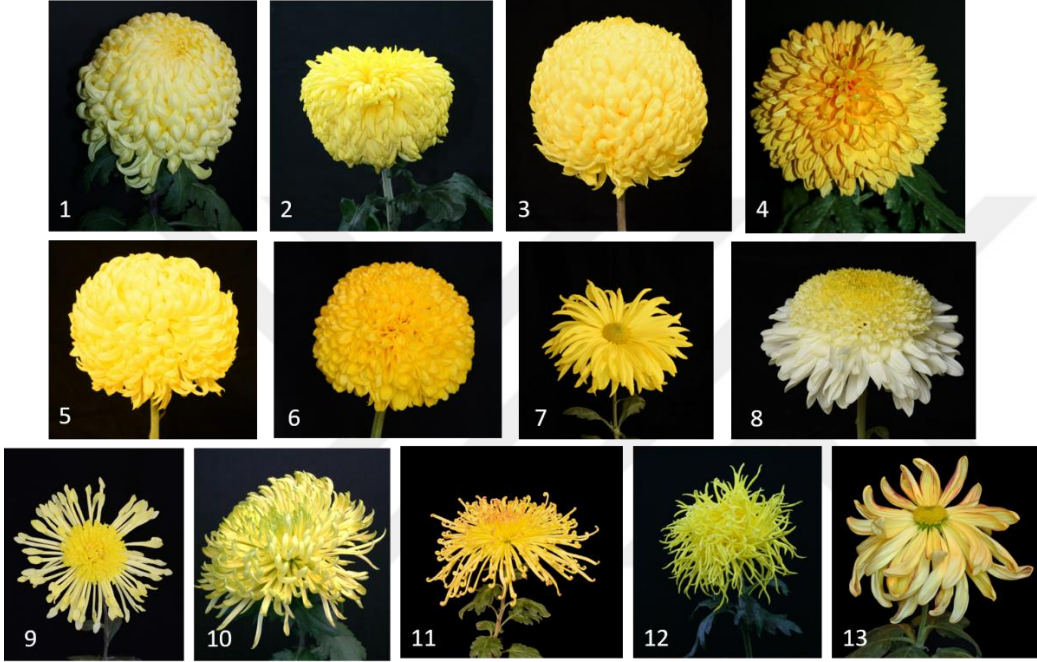


Bu grupta, fırça formunda ince, tüp şeklindeki çiçekçikler dik bir şekilde büyürken, enginar formunda çiçekçikler sapın etrafında dönüş yapar veya yatay bir şekilde yayılır.

Sınıf 13 - Sıradışı/Diğerleri (Unusual)



Bu çiçekler diğer sınıflara uymayan türlerdir. Çok egzotik olabilirler ve kıvrık çiçekçiklere sahip olabilirler. Çiçekçikler düz, kaşık benzeri veya saçaklı benzeri olabilir. Bu sınıfın üyeleri genellikle birkaç farklı sınıfın



Şekil 2.3. Amerika Ulusal Kasımpatı topluluğu tarafından çiçek şekillerine göre tanımlanan 13 farklı kasımpatı sınıfı (The National Chrysanthemum Society Inc. USA, 2023)

Serin iklim bitkisi olan kasımpatı doğal koşullarda sonbaharda çiçeklenmektedir. Çiçek tomurcuğunun oluşumu için ideal gece sıcaklığının 15-16°C olması gerekirken, gündüz sıcaklığı ise 18-21°C civarında olmalıdır. Gündüz sıcaklığı bitki boyunu etkilerken, gece sıcaklığı ise tomurcuk sayısını etkiler (Kazaz, 2019). Kasımpatı su gereksinimi fazla olan bir bitkidir. Karartma uygulamasında tomurcukların oluşmaya başladığı devrede (ilk iki hafta boyunca) yetiştirme ortamının nemi düşürülür, böylece bitki tomurcuk üretimi ve petal oluşumu için zorlanmış olur. Hasattan bir süre önce ve hasat zamanında ise çiçek sapının sertleşip odunlaşmasının önlenmesi ve su çekme yeteneğinin artırılması için bitkinin gelişim ortamı nemli tutulmalıdır (Ertan, 1982).

Kasımpatı “kısa gün” bitkisidir. Kritik gün uzunluğu 13.5 saattir. Ülkemizin de içinde bulunduğu Kuzey Yarım Küre’de 5 Ekim-10 Mart tarihleri arasında kısa gün koşulları hakimdir. Gün uzunluğu 13.5 saat veya daha az olan aylarda çiçek tomurcuğu oluşturan kasımpatı bitkisi, uzun günlerde ise vejetatif büyüme göstermektedir. Bu yüzden hasat zamanını ayarlamak için yapılan dikim planına göre, bitkilerde ışıklandırma veya karartma uygulaması yapılır. Kış aylarında dikilen kasımpatı bitkilerinin kısa gün koşullarında çiçek tomurcuğu oluşturmalarını engellemek için, gün uzunluğu, ışıklandırma kullanılarak yapay olarak uzatılır (bitki en az 16 saat ışık almalıdır). Işıklandırma bitkinin dikimi ile başlar. Bu dönemde bitkiler yaklaşık 30-35 cm boya ulaşmış olurlar. Uzun gün koşullarında bu boya ulaşma süresi çeşide, sıcaklığa, ışık şiddetine bağlı olarak 3- 6 hafta arasında değişim gösterebilmektedir (Kazaz, 2019; Özzambak ve Zeybekoğlu, 2023). Yaz ayları dışında kasımpatı bitkilerine mutlaka yeterli ışık sağlanmalıdır. Yeterli güneş ışığı almayan bitkilerde azalan fotosentetik aktiviteye bağlı olarak, çiçeklerin kalitesi azalır, ince zayıf çiçek sapı ile birlikte küçük ebatlı solgun çiçekler meydana gelir (Kumar et al., 2007). İlkbahar ve yaz aylarında yetiştirilen kasımpatı bitkileri ise uzun gün koşullarından dolayı vejetatif gelişmeye devam ederler ve tomurcuk oluşturmazlar. Çiçek tomurcuğu oluşumu için gün uzunluğu, karartma uygulanarak yapay olarak kısaltılır. Bitkiye günde en az 13 saat karanlık uygulanmalıdır (Kazaz, 2019; Özzambak ve Zeybekoğlu, 2023). Ülkemizin de içinde bulunduğu Kuzey Yarım Küre’de 10 Mart’tan itibaren günlerin uzamaya başlamasıyla 5 Ekim’e kadar olan dönemde çiçeklenmeyi teşvik etmek amacıyla karartma yapılmalıdır. Kararmayı sağlamak amacıyla ışık geçirmez siyah renkli plastik örtü veya bez kullanılır. Karartma uygulaması bitki 30-35 cm boylandığında (dikimden yaklaşık 4 hafta sonra) başlar, çiçek tomurcukları renk gösterinceye kadar devam eder. Karartma genellikle 17.00-08.00 veya 18.00-07.00 saatleri arasında yapıldığı gibi çeşitlerin gün uzunluğu isteğine göre de ayarlanabilir (Kazaz, 2019). Kasımpatı bitkisinin, kısa gün uygulamasının başlamasından çiçek hasadına kadar geçen süre (hafta); tepki süresi (reaksiyon süresi) olarak tanımlanmaktadır. Tepki süresi çeşitlere göre 7-13 hafta arasında değişim göstermektedir. Erkenci çeşitlerde tepki süresi 7-9 hafta, orta çeşitlerde 10-11 hafta, geçici çeşitlerde ise 12-13 hafta olarak belirtilmektedir. Çeşitlerin seçiminde tepki süresi yanında sıcaklığa verdiği reaksiyonda dikkate alınmalıdır. Bazı çeşitler uzun

tepki süresine sahip olmasına rağmen sonbahar ve kış aylarında gelişmemekte, çiçeklenmemektedir (Özzambak ve Zeybekoğlu, 2023).

Kasımpatılar çeşitlere göre farklı özellikler göstermekte ve gün uzunluğuna farklı tepkiler vermektedir. Bu nedenle yetiştirme dönemine uygun çeşitlerin seçilmesi önemlidir. Pazarın talepleri doğrultusunda çiçek formuna, bitki büyüme ve gelişim özelliklerine göre çeşitler tercih edilmelidir. Her çeşit her mevsim yetiştirilmeye uygun olmadığı için ülkemizde genellikle yaz aylarında yetiştirilmeğe uygun olanlar; Bacardi, Radost ve Dante, sonbahar- kış dönemi yetiştiriciliğine uygun olanlar; Salinas, İlonka, Baltica, Celebrate, Charming, Kathier, Haydar ve Chaporon, şubat- mayıs dönemi yetiştiriciliğine uygun olanlar; Salinas, Charming, Kathier ve Celebrate çeşitleridir. Çeşitlerin çiçek rengine göre tüketici tarafından tercih edilme sıralamasında beyaz çiçekli çeşitler diğer ülkelerde olduğu gibi ülkemizde de en fazla tercih edilen renk iken, sarı, kırmızı ve pembe çeşitler ise onu takip etmektedir (Özzambak ve Zeybekoğlu, 2023). Uluslararası Yeni Bitki Çeşitlerini Koruma Birliği (UPOV)'ne göre 22.478 adet kasımpatı çeşidi bulunmaktadır. Melezleme ya da mutasyon gibi farklı ıslah yöntemleriyle geliştirilen yeni çeşitlerin eklenmesiyle kasımpatı çeşit sayısı her yıl artmaktadır (Haspolat vd., 2021; Kazaz, 2020).

Kasımpatıların kesme çiçek, dış mekan süs bitkisi ya da iç mekan (saksılı) süs bitkisi olarak yetiştirilme durumuna göre, çeşit eldesinde aranan kriterler farklılık göstermektedir. Çiçekli kalma süresi uzun olan, kompakt görünümlü, homojen çiçeklenen, yüksek ya da düşük sıcaklıklara toleransı fazla olan çeşitler dış mekanda değerlendirilirken, bodur ve kompakt yapılı, homojen ve dal sayısı fazla olan çeşitler iç mekanda saksılı bitki olarak değerlendirilmektedir. Kesme çiçek kasımpatılarda ise çiçek sapı uzunluğu (70 cm), dal ağırlığı (70 g), bitki başına düşen çiçek sayısı (8-13 adet), çiçek çapı, tepki süresi ve çiçek tipleri gibi özellikler, ticari olarak önem arz eden çeşitlerde aranan kriterlerdir ve buna göre seçim yapılmaktadır (Kazaz, 2021).

2.2 Kasımpatıda *In Vitro* Rejenerasyon Çalışmaları

Biyoteknolojik yöntemlerin süs bitkileri ıslahında kullanımı günümüz modern ıslah programları için gerekli bir yaklaşımdır ve ıslah programlarına dâhil edilmesi yapılan çalışmalara olumlu katkılar sağlamaktadır. Süs bitkileri çeşit geliştirme çalışmalarında *in vitro* teknikler doğrudan doğruya ıslah yöntemi olarak kullanılabileceği gibi klasik ıslah yöntemlerinde karşılaşılan güçlükleri aşma ve ıslah süresini kısaltma şeklinde de kullanılabilir (Gülbağ, 2015; Kazaz vd., 2015).

Günümüzde devamlı değişen tüketici taleplerini karşılayabilmek için, kasımpatı ıslahında klasik yöntemlerin yanında yeni biyoteknolojik yöntemlerin kullanımı da önem taşımaktadır. Biyoteknolojik çalışmalar, *in vitro* kültür ve mikro çoğaltım, kriyoprezervasyon, moleküler yöntemler, gen aktarımı, sentetik tohum teknolojisi, sekonder metabolit üretimi ve aklimatizasyon gibi alanları içermektedir (Teixeira da Silva and Kulus, 2014). Bugüne kadar kasımpatıda biyoteknolojik amaçlı yapılmış olan pek çok kapsamlı çalışma bulunmaktadır ve her yıl yenileri eklenmektedir (Rout and Das 1997; Teixeira da Silva, 2003; 2004; Shinoyama et al., 2006, Haspolat et al., 2019; Din et al., 2020; Asoko et al., 2020; Prathyusha et al. 2021; Datta, 2023). Doku kültürü teknikleri, uygulamalı biyoteknolojik yöntemlerin birçoğuna temel oluşturmakta ve sıklıkla kullanılmaktadır.

Süs bitkilerinde biyoteknolojinin rolünün daha iyi anlaşılmasıyla; klasik ıslah, mutasyon ıslahı veya gen aktarımı yoluyla, yeni çiçek şekli ve rengine sahip, bitki büyüme yapısının değiştiği, biyotik (zararlılar ve hastalıklar) ve abiyotik strese dayanıklı (sıcaklık, tuzluluk, vb), daha uzun vazo ömrü ve dolayısıyla uzun süreli muhafaza yeteneği olan kesme çiçekler elde edilebilmektedir (Datta, 2012; Teixeira da Silva and Kulus'dan, 2014).

In vitro teknikler, bitki biyoteknolojisinin ana araçlarından biridir ve bitki hücrelerinin totipotensi doğasından yararlanır. Bu kavram ilk olarak Haberlandt tarafından (1902) önerilmiş ve daha sonra Steward et al. (1958) kesin olarak kanıtlanmıştır. Doku kültürü, *in vitro* koşullarda gerçekleşen hücre, doku ve organ kültürü olarak da bilinir (Debergh and Read, 1991). Bu işlem, nem, sıcaklık, ışık, foto periyod ve besin ortamının kontrol altında tutulduğu aseptik bir ortamda

gerçekleştirilir. Sağlıklı bitkilerin mikroçoğaltımı kısa sürede daha hızlı çoğalma sağlar. Süs bitkilerinin *in vitro* çoğaltımına yönelik çok sayıda araştırma yapılmıştır (Özzambak vd., 2017a; Özzambak vd., 2017b; Özzambak vd., 2018; Eken et al., 2019). Yapılan çalışmalarla geliştirilen bu tekniklerle hastalıklardan ari klonların büyük ölçekte üretilmesi ve gen havuzunun korunması sağlanabilmektedir. Süs bitkileri endüstrisi, özellikle üstün nitelikli çeşitlerin büyük miktarlarda üretimi için *in vitro* çoğaltma yaklaşımını yaygın bir şekilde uygulamaktadır (Rout et al., 2006; Özzambak vd., 2021a).

Kasımpatı, popüler ve talep gören bir bitki olmasından dolayı, mikroçoğaltımı ticari hedeflerinden biri haline gelmiş ve bu durum doku kültüründe toplu üretimine olanak tanımıştır. Kasımpatının çoğaltımı genellikle sürgün çelikleri ve kök sürgünleri ile vegetatif olarak yapılmaktadır. Bu geleneksel yöntem basit ve ekonomiktir. Ancak bu yöntemin de düşük çoğalma hızı, tohumluğun zayıf kalitede olabilmesi, uzun süren çoğaltma süresi, mevsimsel kısıtlamalar, yetersiz gen havuzu ve melezleme uyumsuzluğunun önlenememesi gibi bazı sınırlamaları söz konusudur. Ayrıca, anaç bitkilerden elde edilen çelikler sık sık virüslerle enfekte olabilir ve dejenerasyona uğrayabilir, bu da üretim maliyetlerini artırabilir. Bu sınırlamalar, uygun bir anaç bitkinin seçimiyle, *in vitro* çoğaltım yöntemlerinin kullanımıyla aşılabilmektedir. Kasımpatı bitkisinde *in vitro* çoğaltım materyali olarak tohumlar, çelikler, yumrular, kökler, anterler, polenler ve hatta yapraklar gibi bitkilerin çeşitli kısımları kullanılabilir. Ancak yüksek heterozigotluk göstermesi ve ticari amaçlardan dolayı vejetatif çoğaltma materyalleri ticari ve ıslaha yönelik çoğaltımda tercih edilmektedir (Datta, 2019).

Doku kültürü için kullanılacak kaynak organ, seçilen organın fizyolojik ve ontogenetik yaşı, eksplant tipi, eksplantın optimum alım zamanı, eksplant büyüklüğü, eksplantın alındığı ana bitkinin genotipi ve genel durumu, eksplantın kültüre alındığı besin ortamı bileşimi, kullanılan bitki büyüme düzenleyicileri (BBD) arasındaki etkileşim, kullanılan jelleştirici maddeler, foto periyod ihtiyacı gibi birçok faktör, kasımpatıda *in vitro* çoğaltım başarısını etkilemektedir (Eisa et al., 2022). Şu ana kadar önemli kasımpatı çeşitleri ve farklı eksplantları için pek çok protokol geliştirilmiştir (Datta et al., 2002; Karim et al., 2002; Jaramillo et al., 2008; Barakat et al., 2010a; Waseem et al., 2011a; Verma et al., 2012b; Chhetri et al.,

2013; Yesmin et al., 2014; Naing et al., 2014; Kumar et al., 2017; Kazeroonian et al., 2018; Chowdhury et al., 2021; Din et al., 2022). Ancak geliştirilen bu protokollerin tüm çeşitlerde işe yaraması mümkün olmamakla beraber bazı protokoller rejenerasyon çalışmaları için temel oluşturabilmektedir.

Kasımpatı bitkisinin çoğaltılması için, farklı büyüme düzenleyicileri veya fitohormonlar kullanılır. Bunlar arasında sitokininler, giberilinler, oksinler ve absisik asit gibi hormonlar vardır. Büyüme düzenleyicileri, besin ortamında absorbe edilme ve metabolize edilme kapasitelerindeki genotipik değişiklikler nedeniyle farklı türler üzerinde farklı etkilere sahip olabilir. Bu değişikliklere çevresel koşullardaki farklılıklar, eksplant kaynağının yaşındaki farklılıklar veya genotipler arasındaki genetik farklılıklardan kaynaklı varyasyonlar katkıda bulunabilir. Düşük konsantrasyonlar, sürgün tomurcuğu oluşumunu uyarmazken, yüksek konsantrasyonlar ise inhibitör etki gösterebilir. Yüksek konsantrasyonlarda uygulanan BBD'lerin, sürgün tomurcukları/eksplantlarının sayısını azaltma nedeni, kültüre alınan eksplantlarda biriken hormonların toksit etkileri ile açıklanabilir. Thidiazuron (TDZ) ve BAP gibi endojen sitokininlerin yüksek konsantrasyonlarda kullanımı büyüme sürecini etkileyerek olumsuz sonuçlara neden olabilir (Nahid et al., 2007; Jevremovic et al., 2011; Imtiaz et al., 2014; Eisa et al.'dan, 2022).

Park et al. (2007) önceki çalışmalara dayanarak, kasımpatı genotiplerini BBD'lerine verdikleri cevaplara göre üç gruba ayrılabilceğini öne sürmüştür. Bazı genotiplerde oksinin sitokinininden yüksek olduğu konsantrasyonlarda etkili rejenerasyon sağlanabileceğini belirtirken, bazı genotiplerde ise oksine göre daha yüksek konsantrasyonda sitokinin ilavesinin etkili bir rejenerasyon sağlayabileceğini belirtmiştir. Üçüncü grubun ise benzer konsantrasyonlarda oksin ve sitokinin bulundurulması ile etkili rejenerasyonun sağlanacağını bildirmiştir. Kasımpatı bitkisinin farklı eksplantları ortama eklenen BBD'lere farklı yanıtlar vermektedir. Yaprak eksplantlarının gövde eksplantlarına göre daha yüksek konsantrasyonlarda oksine ihtiyaç duyduğu belirtilmiştir. Sitokininler, bitki doku kültüründe sürgün rejenerasyonunda önemli bir rol oynar ve BAP sürgün rejenerasyonunu indüklemek için en etkili sitokininlerden biridir. Kasımpatı bitkisinin farklı eksplantlarında yapılan birçok araştırmada direkt bitki

rejenerasyonu BAP ile güçlendirilmiş bitki besin ortamlarında elde edilmiştir (Park et al., 2007; Waseem et al., 2009; Barakat et al., 2010a; Mani and Senthil, 2010).

In vitro koşullarda kültüre alınan bir eksplanttan elde edilen sürgün sayısının çokluğu, *in vitro* çoğaltma tekniklerinin başarısı için önemli bir niceliktir. Sürgün ucu ve boğum eksplantlarının *in vitro* rejenerasyon kapasitesi yüksektir. Ana bitkide zaten mevcut olan tomurcukların kullanılması, genetik olarak istikrarlı sürgünler oluşturarak hızlı klonal çoğalma için etkili bir yöntem sağlar (Pant et al., 2015).

Bu kapsamda bazı sürgün ve boğum eksplantlarıyla yürütülen rejenerasyon çalışmaları aşağıda sunulmuştur.

In vitro koşullarda direkt rejenerasyon, çoğaltma ve köklendirme protokollerinin geliştirilmesi amacıyla yapılan bir çalışmada boğum parçaları ve sürgün uçlarından 1.0 mg/l BAP ile desteklenmiş MS besin ortamında %95 ve %91 oranlarında sürgün rejenerasyonu elde edilmiş ve köklenme ise 0.2 mg/l İndol Bütirik Asit (IBA) ile desteklenmiş ½ MS ortamında meydana gelmiştir (Karim et al., 2002).

Waseem et al. (2009), kasımpatı (*Chrysanthemum morifolium* L.) bitkisinin sürgün ucu eksplantının kullanıldığı çalışmada İndol Asetik Asit (IAA), NAA, IBA ve 2,4-Diklorofenoksiasetik Asit (2,4-D) gibi farklı oksin ile BAP gibi sitokinin konsantrasyonlarını ve kombinasyonları denenmiştir. Çalışmada sürgün oluşturma yüzdesi, eksplant başına ortalama sürgün sayısı, sürgün uzunluğu, sürgün başına yaprak sayısı, sürgün başına boğum sayısı gibi özellikler gözlenmiştir. Düşük IAA konsantrasyonu (0.1 mg/l) tek başına kullanıldığında sürgün oluşumu (%86.6), eksplant başına sürgün sayısı (3.9 adet), sürgün uzunluğu (4.3 cm), yaprak sayısı (10.0 adet) ve boğum sayısı (4.8 adet) gibi hemen hemen tüm parametrelerde en iyi sonucu vererek diğer tüm konsantrasyonları geride bıraktığı bildirilmiştir. BAP'ın ara konsantrasyonu (1.0 mg/l) tek başına kullanıldığında maksimum sürgün oluşumu (%93.3), eksplant başına sürgünü sayısı (4.1 adet), sürgün uzunluğu (5.0 cm), yaprak sayısı (11.0 adet) ve boğum sayısı (5.5 adet) gibi parametrelerde diğer tüm BAP konsantrasyonlarından daha iyi sonuç verdiğini tespit etmişlerdir. Orta

düzeylerde BAP (1.0 ve 2.0 mg/l) ile birlikte daha düşük IAA konsantrasyonları (0.1 ve 0.2 mg/l) ile desteklenen MS ortamının, diğer konsantrasyonlar ve kombinasyonlara kıyasla daha iyi sonuç verdiği, köklenmenin ise 0.2 mg/l IBA ile takviye edilmiş ½ MS ortamında sağlandığı saptanmıştır.

Waseem et al. (2011a), kasımpatının boğum eksplantlarından etkili bir bitki rejenerasyon protokolü geliştirilmesini amaçladıkları çalışmada, boğumlar %1.0 civa klorürde 3 dakika sterilize edilerek ve IAA'nın ve BAP'ın farklı konsantrasyon ve kombinasyonlarıyla desteklenmiş MS ortamında kültüre alınmıştır. Sürgün oluşum yüzdesi, bitki başına ortalama sürgün sayısı, sürgün uzunluğu (cm), sürgün başına yaprak sayısı, sürgün başına boğum sayısı gibi parametreler incelenmiştir. IAA'nın orta seviyelerdeki konsantrasyonu (0.3 mg/l) yalnız başına kullanıldığında sürgün oluşum oranı (%80.0), eksplant başına sürgün sayısı (4 adet), sürgün uzunluğu (5.1 cm), sürgün başına yaprak (11.3 adet) ve boğum sayısı (5.6 adet) gibi parametrelerde en iyi sonucu verdiğini bildirmişlerdir. Benzer şekilde orta seviyedeki BAP (1.0 mg/l) konsantrasyonu da yalnız kullanıldığında %100 sürgün oluşumu sağladığını, eksplant başına sürgün sayısının 4.9 adet, sürgün uzunluğunun 5,8 cm, sürgün başına yaprak sayısının 13.4 adet ve sürgün başına boğum sayısının 6.3 adet olduğunu belirlemişlerdir. Düşük konsantrasyonlardaki IAA'nın (0.1 ve 0.2 mg/l), orta seviyedeki BAP (1.0 ve 2.0 mg/l) konsantrasyonlarıyla yapılan kombinasyonlarında boğum eksplantının rejenerasyonunda olumlu bir etkiye sahip olduğu bildirilmiştir. Köklenmenin ise sırasıyla 0.2 mg/l IBA, 0.2 mg/l NAA ve IAA ile desteklenmiş ½ MS ortamlarında iyi sonuçlar verdiği belirtilmiştir.

Farklı BBD konsantrasyonları ve kombinasyonları ile desteklenmiş MS ortamından sürgün ucu eksplantı kullanılarak yeni sürgünler elde edilen başka bir çalışmada; sürgün oluşum yüzdesi, eksplant başına ortalama sürgün sayısı (adet), sürgün uzunluğu (cm), sürgün başına yaprak sayısı (adet) ve sürgün başına boğum sayısı (adet) gibi farklı parametreler incelenmiştir. Tek başına kullanıldığında NAA'nın en düşük konsantrasyonu (0.5 mg/l), diğer tüm NAA konsantrasyonlarından, sürgün oluşumu (%80.0), eksplant başına sürgün sayısı (3.2 adet), sürgün uzunluğu (3.4 cm), yaprak sayısı (9,5 adet) ve boğum sayısı (4.5 adet) gibi parametrelerde daha üstün sonuç vermiştir. Tek başına kullanıldığında BAP'ın orta konsantrasyonu (1.0 mg/l), diğer tüm BAP konsantrasyonlarından daha iyi sonuç vermiştir (%93.3

sürgün oluşumu, 4.1 adet eksplant başına sürgün sayısı, 5.0 cm sürgün uzunluğu, 11 adet yaprak sayısı ve 5 adet boğum sayısı). Benzer şekilde, NAA ve BAP'ın farklı konsantrasyonlarının kombinasyonu kullanıldığında, kasımpatı bitkiciklerinin orta konsantrasyonlu rejenerasyonu ile ilgili önemli sonuçlar elde edilmiştir. Daha düşük konsantrasyonlarda NAA (0.5 ve 1.0 mg/l) ve BAP (1.0 ve 1.5 mg/l) ile desteklenmiş MS ortamı, diğer konsantrasyonlar ve kombinasyonlara kıyasla daha iyi sonuçlar vermiştir. 0.2 mg/l IBA ile desteklenmiş ½ MS ortamından tatmin edici köklenme yanıtı alınmıştır (Waseem et al., 2011b).

Sürgün uçlarının eksplant kaynağı olarak kullanıldığı bir çalışmada farklı konsantrasyonlardaki oksin (IAA, IBA) ve sitokinin (kinetin) kombinasyonları ile desteklenmiş MS ortamlarının rejenerasyon durumları araştırılmıştır. Sürgün rejenerasyonu için çeşitli uygulamalar arasında, 3.0 mg/l kinetin + 2.0 mg/l IAA içeren MS ortamı %67.82 rejenerasyon oranı ile en iyi sonucu vermiştir. Köklenme ise %82.12 ile 1.0 mg/l IBA ile takviye edilmiş MS ortamından sağlanmıştır (Nalini, 2012).

Yesmin et al. (2014) tarafından *Chrysanthemum morifolium* için etkin bir *in vitro* bitki rejenerasyon protokolü geliştirilmiştir. Boğum eksplantları, çeşitli kombinasyonlar ve konsantrasyonlarda BBD (sitokininler veya oksinler) içeren MS besin ortamında kültüre alınmıştır. 1.0 mg/l BAP ve 0.1 mg/l IAA ile desteklenmiş MS ortamında maksimum sürgün rejenerasyonu (%93.33), eksplant başına en iyi sürgün sayısı (21.73 ± 1.19) ve en yüksek sürgün uzunluğu değerlerine (6.43 ± 0.31) ulaşılmıştır. Köklenme için, *in vitro* koşullarda yetiştirilen iyi gelişmiş sürgünler, farklı konsantrasyonlarda IBA, IAA ve NAA ile takviye edilmiş ½ MS ortamında kültüre alınmıştır. 0.2 mg/l IBA ile güçlendirilmiş yarı-güçlü MS ortamına transfer edilen eksplantlarda 4 hafta içinde yüksek oranda bir köklenme sağlanmıştır (%98.0).

Alsoufi et al. (2021) tarafından yürütülen kasımpatı bitkisinin mikroçoğaltımında kullanılan BBD'lerin optimal konsantrasyonlarının belirlenmesinin amaçlandığı çalışmada, *Chrysanthemum indicum* L. sürgünlerinin tekli boğumları eksplant kaynağı olarak kullanılmış ve büyüme düzenleyicisi olarak da kinetin konsantrasyonları (0.0-4.0 mg/l) tek başına ve IBA ile birlikte (0.0-0.6

mg/l) kullanılmıştır. Sonuçlar kinetinin IBA ile kombinasyonunun, kinetinin yalnız kullanımından daha etkili olduğunu göstermiştir. 4.0 mg/l kinetin, MS ortamına yalnız eklendiğinde sürgün sayısı 3.3 adet, sürgün uzunluğu 3.81 cm ve yaprak sayısı 5.3 adet olarak bulunurken, 4.0 mg/l kinetin ile 0.6 mg/l IBA'nın MS ortamına birlikte eklenmesiyle sürgün sayısı 7.2 adet, sürgün uzunluğu 5.27 cm ve yaprak sayısı 17.0 adete yükselmiştir. Çoğaltma deneylerinden elde edilen sürgünlerin köklendirilmesi için farklı IBA büyüme düzenleyici konsantrasyonları (0.0-2.0 mg/l) ile güçlendirilmiş MS ve ½ MS ortamı kullanılmıştır. ½ MS ortamına, 1.0 mg/l IBA'nın ortama eklenmesiyle köklenme yüzdesi (%90.0), ortalama kök sayısı (12.5 adet) ve ortalama kök uzunluğu (3.5 cm) açısından en yüksek ortalama değerleri verdiği bildirilmiştir.

Yaprak eksplantlarıyla yürütülen rejenerasyon çalışmaları aşağıda sunulmuştur.

Jarzina et al. (1982), kasımpatı bitkisinin yaprak eksplantlarını farklı oksin ve sitokinin hormonlarınca desteklenmiş MS besin ortamında kültüre almışlar ve en kullanışlı ortamın 4.0 mg/l kinetin, 2.0 mg/l NAA ve 50.0 mg/l PFA (Perfloro alkoksi) olduğunu bildirmişlerdir.

Naing et al. (2014), *Chrysanthemum* cv. Vivid Scarlet yaprak segmentlerinden etkili bir sürgün rejenerasyonu protokolü geliştirmek amacıyla BBD'lerin, karanlık inkübasyon süresinin, jelleştirme ajanlarının ve gümüş nitratın etkilerini incelemişlerdir. En yüksek sürgün sayısı (12.3 adet) ışık koşullarında herhangi bir başlangıç karanlık süresi olmaksızın kültüre alınan yaprak eksplantlarında, 1.0 mg/l BAP ve 2.0 mg/l NAA kombinasyonu ile MS ortamında sağlanmıştır. Sürgün rejenerasyonuna etkisini incelemek için test edilen jelleştirme ajanları arasında en etkili Gelrite'in olduğu tespit edilmiştir. Gümüş nitratın varlığı sürgün rejenerasyonunu belirgin şekilde engellemiştir. Gelrite ile jelleştirilmiş hormon içermeyen MS ortamında üstün bir bitki büyümesi ve köklenme gözlemlendiği bildirilmiştir. Flow sitometri analizi, *in vitro* koşullarda rejenere edilen bitkiler ve ana bitki arasında hiçbir ploidy farklılığı olmadığını ortaya koymuştur. Oluşturulan protokol, test edilen altı çeşitten dördü için sürgün rejenerasyonuna uygulanabilir olmuştur. Doku kültürü çalışmaları kontrollü bir

ortamda yapılmasına rağmen, eksplantın kültüre alındığı mevsimin bitki rejenerasyonu üzerine etkisinin bulunduğu bildirilmiştir.

Bangladeş'teki iki yerel çeşit olan BARI *Chrysanthemum*-2 (BARI Chry-2) ve yerel sarı (Y) kullanılarak, *Chrysanthemum morifolium* Ramat için verimli ve hızlı bir *in vitro* rejenerasyon protokolü geliştirilmiştir. *In vitro* koşullardaki genç yaprak eksplantları kullanılarak rejenerasyon protokolünü optimize etmek için çalışmada BAP ve IAA'nın dokuz farklı konsantrasyonu ve kombinasyonu ile desteklenmiş MS ortamı kullanılmıştır. Her iki çeşit için de yaprak eksplantlarından doğrudan organogenez 0.5 mg/l BAP ve 2.0 mg/l IAA (T6) ilavesiyle MS ortamında olduğu belirlenmiştir. Yaprığın adaksial yüzeyinde doğrudan sürgün tomurcukları oluşturarak en yüksek rejenerasyon yüzdesini (BARI Chry-2 için %90.0 ve Y için %94.73), en yüksek sürgün sayısı/eksplant (BARI Chry-2 için 7.6 ve Y için 8.6) ve kültürün altıncı haftasında maksimum sürgün uzunluğu (BARI Chry-2 için 3.0 cm ve Y için 2.9 cm) bu ortamda sağlanmıştır. İlk olarak rejenerasyon süreciyle oluşan eksplantlar, 4 hafta sonra hormonsuz MS ortamına alt kültüre alınmıştır. Sürgünlerin uzaması sırasında, rejenerasyon sürecinde elde edilen sürgünlerin %90-95'i, 7-8 hafta içinde hormonsuz MS ortamında spontan olarak köklendiği belirlenmiştir. Köklü *in vitro* bitkicikler aklimatizasyondan sonra tarlaya aktarılmış ve herhangi bir değişiklik olmaksızın %100 hayatta kalma oranı ile çiçeklenmeleri gözlenmiştir (Chowdhury et al., 2021).

Çiçek eksplantlarıyla ilgili yürütülen rejenerasyon çalışmaları aşağıda sunulmuştur.

Doğal ya da yapay olarak meydana gelen somatik çiçek rengi mutasyonları genellikle sektöriyel kimera olarak kendini gösterir. Beyaz çiçek rengine sahip “Kasturba Gandhi” kasımpatı çeşidinde sarı renk, sektöriyel kimeradan organogenesis ile başarıyla sağlanmıştır. Çiçek eksplantları yüzey sterilizasyonu ardından 0.2 mg/l NAA ve 1.0 mg/l BAP ile desteklenmiş MS ortamında kültüre alınmışlardır. GA₃'in kallus dokusunun rejenerasyonu üzerindeki etkisinin de incelendiği çalışmada eksplantların %82.0'sinde kallus meydana gelirken, 43 eksplantın 4'ünde direkt sürgün elde edilmiştir. Adventif sürgün oluşumu yalnızca

GA₃'in varlığında meydana gelmiştir. Tüm direkt ve kallustan rejenere olan bitkilerin çiçek renginin sarı olduğu tespit edilmiştir (Chakrabarty et al., 2000).

Tanaka et al. (2000) tarafından yapılan çalışmada, *Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitamura cv. Aboukyu'nun dilsî çiçeği eksplantlarının üzerinde yüksek konsantrasyonlarda IAA ve kinetin içeren MS besin ortamında somatik embriyogenesiz (SE) gözlemlenmiştir. NAA'de de SE gözlenmesine rağmen IBA veya 2,4-D kadar etkili olmamıştır. BAP ve TDZ gibi diğer sitokininlerin SE üzerinde etkisi olmamıştır. Daha düşük IAA konsantrasyonları ile kinetin kombinasyonunda ve çeşitli BAP konsantrasyonlarında embriyo gözlenmemiştir, ancak yüksek BAP konsantrasyonları birçok adventif sürgün oluşturmuştur. Herhangi BBD ile desteklenen besin ortamlarında kültüre alınan yaprak eksplantlarında SE gözlenmemiştir. Histolojik olarak, primordialar, sürgün ve kök primordiaları arasında iyi gelişmiş bir vasküler demete sahip tipik bir embriyo şekline sahip olduğu tespit edilmiştir. Embriyoların hem stoma hücrelerine hem de polariteye sahip bir kök sisteminin olduğu bildirilmiştir.

Vilasini et al. (2000), *Chrysanthemum morifolium*' un 5 çeşidinde eksplant kaynağı olarak dilsî çiçekleri *in vitro* koşullarda kültüre almışlardır ve somaklonal varyasyon açısından incelemişlerdir. Rejenere sürgünlerin vejetatif aksamında ve çiçeklenmesinde farklılıklar kendini göstermiştir. Sarı renkli çiçekleri izole edip, stabil mutant olarak rejenerasyonunu başarıyla sağlamışlardır. Bu gibi mutantların sınırlı alanda yer almaları ve bulundukları bölge nedeniyle vejetatif olarak izole edilmesi mümkün olmayacağı için, *in vitro* tekniklerin, bunun gibi doğal olarak meydana gelen renk mutantlarının korunmasında kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

Park et al. (2007), çiçek eksplantı yaşının adventif sürgün rejenerasyonuna etkisinin araştırıldığı çalışmada farklı kasımpatı çeşitlerinde ("Klondike", "Pink Pixie Time", "Orlando") farklı konsantrasyon ve kombinasyonlardaki BBD'lerin (IAA, BAP, kinetin) rejenerasyon üzerine etkisi de incelenmiştir. En yüksek rejenerasyonun tam çiçeklenmeden 2-3 gün önce toplanan dilsî çiçeklerin, 14 gün karanlıkta tutularak ve 57.0 µM IAA, 44.0 µM BAP ve 0.4 µM kinetin ile

desteklenmiş MS ortamında kültüre alınmasıyla elde edilmiştir. Köklenerek dış koşullara alıştıran bitkilerin benzer morfolojik özellik gösterdiği bildirilmiştir.

Chrysanthemum morifolium'a ait 9 çeşidin dils çiçek eksplantlarında bitki rejenerasyon kapasitesini belirlemek için yapılan çalışmada *in vitro* kültür denemelerinin sonucunda genotiplerin, ortam protokollerinin ve her ikisinin birbiriyle olan etkileşimleri önemli bulunmuştur. Kallustan gelişen eksplant oranları “Ping Pong” çeşidinde %73.83, “Palisade White” çeşidinde %25.67 aralığında değişmekle birlikte ortalama %48.28 olmuştur. En yüksek embriyojenik kallus, sürgün oluşumu ve sürgün uzunluğu ortalaması “Delister White” çeşidinde protokol B (1.0 mg/l BAP+0.5 mg/l NAA)' de elde edilmiştir. Protokol A (0.5 mg/l BAP+0.2 mg/l NAA) ve Protokol B bitki rejenerasyonu için en iyi sonuç veren ortamlar olmuştur. “Delister White” çeşidinin protokol A ve protokol B ile birlikte kullanımının *in vitro* mutagenesis çalışmalarında başarıyla yararlanılabileceği bildirilmiştir (Barakat et al., 2010a).

Geçmişten günümüze kasımpatının *in vitro* rejenerasyonunda etkili olan faktörler ile ilgili pek çok çalışma yürütülmüştür. Bunlardan biri 2011 yılında Kulpa tarafından yürütülmüş olup, çalışmada kasımpatının (*Dendranthema x grandiflora* (Ramat.) Kitamura) çiçek kısımlarının organogenesizi üzerine başlangıç materyalinin, BBD'lerin ve ışığın etkisi araştırılmıştır. Erica kasımpatı çeşidinin dils çiçekleri, tüpsü çiçekleri ve çiçek tablasının başlangıç materyali olarak kullanıldığı çalışmada eksplantlar, oksin (1.0 mg/l IAA, IBA, NAA ve 2,4-D) veya sitokinin BAP (0.1'den 2.0 mg/l' ye kadar) ve oksin NAA (1.0 den 5.0 mg/l'ye kadar) kombinasyonunu içeren MS ortamında kültüre alınmıştır. Kültürlerin yarısı aydınlık yarısı karanlık ortamda tutulmuştur. Çalışma sonucunda Erica kasımpatı çeşidinin rejenerasyonu çiçek kısımlarından başarıyla yapılmıştır. Deneme koşullarında tüpsü çiçekler en zayıf rejenerasyon kabiliyetini gösterirken, çiçek tablasından ise en yüksek rejenerasyon sağlanmıştır. Başlangıç materyalinden bağımsız olarak en yüksek rejenerasyon BAP (2.0 mg/l) ve NAA (5.0 mg/l) içeren MS ortamında elde edilmiştir. Işık ise tüm denemelerde rejenerasyonu teşvik etmiştir (Kulpa, 2011).

Thangmanee and Kanchanapoom (2011), farklı BBD ve konsantrasyonlarının kallus oluşumu, adventif sürgün oluşumu ve kök oluşumuna etkisini araştırdıkları çalışmada kasımpatı bitkisinin dilsî çiçeklerini BA ve 2,4-D'nin çeşitli kombinasyonlarını ve konsantrasyonlarını içeren MS ortamında *in vitro* koşullarda kültüre almışlardır. 13.3 µM BA ve 0.5 µM 2,4-D ile güçlendirilmiş MS ortamının en yüksek kallus oluşumunu verdiğini bildirmişlerdir. Kallusların pek çok adventif sürgün oluşturduğu çalışmada en yüksek sürgün oluşumunun %45.0 ile 9.3 µM kinetin ve 4.9 µM IBA içeren MS ortamında sağlandığı ve sürgünlerden %100.0 köklenme elde edildiği belirtilmiştir. Bununla birlikte, 12.3µM IBA içeren MS ortamından, sürgün başına en yüksek kök sayısının (40 adet) elde edildiği ifade edilmiştir.

Thai Chen Queen kasımpatı çeşidinin dilsî çiçeklerinden yeni mutasyonları izole etmek için verimli bir *in vitro* rejenerasyon protokolü geliştirilmiştir. Verma et al. (2012b) tarafından yapılan çalışmada dilsî çiçekler, mancozeb-45 (0.1%) + karbendazim (0.1%) + 8-HQC (200 mg/l) ile ön işlem gördüğünde, en yüksek hayatta kalma yüzdesi (%89.44) elde edilmiştir. Dilsî çiçeklerin yüzey sterilizasyonu için civa klorür (0.1% HgCl₂) ile dört dakika boyunca muamele edilmesinin uygun bir yöntem olduğu belirtilmiştir. Rejenerasyon yüzdesi (%93.33), eksplant başına sürgün sayısı (5.67 adet) ve sürgün rejenerasyonu için gereken minimum gün sayısı (30.67 gün) açısından en iyi sonuçlar 4.0 mg/l BAP ve 0.1 mg/l NAA içeren MS besin ortamından elde edilmiştir.

Lee et al. (2013), ARTI-purple ve ARTI-queen kasımpatı mutant çeşitlerinin *in vitro* rejenerasyon yeteneklerini araştırmışlardır. Henüz açmamış ve erken çiçeklenme dönemlerinde bulunan tüpsü ve dilsî çiçekleri BA, NAA ve IAA ile güçlendirilmiş MS temel besin ortamında kültüre almışlardır. En yüksek rejenerasyon oranını NAA ve BA kombinasyonu ile güçlendirilmiş ortamda tüpsü çiçeklerin henüz açmadığı zamanda alınan eksplantlardan elde etmişlerdir. En iyi kombinasyon 1.0 mg/l NAA ve 0.5 mg/l BAP ile ARTI-purple çeşidinde %49.7 rejenerasyon ile sağlanmıştır. ARTI-queen çeşidinde ise 2.0 mg/l NAA ve 1.0 mg/l BAP kombinasyonunda %25.6 oranında rejenerasyon sağlanmıştır. Çalışma sonucunda aynı varyeteden elde edilen mutant bireylerin rejenerasyon oranlarının oldukça farklı olduğu belirlenmiştir. İlk kez aynı varyeteden gelen mutant kasımpatı

bitkilerinin rejenerasyon yeteneklerinin ölçüldüğü bu çalışmanın mutasyon ıslahı ile geliştirilen farklı kasımpatı bitkilerinde rejenerasyon etkinliğinin belirlenmesinde faydalı olacağı düşünülmektedir.

Chhetri et al. (2013) tarafından standart tip bir kasımpatıda verimli bir bitki rejenerasyon protokolü geliştirmek amacıyla yürütülen çalışmada eksplant olarak çiçek tomurcuklarından (4 veya 8 cm çapında) elde edilen dilsî çiçekler kullanılmıştır. En yüksek sürgün rejenerasyonu %96.0 oranında 0.5 mg/l IAA, 2.0 mg/l BA, %3 süzkroz ve % 0.8 agar ile takviye edilmiş MS besiyerinde elde edilmiştir. Karanlık koşullar altında 14 gün ön kültürde bekletilen eksplantlardan elde edilen sürgün rejenerasyonu, sürekli 16 saatlik bir fotoperiyod (40 μ molm-2s-1) altında kültürlenen eksplantlardan daha iyi sonuçlar vermiştir. Sürgün rejenerasyon oranları çeşitlere göre farklılık göstermekle birlikte, en düşük Shinmato çeşidinde %19.0 oranında, en yüksek de Baeksun çeşidinde %89.1 oranında elde edilmiştir.

Imtiaz et al. (2014), 'Fenzhuang' kasımpatı çeşidinde dilsî çiçeklerin *in vitro* çoğaltımı için BA'nın NAA ile kombinasyonunun etkilerini değerlendirmiş, kimeralı dilsî çiçeklerden yeniden üretilen bitkilerdeki çiçek rengi varyasyonunu incelenmişlerdir. Sürgün oluşumu için 2.0 mg/l BA + 1.0 mg/l NAA'nın %93.3 rejenerasyon oranı ve eksplant başına 10 adet sürgün sayısı ile en uygun kombinasyon ve konsantrasyon olduğu saptanmıştır. Köklenme oranı ve dış koşullara aktarma sonrası canlılık oranı ½ MS ortamında %100.0 olarak kaydedilmiştir. Elde edilen bitkilerin çiçek renklerinde geniş bir varyasyon gözlemlenmiştir. Pembe dilsî çiçeklerden rejenerasyon sağlanan bitkilerin çiçek rengi beyazdan sarıya kadar değişse de, en fazla pembe çiçek renkli bitkiler elde edilmiştir. Ancak, bu bitkilerin çiçeklerinde kimera tespit edilmemiştir. Çiçek rengi kimerası olan bitkilerden yeniden üretilen bitkilerde ise daha fazla çiçek rengi varyasyonu gözlemlenmiştir. Bazı bitkilerin çiçek rengi kimerizmini koruyabildiği, ancak sadece beyaz ve pembenin kimerik renklerinin %4 kimerik renk oluşum oranı ile elde edildiği bulunmuştur.

Kazeroonian et al. (2014) tarafından iki kasımpatı çeşidinin petal eksplantları, BBD'lerin farklı konsantrasyonları ve kombinasyonları ile desteklenmiş MS

ortamında kültüre alınmıştır. Reagon Elite Salmon'a göre Resomee Splendid çeşidinin sürgün indüksiyon yüzdesinde üstünlük göstererek, sırasıyla %62.22 ve %49.63 olarak elde edildiğini bildirmişlerdir. En yüksek sürgün indüksiyon yüzdesi, 3.0 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA ve 4.5 mg/l BAP + 1.0 mg/l NAA ile desteklenmiş MS ortamında elde edilmiştir. Bununla birlikte, her iki çeşitte en yüksek sürgün sayısı (sırasıyla 2.73 adet ve 3.0 adet) 4.5 mg/l BAP + 1.0 mg/l NAA'da elde edilmiştir. Resomee Splendid eksplantları üzerinde dolaylı olarak adventif sürgünler oluşurken, diğer çeşitte 3.0 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA veya 4.5 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA ile güçlendirilmiş ortamlarda doğrudan sürgün oluşumu gözlemlenmiştir. TDZ ve NAA kombinasyonu, her iki çeşitte dolaylı sürgün oluşumuna neden olmuştur. TDZ içeren işlemler, nicel özellikler açısından BAP içerenlere göre tamamen daha düşük performans göstermiştir. Rejenere olan sürgünler başarıyla köklendirilmiştir.

Chrysanthemum cv. Baeksun'un petal eksplantlarından en uygun mevsimde oluşan sürgün rejenerasyonunu belirleyen bir rapor sunulmuştur. Petal eksplantlarından sürgün rejenerasyonunun eylül-aralık ayları arasında daha yüksek olduğu tespit edildiği ve aralık ayında en yüksek değerlere ulaştığı belirtilmiştir. Uygun mevsimin seçilmesi, bitki büyüme parametrelerini (örneğin bitki yüksekliği ve taze ağırlık) de etkilediği ve bu sonuçlar doku kültürü çalışmalarında mevsimin önemli bir rol oynadığını güçlü bir şekilde ortaya koymuştur (Naing and Kim, 2014).

Kasımpatının *in vitro* rejenerasyonunda çiçek eksplantlarının kullanımı, diğer bitki parçaları rekalsitrant haldeyken daha geniş bir eksplant çeşitliliği sağlamaktadır. Ancak *in vitro* çiçeklenme tetiklenmedikçe yalnızca çiçeklenme dönemiyle sınırlı kalması yöntemin dezavantajıdır. Teixeira da Silva, 2014 yılında yaptığı çalışmada, Japon çeşidi 'Shuhou-no-chikara' ın dils ve tüpsü çiçeklerinden organogenesizi (kallus, sürgünler ve kökler) araştırmıştır. Aydınlik ve karanlık koşullar altında, farklı BBD ile desteklenmiş MS bazal besin ortamında çiçek tabanlı rejenerasyon protokolünün optimize edilmesi amaçlanmıştır. Çalışmada üç önemli sonuç belirtilmiştir; 1) Aydınlik ve karanlık koşullarda, renk ya da tüpsü ve dils çiçekler dışında, eksplantların rejenerasyona verdikleri tepkiler arasında bir fark tespit edilmemiştir 2) Eksplantlar yalnızca 12 BBD ile tek başına test

edildiğinde organogenesisize cevap vermiştir, diğer 18 BBD’de ise hiçbir gelişme olmamış veya <% 5 eksplant yanıt vermiştir. 3) Kasımpatı çiçek eksplantlarında adenin sülfat (Ads), 2iP, pikloram, hindistan cevizi suyu (CW) ve floreglukinol (PG) için ilk kez organogenesisiz sağlandığı bildirilmiştir. Ads, BA ve kinetin ile desteklenmiş ortamlarda sürgün oluşumu gözlemlenirken; 2iP, pikloram, 2,4-D ve TDZ’nin kallus oluşumunu desteklediği, CW’nin sürgünleri ve kallusları oluşturduğu, PG, IAA, IBA ve NAA ise kökler üzerinde her biri ayrı konsantrasyonlarda etkili olduğu tespit edilmiştir.

Kasımpatı ıslahında *in vitro* eksplant kaynağı olarak çiçek organlarının kullanımı, organogenez (adventif sürgünlerin/köklerin yeniden oluşumu) veya somatik embriyogenesis için özel ve önemli bir kaynak sağlaması nedeniyle büyük önem taşımaktadır. Teixeira da Silva et al. (2015), kasımpatıda (*Chrysanthemum grandiflorum* Ramat. Kitam.) çiçek eksplantının *in vitro* çoğaltılması üzerine yapılan çalışmalar hakkında bir derleme çalışması yürütmüşlerdir. Çalışmada çiçek eksplantının *in vitro* kültürü sırasında stabil mutantlar elde etmek için kimerik oluşumların ayrılması gerektiği belirtilmiş; ayrıca çiçeklerin dilsisi veya tüpsü kısımlarından elde edilen rejenerasyonların somaklonal varyasyona neden olduğu bildirilmiştir. Özellikle gama ışınları gibi fiziksel mutagenlerin uygulanmasından sonra böyle bitki materyallerinin rejenerasyonu, yeni çiçek renklerine, şekillerine veya diğer olumlu özelliklere sahip bitkilerin üretilmesine yol açabileceğini bildirmişlerdir. Kasımpatıda *in vitro* çiçeklenme nadir bir olgu olmasına rağmen uygulanabildiği takdirde, eksplantların ve dolayısıyla olası kontaminasyonların *ex vivo* ortamından taşınmasına gerek olmadan *in vitro* dezenfekte edilmiş materyal olarak kullanılmasının mümkün olabileceği belirtilmiştir. Çiçek dokusundan rejenerasyon protokollerinin geliştirilmesi çalışmaları ile ıslah sürecinin ve *in vitro* çiçeklenme başarısının ilerletilebileceği bildirilmiştir.

Kasımpatıda kallus ve organogenesisiz oluşumunu yaprak parçaları, gövde eksplantları (Wankhede et al., 2000), yaprak (Himstedt et al., 2000; Liu et al., 2015), pedikül (Petty et al., 2003), protoplast (Sauvadet et al., 1990), sürgün tomurcukları, üst tomurcuklar ve aksiller tomurcuklar (Fu-Yun, 2010), saplar (Jevremovic and Radojevic, 2004) ve aksiller tomurcuklarıyla beraber saplar (Wang et al., 2013) gibi farklı eksplant tipleri etkilemektedir (Waseem et al., 2009).

Yapılan bir çalışmada kasımpatı bitkisinde petal eksplantlarının yaprak eksplantlarına göre daha iyi bir varyasyon kaynağı oluşturduğu bildirilmiştir. 'Early Charm' kasımpatı çeşidinde yaprak ve petal eksplantlarından direkt bitki rejenerasyonu veya ara kallus aşamasından somaklonal varyantlar elde etmek amacıyla yapılan çalışmada sarı petal rengine sahip bir genotipin varyantı kendi rengini korurken, beyaz petal rengine sahip bir genotipin varyantının renginin eflatun olduğu tespit edilmiştir. Beyaz çiçek rengine sahip genotipteki 6 varyanttan ikisi ticari değeri açısından önemli bulunmuştur. Kimerizm, gen mutasyonu ve kromozom değişikliği somaklonal varyasyonların olası nedenleri arasında sayılabileceği bildirilmiştir (Khalid et al., 1989).

Kaul et al. (1990) tarafından on bir kasımpatı çeşidinin yaprak ve gövde eksplantlarından adventif sürgün rejenerasyonunun çalışıldığı denemede her iki eksplant türü için belirlenen optimum besin ortamı, 5 μ M BAP ve 5 μ M NAA ile takviye edilmiş MS ortamı olduğu ve çalışmada gövde eksplantlarının yaprak eksplantlarından daha yüksek rejenerasyon kapasitesine sahip olduğu belirtilmiştir. Sürgün rejenerasyon sıklığında çeşitler arasında büyük farklılıklar olduğu, 3 çeşidin farklı BBD kombinasyonlarına hiçbir şekilde cevap vermediği tespit edilmiştir. Gövde eksplantlarındaki sürgünlerin, esas olarak, epidermisi hızla bölen ve parçalayan kortikal hücrelerden kaynaklandığı ifade edilmiştir. Köklendirilen bitkilerin başarıyla dış koşullara alıştırıldığı ve anaç bitkiyle aynı morfolojik özelliklere sahip olduğu tespit edilmiştir.

Datta et al. (2002), kasımpatı bitkinin farklı eksplantlarından direkt rejenerasyon protokolleri geliştirmişlerdir. Kasımpatının yaprak eksplantlarında BA ve IAA varlığında sürgün oluşumu tespit edilirken, kapitulum ve çiçek tablasında sürgün oluşumu ise yalnızca BA ve NAA varlığında tespit edilmiştir. Yaprak eksplantlarında en yüksek rejenerasyon oranı %59.0, eksplant başına ortalama 4.6 sürgün sayısı ile 1.0 mg/l BA ve 1.0 mg/l IAA ile desteklenmiş MS besin ortamında tespit edilmiştir. Kapitulum eksplantında direk sürgün oluşumu en yüksek %91.7 ve 8.5 sürgün sayısı ile 5.0 mg/l BA ve 0.5 mg/l NAA desteklenmiş MS besin ortamından sağlandığı bildirilmiştir. Çiçek tablası eksplantlarında en yüksek rejenerasyon oranı %77.8, eksplant başına en yüksek sürgün sayısı 6.7 adet

ile 2.0 mg/l BA ve 0.5 mg/l NAA ile desteklenmiş MS besin ortamında saptanmıştır.

Zalewska et al. (2007) adventif sürgün tekniğinin *in vitro* çoğaltılan kasımpatı bitkisinde yeni varyasyon kaynağı oluşturduğunu bildirmiştir. Eksplant kaynağı olarak sürgün uçları ve yapraklarının kullanıldığı 'Richmond' kasımpatı çeşidi ve 10 mutantında yürütülen çalışmada eksplant tipinin kasımpatı bitkisinde genotip ve fenotipe olan etkisi incelenmiştir. Sürgün uçlarından ve yapraklarda oluşan adventif sürgünlerden gelişen bitkiler *in vitro* koşullarda köklendirilmiş, aklimatizasyonları sağlandıktan sonra tam çiçeklenmeye kadar serada yetiştirilmiştir. Çiçeklenen bitkilerin çiçek rengi ve çiçek şekli incelendiğinde sürgün ucu eksplantlarından elde edilen tüm bitkilerin aynı çiçek rengi ve şeklini gösterdiği bildirilmiştir. Çalışmada adventif sürgünlerden elde edilen bitkilerin çiçekleri incelendiğinde 'Richmond', 'Lady Amber', 'Lady White' ve 'Lady Yellow' olmak üzere 4 kasımpatı çeşidinde çiçek renginin değişmediği, "Lady Apricot" (başlangıçta: altın pancar) ve "Lady Somon" (somon rengi) çeşitlerinden adventif sürgün tekniğiyle çoğaltılan tüm bitkilerin çiçek renginin değiştiği (sırasıyla: mor altın; pembe ve beyaz) belirtilmiştir. 'Lady Bronze' (başlangıçta: kırmızımsı kahverengi), 'Lady Orange' (turuncu kahverengi) ve 'Lady Rosy' (mor altın) çeşitlerinin adventif sürgünlerinden çoğaltılan bitkilerin hem çiçek tipinde hem de çiçek renklerinde değişiklikler olduğu saptanmıştır (sırasıyla: sarı; sarı ve kırmızı; kırmızımsı pembe). "Lady Vitroflora" çeşidinde sürgün uçları ve yapraklarından rejenere olan bitkilerin çiçeklenme döneminde dils çiçeklerinin sayısının değiştiği tespit edilmiş ve bu değişikliklerin tümünün ya bitkilerin kimeral yapılarından ya da somaklonal varyasyonunun bir etkisinden kaynaklanabileceğini ifade edilmiştir. Ayrıca varyasyonun, yalnızca meristematik olmayan eksplantlar kullanıldığında ortaya çıkabileceğini ve adventif sürgün tekniğinin yeni bir varyasyon kaynağı olarak kasımpatı ıslahında faydalı olabileceğini belirtmişlerdir.

Song et al. (2011) yaptıkları çalışmada, 6 kasımpatı çeşidinin yaprak, petal, petiyol ve gövde eksplantları 0.00–6.66 μ M BA'nın yalnız olarak ya da 2.85–8.56 μ M IAA ve 0.46 μ M kinetin kombinasyonları ile desteklenmiş MS ortamında kültüre alınmıştır. Farklı eksplantların denendiği araştırmada petal eksplantlarının en yüksek sürgün oluşum oranını ve eksplant başına en yüksek sürgün sayısını

verdiği bildirilmiştir. Farklı kasımpatı çeşitleri, farklı BBD'lerin bulunduğu ortamda kültüre alındığında rejenerasyon yüzdelerinde önemli farklılıklar gözlemlendiği belirtilmiştir. En yüksek rejenerasyon oranlarının sırasıyla Brighton, Dark Roanoke ve Tahoe çeşitlerinde olduğu bildirilmiştir. En düşük sürgün oluşumlarının ise Dark Orange Cupertino, Hudson Bay ve Ivory Eugene çeşitlerinde olduğu belirtilmiştir. Çalışmada Brighton çeşidinin rejenere olan sürgünlerinden sürgün başına 7.6 adet kök sayısı ile %100 oranında köklenme olduğu saptanmıştır.

Mevsim zamanı 'Satinbleu' kasımpatı çeşidinin yaprak eksplantlarında adventif sürgün rejenerasyonunu etkilemektedir ve sonbaharda daha yoğun bir rejenerasyon gözlemlenmektedir. Tüm mevsimlerde ise boğum arası eksplantlarında yaprak eksplantlarına göre çok daha fazla rejenerasyon oluşmaktadır. Yapılan bir çalışmada 'Satinbleu' çeşidinin yaprak ve boğum arası eksplantları adventif sürgün oluşumu için 11.4 μ M IAA ve 2.7 μ M BAP ile güçlendirilmiş MS besi yerinde dik ve yatay bir şekilde kültüre alınmıştır. Ayrıca eksplantlar 15 Ocak, 15 Nisan, 15 Temmuz ve 15 Ekim tarihlerinde olmak üzere 4 farklı dönemde kültüre alınarak kültüre alma zamanları da test edilmiştir. Eksplant tipinden ve kültüre alma şekline bağımsız olarak yaz ve sonbaharda, kış ve ilkbahara göre daha yoğun bir rejenerasyon gözlenmiştir (Zalewska et al., 2011).

Lim et al. (2012), 11 farklı kasımpatı çeşidinin yaprak, çiçek sapı ve gövde eksplantlarını, 1 μ M NAA ve 10 μ M BA ile desteklenmiş MS ortamında farklı jelleştirici maddeler kullanarak (0.8% Agar, 0.4% Agaroze veya 0.25% Gelrite), sürgün oluşumu kapasitelerinin incelenmesi için kültüre almışlardır. Farklı jelleştirici ajanlar kullanıldığında, farklı çeşitlerin farklı eksplantlarında oluşan rejenerasyonlar ve kallus oluşumlarında önemli farklılıklar gözlemlenmiş, sürgün oluşumunu en fazla teşvik eden jelleştiricinin gelrite olduğu tespit edilmiştir. Diğer eksplantlara kıyasla gövde eksplantlarının çeşit ve jelleştirici ajan fark etmeksizin sürgün organogenezinin ve ortalama sürgün sayısı açısından en yüksek değerlerin elde edildiği eksplant olduğu, bununla birlikte, en yüksek rejenerasyon (11.67 sürgün/eksplant) Borami çeşidinin yaprak eksplantlarından sağlanırken, Yes Nuri çeşidinin gövde eksplantlarının bunu takip ettiği bildirilmiştir (4.33

sürgün/eksplant). Sürgünlerin kallus oluşmadan doğrudan eksplant yüzeyinden oluştuğu belirtilmiştir.

Telem et al. (2016) tarafından yerel kasımpatı çeşitlerinin yaprak, sürgün ucu ve dilsî çiçekleri gibi farklı eksplantlarının doğrudan *in vitro* rejenerasyon kapasitelerinin araştırıldığı çalışmada, eksplantlar IAA ve BAP kombinasyonlarınca desteklenmiş MS ortamında kültüre alınmıştır. Köklenme için IBA kullanılmıştır. Yaprak eksplantları için en fazla çoklu sürgün üretimi, 1.0 mg/l BAP ve 0.1 mg/l NAA kombinasyonunda, sürgün ucu eksplantları için 2.0 mg/l BAP ve 0.2 mg/l NAA kombinasyonunda, dilsî çiçeği eksplantlarında ise 4.0 mg/l BAP + 0.1 mg /l NAA kombinasyonunda gerçekleşmiştir. Köklenme için, yaprak ve sürgün ucu eksplantlarında 1.0 mg/l IBA, dilsî çiçek eksplantlarında ise 0.5 mg/l IBA ile desteklenmiş MS ortamı iyi sonuç vermiştir. Sürgün ucu eksplantlarının, kasımpatıda doğrudan somatik embriyogenesiz yoluyla bitki rejenerasyonu için en uygun eksplant tipi olduğu belirtilen çalışmada, dilsî çiçek eksplantlarında doğrudan bitki rejenerasyonunun, çiçek rengi mutasyonlarını belirlemek için faydalı olabileceği belirtilmiştir.

Kazeroonian et al. (2018), BBD'lerin farklı kombinasyonlarının ve konsantrasyonlarının etkilerini ve farklı eksplant tiplerinin kullanımını incelemişlerdir. *In vitro* bitki rejenerasyonu için verimli bir protokol geliştirilmesi amaçlanan çalışmada, *Chrysanthemum morifolium* cv. 'Resomee Splendid' *in vitro* koşullardaki bitkilerinden alınan yaprak ve yaprak sapı eksplantları BAP, NAA ve TDZ konsantrasyonları ve kombinasyonlarıyla güçlendirilmiş MS ortamında kültüre alınmıştır. Her iki eksplant içinse sürgün oluşum yüzdesi, ortalama sürgün sayısı, kallus oluşumu ve organogenez türü gibi özellikler incelenmiştir. Sadece BAP içeren ortamlarda, yaprak eksplantlarından kallus oluşmadan doğrudan sürgünlerin oluştuğu ve 4.5 mg/l BAP ile 1.0 mg/l NAA kombinasyonu, yaprak eksplantlarından doğrudan organogenez için diğer kombinasyonlardan ve konsantrasyonlardan daha üstün olduğu tespit edilmiştir. Sap eksplantları için, TDZ ile desteklenmeyen tüm ortamlarda doğrudan sürgün oluşmuştur. Bu durumda, sürgün oluşma yüzdesi ve ortalama sürgün sayısı açısından, en iyi sonuçların 1.5 mg/l BAP ve 1.0 mg/l NAA ile desteklenen ortamdan elde edildiği bildirilmiş olup,

BAP veya TDZ' nin NAA ile etkileşiminin kallus indüksiyonu için gerekli olduğu da belirtilmiştir.

Direkt rejenerasyon, kültüre alınan eksplanttan somatik embriyogenesiz ya da adventif sürgünler yoluyla direkt yeni bir bitkinin eldesidir. Doğrudan organogenezinin sağlanması için sitokinin konsantrasyonunun oksinden daha yüksek olması gerekmektedir. Çoğu çalışmada, yüksek sitokin ve düşük oksin konsantrasyonları içeren MS ortamında doğrudan sürgün oluşumu gözlemlenmiştir. Aksine, oksin konsantrasyonları arttıkça eksplantta sürgün oluşumu zayıflar ve kallus oluşumu artar (Waseem et al., 2008; Gao et al., 2001). Direkt rejenerasyon stratejisi kasımpatında, dilsu ya da tüpsü çiçeklerden direkt bitki eldesi sağlayarak genetik kararlılığı koruduğu için de tercih edilmektedir. Pek çok ticari çeşitte direk organosesis protokolleri standardize hale getirilerek kullanılmaktadır (Datta, 2019). İndirekt rejenerasyonda, kültüre alınan eksplantta öncelikle genetik olarak stabil olmayan kallus dokusu meydana gelir. Kalluslarda kromozom kırılmaları gerçekleşebildiği gibi kasımpatı türlerinin genetiğini geliştirmeye yardımcı olabilir (Miler and Zalewska, 2014; Kengkarj et al., 2008; Eisa et al., 2022).

Kasımpatının farklı eksplantlarında ve farklı BBD'leri ve konsantrasyonları ile pek çok somatik embriyogenesiz çalışması yürütülmüştür.

Farklı ışık ve sakkaroz konsantrasyonları kasımpatı bitkisinin yaprak eksplantlarında meydana gelen somatik embriyoları etkileyebilmektedir. Yapılan bir çalışmada "Iridon" kasımpatı çeşidinin yaprak eksplantlarının 1.0 mg/l 2,4-D ve 0.2 mg/l BA içeren MS besin ortamında kültüre alınmasıyla meydana gelen somatik embriyolar %9'dan %18'e kadar sakkaroz bulunan ortamda 28 gün karanlık sonrasında 10 gün aydınlık ve tekrar 14 gün karanlıkta tutulduklarında direkt eksplanttan gelişim göstermişlerdir. Buna karşılık devamlı karanlıkta tutulan embriyolarda ise gelişim olmamış ve sadece ışık altında inkübe edilen eksplantlarda da ani bir düşüş yaşanmıştır. Çalışmada rejenere olan bitkilerin çiçek rengi ve yaprak morfolojisi gibi özellikleri fenotipik olarak ebeveynleriyle benzer bulunmuştur (May and Trigiano, 1991).

Kasımpatı (*Dendranthema x grandiflorum* (Ramat.) Kitamura) bitkisinin yapraklarından basit ve etkili bir somatik embriyogenesiz metodu geliştirilmiştir. Çalışmada en iyi sonucu 2.0 mg/l 2,4-D ve 1.0 mg/l kinetin içeren MS ortamı vermiştir ve en yüksek bitkiye dönüşüm oranı 1 mm'den 2 mm'ye kadarki kök uzunluğuna sahip embriyolarda olmuştur. Rejenere olan bitkilerin çiçek ve yaprak morfolojisi ile büyüme şekilleri değişmezken, çiçeklenme gün sayısı kontrol bitkilerine göre farklılık göstermiştir. Çalışmada uygulanan somatik embriyogenesiz metodu 13 çeşitten 8'inde uygulanabilir bulunmuştur (Shinoyama et al., 2004).

Kasımpatı (*Chrysanthemum morifolium* Ramat. cv. Purnima) bitkisinin dilsî çiçeklerinden direkt somatik embriyogenesiz ve bitki rejenerasyonu elde edilmiştir. Beş kasımpatı çeşidinde yapılan çalışmada 2,4-D ve BA ile desteklenmiş MS ortamında kültüre alınan dilsî çiçeklerde somatik embriyogenesiz tespit edilirken, elektron mikroskobu taramaları sonucunda eksplantlardan direkt somatik embriyoların oluştuğu doğrulanmıştır. Somatik embriyolar eksplantların üst yüzeyinde eş zamansız olarak gelişmiştir. Çeşitler arasından “Birbal” ve “Sahani” 4.0 mg/l 2,4-D ve 2.0 mg/l BA ile desteklenmiş ortamda %40 gelişim göstererek en iyi sonucu vermiş ve ayrıca aynı ortamda somatik embriyoların çimlenmesi gerçekleşmiştir. Somatik embriyolardan gelişen bitkilerin toprağa transferi sağlanmış ve benzer tipte çiçeklenme tespit edilmiştir (Mandal and Datta, 2005).

Jaramillo et al. (2008), kasımpatıda gen aktarımı yoluyla fungal hastalıklara dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesi için yapılan çalışmada bitki gen aktarımı protokolü geliştirmek amacıyla yaprak diskleri, NAA (0-4.83 μ M) ve BAP'ın (0-13.32 μ M) tek başına ve kombinasyon halinde takviye edilmiş MS ortamında kültüre alınmıştır. Ayrıca yaprak diskleri, 2,4-D (0-4.52 μ M) içeren MumB ortamında 7, 14 ve 21 gün boyunca bekletildikten sonra, 2,4-D'siz bir MumB ortamına aktarılmıştır. Sonuçlarda, 4.83 μ M NAA + 4.44 μ M BAP ve 4.83 μ M NAA + 13.32 μ M BAP içeren MS'in organogenezisi tetiklediği ve 2.26 μ M 2,4-D içeren MumB'nin ise somatik embriyogenesizi tetiklediği bildirilmiştir.

Mani and Senthil (2010), yaptıkları çalışmada süspansiyon kültürüyle kasımpatı bitkisinde basit, ekonomik, hızla çoğalan ve yüksek oranda

tekrarlanabilir bir somatik embriyogenesiz protokolü geliştirdiklerini bildirmişlerdir. Denemeler sonucunda yaprak eksplantında en iyi kallus oluşumunu %100 ile 1.5 mg/l 2,4-D içeren MS ortamından ve %81 ile de 2.0 mg/l 2,4-D ile desteklenmiş MS ortamından elde etmişlerdir. Petal eksplantında en iyi kallus oluşumunu %100 ile 2.0 mg/l 2,4-D içeren MS ortamı ve %80.0 ile de 1.5 mg/l 2,4-D ile desteklenmiş MS ortamının verdiği bildirilmiştir. Daha sonra kalluslar sürgün oluşumu için 1.0 mg/l BAP ile desteklenmiş MS ortamında kültüre alınmış ve yeşil kalluslarda somatik embriyolar meydana geldiği bildirilmiştir. Kalluslardaki somatik embriyolar BAP'ın farklı konsantrasyonlarıyla desteklenmiş MS ortamlarının hepsinde gözlenmiştir. En yüksek bitki sayısı 2.0 mg/l BAP ile desteklenmiş MS ortamından elde edilmiştir. Rejenere olan bitkiler 0.1 mg/l BAP + 2.0 mg/l kinetin ile desteklenmiş MS ortamında uzamışlar ve BBD'siz MS basal ortamda köklendiği belirtilmiştir.

Kasımpatı bitkisinde yapılan başka bir çalışmada doğrudan somatik embriyogenesiz yapraktan, boğum arasından ve ilk kez yaprak sapı eksplantlarından tespit edilmiştir. *Dendranthema × grandiflora* (Ramat.) Kitamura cv. Palisade White'in sürgün uçları, BA ve GA₃ veya BA, kinetin ve IAA ile takviye edilmiş, modifiye edilmiş MS ortamı üzerinde kültüre alınmıştır. IBA ve IAA oksinleri köklenmeyi başlatmak için kullanılmıştır. 1.0 mg/l NAA veya 2,4-D, 0.1 mg/l BA, 200 mg/l kazein hidrosilat (CH) ve 290 mg/l prolin ile desteklenmiş modifiye MS ortamı, indüksiyon için kullanılır. GA₃ (0.5 mg/l) ile kombinasyon halinde BA (0.1 mg/l) kullanıldığında, eksplant başına 3.2 yeni mikro sürgünün çoğalma hızı elde edilmiştir. Sürgün başına kök sayısının, IBA (0.5 mg/l) kullanıldığında daha yüksek olduğu, ancak IAA (2.0 mg/l) kullanıldığında ise daha uzun köklerin oluştuğu bildirilmiştir. BBD'lerin her iki kombinasyonu ile yüksek oranda embriyogenesiz sağlanırken, en yüksek embriyogenesiz yüzdesi yaprak eksplantlarında gerçekleşmiş, petiol (%56.3) ve boğum arası (%35.1) onu takip etmiştir. Eksplant başına somatik embriyo sayısı da yaprak eksplantlarında en fazlayken; bununla birlikte, somatik embriyoların bitkiciklere en iyi dönüşüm oranı (%53.8) petiol eksplantlarında gözlenmiştir (Kereša et al., 2012).

Xu et al. (2012), kasımpatı yapraklarından ve saplarından somatik embriyogenesiz yoluyla bitki rejenerasyonu için verimli bir sistem elde edilmiştir.

BBD'lerin çeşitli kombinasyonları kullanılarak kasımpatının (cv. Yuukou) yaprak ve gövde eksplantlarından somatik embriyogenesiz uyarılmıştır. Sırasıyla somatik embriyogenesizin yaklaşık %93.0 ve %63.0'u, BA ve NAA ile takviye edilmiş MS ortamında kültürlenmiş yaprak ve gövdede tespit edilmiştir. Somatik embriyogenesizin, yapraktan daha kolay bir şekilde indüklendiği tespit edilmiştir ve 0.6 mg/l BA ve 1.8 mg/l NAA içeren MS ortamı takviyesinde %100.0 rejenerasyon oranı sağlanmıştır.

Yapılan bir çalışmada *Chrysanthemum* cv. Euro'nun yaprak eksplantları, 2.0 mg/l 2,4-D ve 2.0 mg/l kinetin ile desteklenmiş MS ortamında kültüre alınmıştır ve 5 haftalık kültürden sonra eksplant başına en yüksek ortalama embriyo sayısını ($42 \pm 5,97$) vermiştir. Araştırmacılar tarafından somatik embriyoların çoğalmasında teşvik etmede $\frac{1}{2}$ MS kuvvetindeki ortamın daha etkili olduğu gözlemlenmiştir. İkincil somatik embriyoların çoğalmasında yönelik olarak bazal ortam, çeşitli sukroz konsantrasyonları ve timentinin etkileri değerlendirilmiştir. Ek olarak timentinin sekonder embriyogenesizin indüklenmesinde sukrozdan daha etkili olduğu tespit edilmiştir. Sekonder embriyoların hormonsuz MS ortamında kültürlenmesiyle normal gelişime sahip bitkicikler elde edilmiş ve aklimatizasyonları sağlanmıştır (Naing et al., 2013).

Tamamı mutasyona uğramış bir dils çiçekten veya sadece küçük bir mutant parçadan *in vitro* rejenerasyon ile bitki eldesi yeni bir orijinal çeşidin üretilmesine yol açabilmektedir. Tymoszuk and Zalewska (2014a) *Chrysanthemum* $\times$ *grandiflorum* (Ramat.) Kitam 'Cool Time'da somatik embriyogenesiz üzerine büyüme düzenleyicilerinin (2,4-D; kinetin veya BAP) ve eksplant tipinin (bütün veya enine kesilmiş dils çiçeklerin) etkisini araştırmışlardır. Somatik embriyogenesizin uyarılması ve somatik embriyoların rejenerasyonu için 18.08 μ M 2,4-D ile 4.44, 8.88; 22,20 μ M BAP veya 4.65; 9.30; 23.25 μ M kinetin içeren MS ortamı kullanılmıştır. En iyi sonuçlar, enine kesilmiş dils çiçeklerden 4.65 μ M kinetin ve 18.08 μ M 2,4-D içeren besin ortamından elde edilmiştir. Bu sonuçlardan kasımpatı ıslahında kimeralı dokunun ayrıştırılmasının da kullanılabileceği bildirilmiştir.

Kasımpatılarda somatik embriyogenesiz *in vitro* bitki üretimi, mutasyon ıslahı ve gen aktarım çalışmalarında adventif sürgün yöntemine alternatif bir yöntem olarak kullanılabilir. Yapılan bir çalışmada, 10 farklı kasımpatı 'Lady' grubu mutantın *in vitro* sürgün kültürlerinden elde edilen yaprak eksplantları, MS besin ortamında kültüre alınmıştır. Farklı konsantrasyonlarda (1.0, 2.0 veya 5.0 mg/l) kinetin veya BAP ile birlikte veya tek başına kullanılan 4.0 mg/l 2,4-D içeren ortamlarda dolaylı SE indüklenmiştir. Tüm ortamlarda SE miktarı çeşitlilik göstermekle birlikte, her 10 çeşitte en yüksek somatik embriyo sayısı 2,4-D ilave edilen ortamdan sağlanmıştır. 'Lady Salmon' çeşidinde her bir eksplantta 71 embriyo üretildiği saptanmıştır. Sitokininler çoğu radyomutantta SE'yi azaltmış veya inhibe etmiştir. Rejenerasyon oranı, sitokinin konsantrasyonunun artmasıyla azalmıştır. Kinetin, 'Lady Vitroflora' dışındaki tüm çeşitlerde SE'yi indüklemek için BAP'den daha etkili olmuştur. Ancak, sitokininlerin, somatik embriyoların çimlenmesi ve bitkilerin oluşumunda gerekli olduğu belirtilmiştir. Embriyolardan üretilen bitkiler, %100 başarıyla bir sera ortamında aklimatize edilmiştir. Somatik embriyonun farklılaşması, ışık ve konfokal mikroskoplarla doğrulanmıştır (Lema-Rumińska and Niedojadło, 2014).

Önceki çalışmalarda, eksplantların MS ortamında büyüme düzenleyicisi olmadan çoğunlukla kallus oluşturmadığı bildirilirken; kallus indüksiyonunun, sadece sitokinin ile kombinasyon halindeyken, MS ortamı içerisinde bulunan oksin bileşikler (2,4-D, NAA, IBA ve IAA) kullanıldığında gözlemlenmiştir. Bu nedenle, ortama oksin bileşikler eklemek kallus indüksiyonu için önemlidir (Teixeira da Silva, 2014; Teixeira da Silva et al., 2013; Song et al., 2011; Kengkarj et al., 2008; Nahid et al., 2007; Naing et al., 2013; Mandal and Datta, 2005; Barakat, 2008). *In vitro* kültürde uygun miktarda oksin konsantrasyonu kullanmak, organogenesizi yavaşlatırken, kallusların büyümesini hızlandırabilir. Kallus oluşum hızı, 2,4-D konsantrasyonlarının artmasıyla bir seviyeye kadar artmakta (2.0-4.0 mg/l), daha yüksek konsantrasyonlarda ise azalmakta ve kahverengileşmektedir. Yaprak ve boğum eksplantlarından embriyojenik kallus oluşumu için 0.1-2.0 mg/l değişen aralıklarda 2,4-D konsantrasyonlarına gerek duyulduğu belirtilmiştir (Smith, 2012; Thomas and Maseena, 2006; Nasri et al., 2018).

Hemlata and Mahdi (2016), *Chrysanthemum morifolium*' a ait beyaz petal eksplantlarını kallus geliştirici ortamlarda indirek rejenerasyon için kültüre almışlardır. Kallus oluşumu tüm ortamlarda (MS1, MS2, MS3, MS4, MS5) görülmekle birlikte en yüksek 0.5 mg/l NAA ve 10.0 mg/l kinetin bulunan MS2 ortamında elde edilmiştir. Farklı rejenerasyon ortamları arasında (R1, R2, R3) kallustaki en iyi sürgün sayısı (4.79 adet) 10.0 mg/l kinetin ve 0.5 mg/l NAA bulunduran R2 ortamında elde edilmiştir.

Din et al. (2022) tarafından 'Candid' ve 'Flirt' kasımpatı çeşitleri için *in vitro* kallus oluşumu ve rejenerasyon protokolünü standardize etmek için bir çalışma yürütülmüştür. Petal ve yaprak segmentleri eksplant kaynağı olarak kullanılmıştır. Her iki çeşitte de, petallerin kallus oluşumu ve rejenerasyonu için en etkili eksplant kaynağı olduğu tespit edilmiştir. Her iki çeşitte de, minimal kallus başlangıç zamanı, maksimum kallus oluşumu ve eksplant başına kallus ağırlığı açısından en iyi sonuçlar, 1.0 mg/l BAP + 1.5 mg/l NAA içeren MS ortamında elde edilmiştir. Her iki çeşitten petal eksplantları kullanıldığında, en kısa sürede (13.25 gün ve 16.00 gün), en yüksek kallus oluşumu (sırasıyla %91.66 ve %83.33) ve en yüksek ortalama kallus ağırlığı (sırasıyla 2.43 g ve 2.31 g eksplant başına) 1.0 mg/l BAP + 1.5 mg/l NAA bulunan ortamlarda elde edilmiştir. Her iki çeşitte de, petal eksplantları ile birlikte 1.00 mg/l kinetin + 0.50 mg/l IAA ile güçlendirilmiş MS ortamları, kallus üreten sürgünler ve eksplant başına sürgün sayısı açısından en iyi rejenerasyonu sağlamıştır. Her iki çeşitte de maksimum kallus oluşumu %89.58 ve %87.49 ve maksimum sürgün sayısı sırasıyla 3.25 ve 2.75 adet olarak, her iki çeşidin petal eksplantlarında 1.0 mg/l kinetin + 0.5 mg/l IAA bulunan ortamlarda gözlenmiştir. Bununla birlikte, her iki çeşitte de yaprak eksplantları için minimum kallus başlangıç süresi ve en yüksek kallus oluşumu 1.0 mg/l BAP + 1.5 mg/l NAA içeren MS ortamı kullanılarak elde edilmiş ancak eksplant başına en yüksek kallus ağırlığı 0.5 mg/l BAP ve 2.5 mg/l NAA içeren MS ortamı kullanılarak sağlanmıştır. Her iki çeşitten eksplantlarda, minimum kallus başlangıç süresi 15.25 gün ve 16.75 gün, kallus oluşum oranları sırasıyla %89.57 ve %81.24 ve maksimum ortalama kallus ağırlıkları 0.94 g ve 0.89 g olarak tespit edilmiştir.

Bir başka çalışmada, *Chrysanthemum* cv. 'Breeze Ivory' için ideal bir *in vitro* yetiştirme ortamı bildirilmiştir. BA (1.0 mg/l) + NAA (0.1 mg/l) + sukroz (30 g/L)

+ agar (7.0 g/L) içerikli MS besin ortamında 12.1 çoğalma katsayısı elde edilmiştir (Wang et al., 2013). Naing et al. (2014) kasımpatı çeşitlerinde başarılı genetik transformasyon için, yüksek seviyelerde oksin kullanımının gerekli olduğunu; besin ortamında 1.0 mg/l BA ve 2.0 mg/l NAA varlığında, 'Vivid Scarlet'in yaprak segmentlerinden eksplant başına 12.3 adet sürgün elde edildiği bildirilmiştir.

Nalini et al. (2016) tarafından kasımpatının tekli boğum eksplantlarının kültüre alınmasıyla yapılan çalışmada 2.0 mg/l BA + 0.5 mg/l NAA ile güçlendirilmiş MS ortamı, sürgün oluşumu (%86.6) ve ortalama sürgün uzunluğu (3.7 cm) açısından en iyi sonuçları verdiği tespit edilmiştir. Doku kültürü ortamlarında kullanılan kinetin ve IBA, klorofil ve protein parçalanmasını önlemede ve fotosentetik enzimleri teşvik etmede rol alarak sürgün sayısını ve uzunluğunu artırarak, hücre bölünmesini ve farklılaşmasını teşvik ettiği bildirilmiştir. Alsoufi et al. (2021), 4.0 mg/l kinetin ve 0.6 mg/l IBA arasındaki etkileşimin, kasımpatı bitkilerinin boğum eksplantlarından gelişen sürgün sayısı ve ortalama sürgün uzunluğu değerleri üzerinde olumlu bir etkisi olduğunu göstermiştir.

Kültüre alınan eksplanttaki oksin dengesi yeterli veya sitokinin konsantrasyonu son derece düşük veya yoksa, sadece oksin, eksplantta kallus oluşumuna neden olabilir. Oksin, adventif kök gelişimini, hücre uzamasını ve hücre bölünmesini arttırabilir. Hücre döngüsü ve hücre bölünmesindeki etkileri nedeniyle hem sitokinin hem de oksin, kasımpatı türlerinde kallus ve somatik embriyo oluşumunda rol oynar. Ayrıca yaprak ve boğum eksplantlarından embriyojenik kallus gelişimi için 0.1 ila 2.0 mg/l arasında 2,4-D konsantrasyonları gereklidir (Pierik,1997; Francis and Sorrell, 2001; Thomas and Maseena, 2006; Eisa et al.'dan, 2022).

Chrysanthemum cv. 'Shuhou-no-Chikara'nın çiçeklerinde Ads, pikloram, 2iP, PG ve CW gibi BBD'ler ile ilk kez organogenesiz olduğu bildirilmiştir. Kallus dokuları, pikloram, 2iP, tidiazuron (TDZ) ve 2,4-D bulunan ortamlarda oluşurken, sürgünlerin ise Ads, BA ve kinetin ilave edilen ortamlarda olduğu bildirilmiştir. CW ve PG bulunan ortamlarda sürgünler ve kalluslar oluşurken; IAA ve IBA bulunan ortamlar da kökleri oluşturmuştur (Murgayanti et al.,2010).

In vitro köklendirme, klonlanmış *in vitro* koşullardaki bitkiciklerin köklenme sürecini ifade etmektedir. Besin ortamında oksin bulunduğunda, köklerin çoğu uyarılır. Genel olarak, oksinler hücre bölünmesini, uzamasını ve kök oluşumunu teşvik eder. Köklenmenin yüksek bir kısmı, IAA, IBA, 2iP ve NAA tarafından sağlanır. Oksinler doğal olarak apikal tomurcuklar tarafından üretildiğinden, apikal baskınlık varsa sitokin ile ortamda bulunması daha az etkili olabilir (Cline,1991; Eisa et al., 2022).

Yapılan bir çalışmada IBA'nın (0.5 mg/l) sürgün başına daha fazla kök ürettiği, IAA'nın (2.0 mg/l) ise daha uzun kökler ürettiği belirlenmiştir (Kereša et al., 2012). IBA'nın kök indüksiyonu ve uzaması üzerinde en olumlu etkilere sahip oksin olduğu, IAA ve NAA'yı geride bıraktığı yapılan bazı çalışmalarda bildirilmiştir (Chae, 2016; Jahan et al., 2021).

Kasımpatının köklenmesi için ½ MS ortamının optimal olduğu bildirilmiştir (Imtiaz et al., 2019). Ayrıca, iyi farklılaşmış mikro sürgünler içeren *Chrysanthemum morifolium* eksplantları (koltuk altı tomurcukları), 0.5 mg/l NAA ile takviye edilmiş MS ortamına yerleştirilmiş ve yüksek köklenme oranı (%88.66) tespit edilmiştir (Verma, 2012). Waseem et al.'a (2011a) göre, MS ortamına düşük konsantrasyonlarda IAA (0.1 ve 0.2 mg/l) ve orta konsantrasyonlarda (1.0 ve 2.0 mg/l) BAP eklenmesinin boğum eksplantı rejenerasyonunu olumlu yönde etkilemiştir.

2.3 Kasımpatıda Mutasyon İslahı Çalışmaları

Mutasyon, hücrenin DNA'sında ani olarak ortaya çıkan kalıtsal bir değişiktir. Mutasyon ıslahı hibridizasyon ve seleksiyon ıslahından farklı olarak, elit bir çeşitte değiştirilmek istenen bir özelliği tarımsal ve kalite özelliklerini kaybetmeden iyileştirme avantajına sahiptir. Bitki ıslahı, bitki türlerinin insan tarafından yönlendirilen evrimi olarak görülebilir ve genetik çeşitlilik temeline dayanır. Bir bitki türünün farklı çeşitlerinde istenen varyasyon mevcut olduğunda, melezleme yoluyla ıslah hedeflerine ulaşılabilir. Ancak, melezleme için kullanılan istenen özelliklere sahip ebeveyn çeşitlerden biri veya daha fazlası uyumsuz ise, elit tipteki çeşidin yeniden elde edilmesi için geri melezleme stratejisinin uygulanması

gereklidir. Geleneksel melezlemenin karşılaştığı başka bir sorun, bazı ebeveyn genotiplerinin kombinasyon yeteneğindeki zayıflıktır. Bu tür durumlarda, mutasyon ıslahı, belirlenmiş germplazm havuzlarında istenen özelliklere sahip çeşitlerin varyasyonunda avantaj sağlayabilir (Pathirana, 2011).

Mutasyonlar, herhangi bir organizmada var olan tüm genetik varyasyonların temel kaynağıdır (Kharkwal, 2012). Ortaya çıkan varyasyon, doğal seçilim için bir kaynak niteliğindedir. Spontan mutasyonların çok nadir ve rastlantısal olmaları, bitki ıslah programlarında kullanılmalarını zorlaştırmaktadır (Lönnig, 2005). Mutasyon ıslahı, kimyasal ve fiziksel mutagen yoluyla genetik varyasyon yaratarak ve bu varyasyonu kullanarak yeni çeşitlerin geliştirilmesini içerir (Shu et al., 2012). Maliyet açısından değerlendirildiğinde mutasyon ıslahı tekniği, biyoteknolojik yöntemlere kıyasla daha ucuza mal olan bir yöntemdir (Schum, 2003). Ayrıca kendine döllen bitkilerde, tek genle yönetilen ve basit kalıtım gösteren karakterlerin geliştirilmesinde önemli bir avantaj sunmaktadır (Sagel vd., 2002). Mutasyon eğilimi yüksek olan kasımpatı gibi süs bitkileri türlerinde ve vejetatif olarak çoğaltılan türlerde, mutasyon ıslahı yöntemleri sıkça kullanılmaktadır. (Van Harten, 1998; Kantoğlu ve Kunter'den, 2021; Pathirana, 2011).

Bitki ıslahında ilk adım, mevcut çeşitler arasında istenen genlere sahip uygun genotipleri belirlemek veya doğada bulunmuyorsa bunları oluşturmaktır. Doğada, varyasyon genellikle mutasyonlar sonucunda oluşur ve mutasyon olmadan bitki ıslahı mümkün olmaz. Bu bağlamda, mutasyon temelli ıslahın temel amacı, verimlilik veya kaliteyi artırmak için bir veya iki temel özelliği değiştirerek iyi uyum sağlayan bitki çeşitlerini geliştirmek ve iyileştirmektir (Kantoğlu et al., 2014). Fiziksel ve kimyasal mutagenез, mutasyonların tohumlar ve diğer bitki kısımlarının uyarılmasında kullanılır. Ardından, ilk nesilde tarımsal özellikler için seçim yapılır ve birçok mutant hat elenebilir. Tarımsal özellikler, ikinci ve üçüncü nesillerde açıkça fenotipik kararlılıkla doğrulanırken, diğer değerlendirmeler sonraki nesillerde yapılır. Son olarak, istenen özelliklere sahip mutant hatlar yeni bir çeşit veya melezleme için ebeveyn hat olarak seçilir. Uyarılmış mutasyonla elde edilen yeni çeşitler dünya çapında kullanılmaktadır. Uygun hedefler ve seçim yöntemleri kullanıldığı sürece mutasyon ıslahının esnek ve uygulanabilir bir yaklaşım olarak potansiyeli yüksektir (Oladosu et al., 2016).

Mutasyonlar meydana geliş şekline göre Doğal (Spontan) Mutasyonlar ve Yapay Mutasyonlar olarak ikiye ayrılır. Doğal mutasyonlara, organizmaya içsel (genetik yapı, fizyolojik durumlar, artan ya da düşen sıcaklık gibi çevre şartları) veya dışsal (beslenme, sıcaklık, doğal radyasyonun etkisi, kimyasal maddeler, yüksek oksijen basıncı) olarak etki eden faktörler neden olmaktadır. Doğal mutasyonların ne zaman ve nerede çıkacağı bilinmez, istatistiksel olarak tesadüfidir. İyi mutasyonlar çok nadir görülmekle birlikte, genelde zarar yönünde etki gösterir. Pek çok gene etki eder ve onlardan etkilenir. Hiçbir etkiye sahip olmayabilir. Fonksiyon kaybına ya da kazancına neden olabilir. Yapay mutasyonlar ise herhangi bir uygulama sonucunda, canlı yapılarda ortaya çıkan farklılıklar olarak karşımıza çıkmaktadır. Yapay mutasyonlar, fiziksel ve kimyasal mutagen uygulamaları ile sağlanmaktadır. Mutagen uygulaması sonrasında bu değer organizmalarda %1 oranında arttırılmaktadır (doğada mutasyon oluşma oranı 1:10000 iken, yapay mutasyonlarda bu oran 1:1000 olmaktadır). Fiziksel mutagen olarak X ışını, gama ışını, ultraviyole radyasyon, beta radyasyonu, hızlı ve termal nötronlardan yararlanılmaktadır. Kasımpatı bitkisinde fiziksel mutagen kaynakları ile ilgili pek çok çalışma yürütülmüştür (Broertjes et al., 1976; Jerzy and Zalewska, 1996; Matsumura et al., 2010; Oladosu et al., 2016; Kharkwall, 2017; Yamaguchi, 2018; Kantoğlu ve Kunter, 2021). Kimyasal mutagen uygulaması için temel analoglar ve ilgili bileşenleri (hydroxylamine-NH₂OH, acridine boyası-acridine turuncusu, ethidium bromide-EB, ethylene diamine tetra-acetic acid (EDTA), antibiyotikler (streptomycin, mitomycin), alkillenmiş maddeler (Etilmetan sülfonat-EMS, Dimetil sülfat-DMS, trietilen melanin-TEM ve azidler (sodium azide) kullanılmaktadır. Uygulama ortamının sıcaklığı, uygulama konsantrasyonu, süresi, tohum ya da bitki parçasına ön ıslatma yapıldıktan sonra uygulamanın yapılması, mutagenik solüsyonun pH'sı, uygulama sonrası yıkama ve kurutma işlemleri uygulama başarısını etkileyen faktörlerdir. Bu kimyasal mutagenler içinde, EMS'nin yüksek mutasyon başarısı sağladığı bildirilmiştir (Gaul et al., 1977; Pathirana, 2011; Kantoğlu ve Kunter, 2021). Kimyasal mutagenlerin kullanılmasıyla kromozomal hasarın daha az olacağı ve öncelikle nokta mutasyonlarının oluşacağı öne sürülmektedir. Ayrıca, farklı kimyasallarla yapılan işlemlerin farklı mutasyon spektrumlarına neden olabileceği belirtilmektedir. Bununla birlikte, bu tezi destekleyen sınırlı veri bulunmaktadır. Pratik bitki ıslahı açısından, kimyasal mutagenlerin özgülüğüne dair çoğu beklentinin

karşılanmadığı sonucuna varılabileceği belirtilmektedir (Van Harten, 1998). Ancak kolayca ulaşılabilen bir ışınlama kaynağı varsa fiziksel mutagen uygulamaları pratik olmakla birlikte, işlemin uygulanması kolaydır, mutagenik maddelerin hedef hücrelere ulaşmasıyla ilgili sorunlar yoktur, sonuçlar tekrarlanabilir ve toksik atık oluşmaz. Ayrıca ekonomik ve çevre dostu bir tekniktir (Schum, 2003). Fiziksel ve kimyasal mutagenlerin kombine uygulamalarının bulunduğu ıslah çalışmaları da yürütülmektedir. Tekli ya da kombine uygulamaların her ikisinin de avantajları ve dezavantajları bulunmaktadır. Poliploidi çalışmalarında kullanılmakta olan kolhisin maddesi de, mutasyon ıslahı çalışmalarında kullanılmaktadır. Colchi Bahar kasımpatı çeşidi, kolhisin uygulaması sonucunda tescil ettirilmiş bir çeşittir (Datta, 1987; Kantoğlu ve Kunter'den, 2021).

Melsen et al.'a (2021) göre süs bitkilerinde mutasyon ıslahının başarıyla uygulanması, çeşitli türler için etkili mutagenik uyarım protokollerine büyük bir ilgiye yol açmıştır. Yapılan pek çok çalışmada süs bitkilerinde kullanılan mutasyon teknikleri, avantajları ve dezavantajları irdelenmekte ve ilgili protokollerin iyileştirme olanakları ele alınmaktadır. Alkilleyici ajanlarla kimyasal olarak, X ışınları, gama ışınları ve nötron veya ağır iyon demetleriyle çeşitli dozlarda ışınlamaya kadar bir dizi hedefsiz mutagenik yöntem bulunmaktadır. Bu yöntemlerin hepsi nispeten ucuzdur ve birçok farklı türde etkili olduğu kanıtlanmıştır. Bununla birlikte, gen çalışmaları, süs bitkilerinin ıslahı ve rejenerasyonu için gereken yüksek maliyet ve bilgi eksikliği nedeniyle çoğunlukla uygulanabilir değildir. Mutagenler arasında, gama ışınlarıyla ışınlama hala en popüler olanıdır. Görünüşte daha düşük bir mutagenik etkinlikte olsa da, kimyasal mutagenlere kıyasla yüksek tutarlılık sağlar. Işınlama dozu oranındaki değişiklikler verimliliği artırabilir, ancak yaygın olarak kullanılan akut ışınlama protokollerinden daha az zararlı mutasyonlara neden olan kronik ışınlama daha uzun bir süre boyunca gerçekleşir. Ağır iyon demeti ışınlama, yüksek parçacık enerjisi ile ilişkili olduğu için daha yüksek verimlilikte son derece tutarlı mutasyon uyarımı sağlayabilir. Kimyasal mutagen uygulamaları da istenilen karakterlerin iyileştirilmesi için de fırsatlar sunmaktadır. Birçok süs bitkisinde spesifik gen fonksiyonları hakkındaki gereken bilgi hala eksik olsa da, genetik tarama ile EMS kombinasyonu, gelecekte güçlü bir mutasyon ıslah aracına yol açabilecek bir süreç olan TILLING (Targeting Induced Local Lesions IN Genomes) ile birlikte

mutantları geliştirmeye yönelik bir potansiyele sahiptir. Mutasyon ıslahı hala çok faydalıdır ve mevcut yöntemlerin iyileştirilmesi için birçok fırsat bulunmaktadır.

Mutasyon ıslahında ana çeşidin genotipi değişmeden sadece bir kaç özelliğinin değişmesi ve somatik mutasyonların klonal çoğaltma yolu ile kısa zaman izole edilebilmesi yöntemin sahip olduğu avantajlardır. Meriklinal veya sektöriyel yapıdaki kimeraların izolasyonundaki zorluklar, periklinal yapıdaki yeni formunun stabilitesini, mutasyonun sadece birkaç meristematik tabaka üzerinde meydana geldiği durumlarda korunmasının zorluğu ve mutasyonun melezlemelerle aktarılması durumunun belirsizliği tekniğin dezavantajlarıdır.

Süs bitkilerinde mutasyonun etkisi çok belirgin olduğundan, çiçek renginin, şeklinin veya boyutunun değiştirilmesi için karmaşık üretim prosedürleri gerekmemekte ve yenilikçi her şey pazarlanabilir olmaktadır. Bu nedenle, mutasyon tekniklerine dayalı süs bitkilerinin üretiminde yüksek başarı oranı sağlanmış ve bu teknoloji önemli bir araç haline gelmiştir (Maluszynski et al., 1995). Kasımpatı, karanfil, gül gibi pek çok süs bitkisinde mutasyon ıslahı ile yeni çeşitler geliştirilmiştir (Broertjes et al., 1976). Bu mutantların birçoğu köklendirilmiş gövde çeliklerinin ve uykuda olan tomurcukların radyasyona maruz bırakılmasıyla elde edilmiştir. Mutantlardaki çiçek rengi ve şeklinde oluşan değişiklikler, büyüme yapısındaki değişiklikler (bodur ya da tırmanıcı) ve ticari değeri olan diğer herhangi bir yeni fenotip ile değişiklik hemen fark edilmiştir.

Çiçekli, yumrulu, yapraklı, kesme çiçek, dış mekan süs bitkileri, süs bitkisi olarak kullanılan meyve türlerinde olmak üzere pek çok süs bitkisinde mutasyon ıslahı çalışmaları mevcuttur (Broertjes and Van Harten, 1988; Yamaguchi, 2018; Tütüncü et al., 2023). 2023 yılı itibarıyla mutasyon ıslahı ile UAEA (Uluslararası Atom Enerjisi Ajansı) mutant çeşit veri tabanına 3402 adet mutant çeşidin kaydı bildirilmiştir. Süs bitkileri ise bu oran içinde çok büyük bir paya sahiptir. Süs bitkilerinde 2023 yılı itibarıyla mutant çeşitler, kasımpatı (*Chrysanthemum* sp.) 289 adet, gül (*Rosa* sp.) 67 adet, yıldız çiçeği (*Dahlia* sp.) 36 adet, inka süseni (*Alstroemeria*) 35 adet, afrika menekşesi (*Saintpaulia* sp.) 31 adet, çuha çiçeği (*Streptocarpus*) 31 adet, karanfil (*Dianthus caryophyllus*) 28 adet, begonia (*Begonia* sp.) 25 adet, begonvil (*Bougainvillea* sp.) 17 adet, açelya (*Rhododendron*

sp.) 15 adet, japon gülü (*Hibiscus* sp.) 14 adet, lale (*Tulipa* sp.) 9 adet, zambak (*Lilium* sp.) 6 adet, deniz lavantası (*Limonium* sp.) 6 adet, çim (*Pennisetum* sp.) 5 adet, Antoryum (*Anthurium* sp.) 5 adet, mum çiçeği (*Hoya carnosa*) 4 adet, gypsophila (*Gypsophila* sp.) 3 adet, sardunya (*Pelargonium* sp.) 2 adet, benjamin (*Ficus benjamina exotica*) 2 adet, orkide (*Cymbidium* sp.) 2 adet, ingiliz çimi (*Lolium* sp.) 2 adet, hezaren (*Delphinium* sp.) 2 adet, Petunya (*Petunia* sp.) 2 adet, gerbera (*Gerbera jamesonii* Bolus) 1 adet olarak kayda geçmiştir (Kantoğlu ve Kunter, 2021; MVD, 2023).

İslahçıların deneyimleri sonucunda elde edilen veriler ışığında en çok cevap veren ümit var genotipleri seçerek çalışmaya başlamak başarıyı büyük ölçüde etkileyecektir. Mesela kasımpatılarda pembe çiçek rengine sahip genotiplere mutagen uygulaması; bronz, kahverengi, sarı, beyaz, kırmızı ve turuncu gibi geniş bir renk spektrumu eldesi şansını artırmaktadır (Schum, 2003).

Din et al.'a (2021) göre bir bitki türü, soy türlerle ilişkilendirilen renk özelliklerine sahip olduğunda, bu renk beyaz, sarı veya pembe olarak tanımlanır; beyaz renk, pigmentlerin yokluğunu temsil ederken, sarı ve pembe renkler sırasıyla karotenoidlerin ve antosiyaninlerin varlığını temsil eder. Pigmentler veya pigment kombinasyonları, turuncu, koyu kırmızı, morumsu kırmızı ve kırmızı gibi geniş bir çiçek rengi yelpazesi sunmak için geliştirilmiştir. Son zamanlarda, yeşil çiçekli çeşitler, dilsli çiçeklerinde klorofil içermeleriyle tanınmışlardır. Ayrıca, transgenik müdahaleler mor/mavi çiçekler üretmek için kullanılmıştır. Çiçek rengi, özellikle kasımpatıda çeşidin çok değer verilen bir özelliğidir. Üreticilerin nihai hedefi, zaman ve kaynak etkin bir yaklaşım kullanarak yeni kasımpatı çeşitleri oluşturmaktır. Çiçek pigmentasyonunu düzenleyen moleküler mekanizmaları araştırmak, çiçek renginin rasyonel manipülasyonu konusunda önemli bilgiler sağlayabilir.

Çiçek özelliklerinin veya büyüme şekli gibi birçok ekonomik öneme sahip karakterlerin değişiminin mutagen uygulamaları sonrasında kolayca izlenebilirliği nedeniyle süs bitkilerinde mutasyon ıslahı avantajlı bir yöntem haline gelmiştir. Ayrıca, birçok süs bitkisi heterozigot yapıdadır ve vejetatif olarak çoğaltılır. Bu durum da M₁ generasyonu içinde mutasyonların tespitini, seçimini ve korunmasını

mümkün kılmaktadır. Doğru mutasyon yönteminin seçimi, doğru doz aralığının uygulanması (mutasyon yaratacak ama rejenerasyona engel olmayacak kadar) ve *in vitro* kültür teknikleri ile kullanımı yöntemin başarılı olmasını sağlar. Mutasyonların tesadüfen meydana gelmesine rağmen, bu tekniğin kullanımı süs bitkilerinde genetik çeşitlilik yaratmak için cazip bir yöntem olmaya devam etmektedir. Mutasyon ıslahı günümüzde vejetatif çoğalan süs bitkilerinde rutin bir teknik haline gelmiş ve ticari ıslah firmaları tarafından sıkça kullanılmaktadır (Schum, 2003). Kasımpatı gibi heterozigotik yapıda olup da poliploidi gösteren türlerde, üstelik uyumsuzluk mekanizmaları ve gençlik kısırlığı gibi sorunlar da eklendiğinde melezleme ıslahında problemler yaşanabilmektedir. Mutasyon ıslahı bu gibi durumlarda, vejetatif çoğaltılan süs bitkilerinde gen havuzunun genişletilmesinde ve var olan özelliklere ek bir iki yeni özellik geliştirilmek istenilen durumlarda başarıyla kullanılmaktadır. Süs bitkilerinde mutasyon ıslahı çalışmaları radyosensitive, materyal seleksiyonu, uygun doz seçimi, mutasyonların sınıflandırılması, izolasyonu ve ticarileştirilmesi konularında yoğunlaşmıştır. Süs bitkilerinde mutasyon ıslahı çalışmaları çiçek karakterleri (renk, boyut, morfoloji, koku), yaprak karakterleri (şekil, boyut, pigmentasyon), büyüme yapısı (kompakt, tırmanıcı, dallanmış), fotoperiyodik tepki, erken çiçeklenme vazo ömrü gibi fizyolojik özelliklerin değiştirilmesi ile biyotik ve abiyotik stres faktörlerine tolerans gibi kaliteyi korumaya yönelik özellikleri içermektedir (Broertjes and Van Harten, 1988; Schum and Preil, 1998; Datta, 2009a; Datta, 2009b; Kantoğlu ve Kunter, 2021).

Dünyada 1930' lu yıllardan itibaren mutasyon ıslahı süs bitkilerinde kullanılmaktadır. Bir lale çeşidi olan "Faraday" ilk ticari mutant çeşittir. 1936 yılında cv. Fantasy' nin ışınlanması ile çiçek rengi değiştirilmiş, 1949 yılında ticarileştirilmiştir (Broertjes and Van Harten, 1988). 1970'li yılların sonlarından itibaren, birçok bitki türünde *in vitro* rejenerasyon protokollerinin geliştirilmesiyle, *in vitro* teknikler mutasyon araştırmalarında güçlü araçlar olarak kullanılmaya başlanmıştır. Bu iki tekniğin birleştirilmesi, ıslah süreçlerini önemli ölçüde hızlandırmıştır (Schum, 2003).

In vitro mutagenesis, Smith (1985) tarafından kimyasal ya da enzimatik uygulamalar sonucu DNA'nın hedef bölgelerinde meydana getirilen farklılık

(mutasyon) olarak tanımlanmıştır. *In vitro* mutagen uygulamaları ardından meydana gelen stabil periklinal kimeraların (stabil mutantlar) açığa çıkması, alt kültüre alma çalışmalarında çok daha mümkün olmaktadır. *In vivo* koşullarda yürütülen çalışmalarda çok sayıda kimerik, farklı renk ve yapıdaki çiçeklerin kaybı söz konusu olabilmektedir (Haspolat et al., 2019).

İslah çalışmalarında hastalık ve zararlılardan ari, sağlıklı materyal seçiminin önemi bilinmektedir. Işınlanan materyal hasar alarak hassaslaşıp gelişme döneminde zayıf düşebileceğinden dolayı mutasyon ıslahı çalışmalarında bu konu daha da önemli hale gelmektedir. Uygulama için seçilecek materyaller mümkün oldukça az sayıda ebeveynden, benzer klonlardan seçilmelidir. Işınlanacak ya da ışınlanmış materyalin, nem ve sıcaklık kontrollü olarak transferinin yapılması, ışınlama sonrası mümkün olan en kısa sürede anaçla, toprakla ya da besin ortamıyla buluşturulması, uygulamanın başarısını etkileyen faktörlerdir. Zorunlu beklemeyi gerektiren hallerde ışınlanmış materyallerin, 1-2 gün +4°C’de bekletilmesi dokulardaki hidrojen peroksit oluşum sürecini yavaşlatacaktır. Işınlama kaynağının örnek tablasının, dönebilen modellerden seçimi, materyallerin eşit dozda ışınlanması için önemlidir. Işınlama sırasında açığa çıkan ve bitkiye zararlı olabilecek yüksek ısıdan korunmak için klimatize kaynaklar tercih edilmelidir (Kantoğlu ve Kunter, 2021).

EMD₅₀ belirlenmesi için öncelikle ışınlanacak materyal ile aynı çeşitte bir çalışma varsa, tavsiye edilen doz kullanılmalıdır. Ancak materyalin su içeriği ile birlikte bölgesel ve yetiştirme koşullarının bu sonucu değiştirebileceği unutulmamalıdır. Çalışma yapılacak çeşitte belirlenmiş bir doz yoksa, EMD₅₀-LD₅₀’nin ön denemelerle belirlenmesi önerilmektedir. Bunun için aynı çeşit, yoksa yakın tür ve çeşitlerde yapılmış çalışmalardaki belirlenen dozlara yakın 7 farklı doz seçilerek her doz grubunda 50 vejetatif parça (göz, çelik, yumru vs.) ışınlanmalıdır. Işınlamadan sonraki 30-60. gün zaman aralığında (kontrol grubunda bir kaç yapraklı sürgünler oluştuğunda) farklı dozlarla ışınlanan bitki gruplarının tümünün sürgün uzunlukları ölçülmelidir. Grup ortalama verilerine göre, lineer regresyon grafiği ve eğim eğrisi oluşturulmalıdır. EMD₅₀’nu lineer regresyon analizi yardımıyla bulmak için, eğim eğrisine ait formülde kontrol grubuna ait sürgün ortalamasının yarısı formüle yerleştirilerek, %50 kısalma sağlayan doz (RD₅₀)

hesaplanmalıdır. Işınlamanın yapıldığı generasyon ilk generasyondur ve M_1V_1 olarak adlandırılır. Buradaki M_1 mutagen uygulaması sayısını gösterirken, V_1 vejetasyon sayısını kodlamaktadır. Uygulamadaki populasyon sayısını belirlemek, başarıyı etkileyen çok önemli bir faktördür. Uluslararası kabul edilebilir, istatistiksel olarak yararlı mutant bireyler içeren yeni bir fenotip seleksiyonu yapmak için, M_1V_2 generasyonunda 2000 bireyi hedeflemek gereklidir (Donini, 1982; Shu et al., 2012). Işınlamanın ardından gelişmeye başlayan ilk generasyonda (M_1V_1) görülen anormallikler, radyasyondan kaynaklı fizyolojik zararlanmalardır. Bu etkiler genellikle klorofil kayıpları, yapraklarda anormallikler (yırtık, bozuk simetri, kalın vb.), kısa boğum arası ve boy kısalığı olarak kendini gösterir çoğu genel olarak kalıcı değildir. Kimerik etkiler M_1V_1 ve M_1V_2 generasyonunda gözlenmeye başlamaktadır (Kantoğlu ve Kunter, 2021).

In vitro mutasyon yöntemi eksplantların ya da *in vitro* kültürlerin (protoplast, hücre, doku ya da organ) kimyasal veya fiziksel bir mutagen ile muamelesinden sonra meydana gelen mutantların tarama/seçim ve karakterizasyonunu takip eden bir süreçtir. *In vitro* mutasyonun pek çok avantajı vardır. Öncelikle çok sayıda homojen örnek, mutagen uygulamaları için küçük bir laboratuvar ortamında hazırlanabilir. Ayrıca kültüre alınan hücre, organ ve dokulardan gelişen materyale yapılan uygulamaların tekrarı ve toplu *in vitro* seleksiyonu senkronize yürütülebilir ve sonuç olarak daha güvenilir ve tekrarlanabilir verilerin eldesi sağlanır (Shu et al., 2011). *In vitro* mutasyon çalışmaları süs bitkilerinde Kohleria (Geier, 1989), Achimenes (Broertjes, 1972a), Begonia (Brown and Harney, 1974; Mikkelsen ve Sink, 1978; Roest et al., 1981; Broertjes, 1982), *Chrysanthemum morifolium* (Broertjes et al., 1976), Gerbera jamesonii (Jerzy and Lubomski, 1991), Kalanchoe (Broertjes and Leffring, 1972; Nakornthap, 1974; Shama Rao and Singh, 1976; Shama Rao, 1977; Karper and Pierik, 1981; Van Dordrecht, 1984), Pelargonium (Grunewaldt, 1983), Saintpaulia (Broertjes, 1972b), Streptocarpus (Broertjes, 1969) gibi pek çok türde yürütülmüştür (Datta, 2012; Kantoğlu ve Kunter'den, 2021).

Uygulamalara çabuk cevap veren bir tür olmasından dolayı ve klasik ıslah metotlarında yaşanan bazı kısıtlamalar nedeniyle kasımpatı bitkisinde mutasyon ıslahı sıkça kullanılmaktadır. Kasımpatı bitkisinde kendine uyumsuzluk görülmesi,

yüksek ploidi seviyesine sahip olması ve heterozigot bir yapı göstermesi nedeniyle, melezleme ve seleksiyon gibi klasik ıslah metotlarında zorluklar yaşanabilmektedir. Mutasyon ıslahı, süs bitkileri ıslahında her zaman diğer teknikleri tamamlayan bir unsur olmuştur. Islah programları için gerekli genetik materyal kaynağının ve genetik varyasyonun artırılmasına yardımcı olduğu için dikkat çekici bir ıslah metodudur (Basiran, 2000).

Kasımpatı bitkisinin ışınlanmasıyla çok sayıda umut verici stabil mutantların yanı sıra kısmi kimeralar da meydana gelmektedir. Genellikle vejetatif çoğalan bitkilerdeki temel sıkıntı fiziksel ya da kimyasal mutagen uygulamalarından sonraki meydana gelen mutasyonların kimera olarak ortaya çıkışıdır. Kimeralı mutant kısım bitkide, petal üzerindeki ince bir çizgi şeklinde, çiçeğin sadece bir kısmında, tek bir çiçeğin tamamında, dalın sadece bir kısmında ya da dalın tamamında bulunabilir. Eğer dalın bir kısmında ya da dalın bütününde mutant kısım bulunuyorsa izolasyon mümkün olabilmektedir fakat çiçeğin sadece bir kısmında çizgi halinde ortaya çıkan mutant kısımların izolasyonu zordur (Mandal et al., 2000a; Datta and Chakrabarty, 2009). Bu gibi çiçekte ya da dalın bir kısmında meydana gelen ufak bir mutant kısmın izolasyonu geleneksel çoğaltım teknikleriyle mümkün değildir. Bu yüzden mutagen uygulamalarından sonra meydana gelen pek çok yeni çiçek rengi ve şekli, mutant kısımdan etkili bir rejenerasyon sistemi eksikliğinden dolayı yok olmaktadır (Chakrabarty et al., 1999). Bu aşamada da *in vitro* teknikler devreye girmektedir. *In vitro* rejenerasyon ile birlikte mutasyon ıslahının birlikte kullanımı saf formda yeni mutantları oluşturmak ve yeni elde edilen farklı renk ve tipteki kasımpatı çeşitlerinin çok miktarda üretimini kolaylaştırmak için yararlı bir yaklaşım olmaktadır. Böylece, bu *in vitro* yaklaşım süs bitkileri sektörü için yeni çiçek renkleri ve tiplerinin büyük miktarlarda üretimi için yeni ufuklar açmaktadır (Verma, 2012). Kasımpatının *in vitro* kültürü yıllardır yapılmaktadır. Gövde, çiçek tablası, tüm çiçek, çiçek kısımları ve epidermis, sürgün ucu gibi farklı eksplantlar bitki rejenerasyonunda kullanılmıştır. Fakat mutant dokuyu izole etmek ve yeni çeşit geliştirmek amacıyla gama ışını uygulanmış kasımpatıdan kimerik dokuyu izole etmek için doku kültürü yönteminin kullanımı 2000’li yıllara kadar mümkün olmamıştır (Mandal et al., 2000a).

Kasımpatı bitkisinin ışınlanmasıyla çok sayıda umut verici stabil mutantların yanı sıra kısmi kimeralar da meydana gelmektedir. Genellikle vejetatif çoğalan bitkilerdeki temel sıkıntı fiziksel ya da kimyasal mutagen uygulamalarından sonraki meydana gelen mutasyonların kimera olarak ortaya çıkışıdır. Kimeralı mutant kısım bitkide, petal üzerindeki ince bir çizgi şeklinde, çiçeğin sadece bir kısmında, tek bir çiçeğin tamamında, dalın sadece bir kısmında ya da dalın tamamında bulunabilir. Eğer dalın bir kısmında ya da dalın bütününde mutant kısım bulunuyorsa izolasyon mümkün olabilmektedir fakat çiçeğin sadece bir kısmında çizgi halinde ortaya çıkan mutant kısımların izolasyonu zordur (Mandal et al., 2000a). Bu gibi çiçekte ya da dalın bir kısmında meydana gelen ufak bir mutant kısmın izolasyonu geleneksel çoğaltım teknikleriyle mümkün değildir. Bu yüzden mutagen uygulamalarından sonra meydana gelen pek çok yeni çiçek rengi ve şekli, mutant kısımdan etkili bir rejenerasyon sistemi eksikliğinden dolayı yok olmaktadır (Chakrabarty et al., 1999). Yeni kasımpatı çeşitlerinin geliştirilmesinde çiçek eksplantlarının kullanımı yaprak ve gövde eksplantı gibi diğer eksplantlara göre daha fazla fırsat sağlar. Pek çok spontane veya indüklenerek oluşturulmuş mutasyonlar sonucu oluşan değişimler, çiçekler üzerinde küçük noktalar veya çizgiler şeklinde ortaya çıkabilir. Mutant dokuların küçük bir alanda ortaya çıkmasından dolayı bu tür mutasyonlar kaybolur. Bununla birlikte bu mutant çiçek eksplantlarından sürgünlerin veya somatik embriyoların rejenere edilmesi stabil mutantlar elde etme fırsatı sağlar (Datta ve Chakrabarty, 2009).

Mutasyon ıslahı ve *in vitro* rejenerasyonun birlikte kullanımı, mutant dokuların *in vitro* izolasyonu için boğum, boğum araları ve dilsli çiçeklerden rejenerasyon ile mutant bitkilerin eldesine yönelik olarak uygulanmaktadır (Datta and Chakrabarty, 2009). *In vitro* eksplantlar, mutasyon ıslahı için çok uygun materyallerdir. *In vitro* kültürlerin küçük bir alanda, hastalık ve zararlılardan arı bir ortamda uygulanması sayesinde çok sayıda ışınlanmış eksplant ile çalışılabilir. *In vivo* koşullardan daha etkili bir rejenerasyon elde edilir, mutant bitki elde etme olasılığı artar ve böylece ıslah programının tüm aşamaları önemli ölçüde hızlanır (Zalewska et al., 2011). Birçok bitki türü için *in vitro* tekniklerin geliştirilmesi, mutasyon ıslahında verimliliği artırmaya yardımcı olmuştur. Mutagenik etkilere maruz bırakılmış büyük popülasyonlarla sınırlı bir alanda çalışmak, vejetatif olarak üretilen türlerde daha hızlı generasyon dönüşümü sağlamak ve kültür ortamında

birçok biyotik ve abiyotik stres faktörünü elemek için *in vitro* teknikler çok etkilidir (Pathirana, 2011).

Mutasyon ıslahı, genetik manipölasyonlar aracılığıyla yeni çeşitlerin geliştirilmesinde en önemli teknolojilerden biri olarak kabul edilmektedir. Fiziksel ve kimyasal mutagenler kullanılarak yapılan mutasyon teknikleri, farklı süs bitkilerinde oldukça fazla sayıda umut verici yeni çeşitlerin başarılı bir şekilde üretilmesini sağlamıştır. Bu teknik, süs bitkilerinde ek avantajlara sahip olması nedeniyle başarıyla uygulanmaktadır. Çiçeklerin renk, şekil veya boyutu veya yapraklardaki klorofil varyasyonu gibi herhangi bir fenotipik özellikteki değişiklikler kolaylıkla tespit edilebilir. Birçok türün heterozigot doğası yüksek mutasyon frekansı sağlar. Vegetatif olarak çoğaltılan bitkilerde mutasyon ıslahının en büyük avantajı, genotipin geri kalan ve genellikle benzersiz olan kısmını değiştirmeden bir veya birkaç karakterini değiştirebilmesidir. Mutasyon ıslahı ile ilgili radyo-duyarlılık, materyal seçimi, gama ışınlarına maruz kalma yöntemleri, uygun doz, mutasyonların tespiti, mutasyon frekansı ve spektrumu, mutantların izolasyonu ve mutantların ticari olarak kullanımı gibi konularda pek çok araştırma yürütülmüştür. Vegetatif olarak çoğaltılan bitkilerin mutasyon ıslahında ana zorluk, kimeraların oluşmasıdır (Datta, 2012). Birden fazla genotipe sahip hücrenin veya dokunun bir arada canlılıklarını devam ettirmesi durumu kimera olarak tanımlanmaktadır. Kimeralar periklinal, meriklinal ve sektöriyel kimeralar olarak karakterize edilirler (Kantoğlu ve Kunter, 2021). Çoğu kasımpatı türü, genetik olarak diğerlerinden farklı bir hücre katmanlı (dış) periklinal kimeralara sahiptir ve periklinal yapı meristematik olmayan eksplantların çoğalmasıyla ortaya çıkar (Zalewska et al., 2007). Kimeralar, meristem içinde kendiliğinden veya uyarılmış mutasyonların meydana gelmesinin bir sonucu olarak ortaya çıkar (Tilney-Bassett 1986). Kimeralar genellikle adventif sürgünlerde bulunurlar ve klonal çoğaltım çalışmalarında sorun yaratabilirler. Ancak genetik çeşitlilik çalışmalarında somaklonal varyasyonlardan faydalanılır (Özzambak vd., 2021b) ve çiçek renginin değişimi gibi ıslah süreci için olumlu katkılar elde edilebilir (Zalewska et al., 2007). Kimerizmi ortadan kaldırmak için mutant hücrelerin nesilden nesile aktarımına izin veren bir rejenerasyon yöntemi ihtiyacı doğmuştur (Teixeira da Silva, 2004). Shinoyama et al. (2002), sürgünlerin doğrudan rejenerasyonuyla elde edilen mutant bitkilerde kimerizm sıklığının daha yüksek olduğunu, ancak kallus aşamasıyla

dolaylı olarak rejenere olan sürgünlerde kimerizm gözlenmediğini bildirmişlerdir (Teixeira da Silva et al.'dan, 2013). Kimerizm, kimeral bileşenler ayrılabilirdiğinden, periklinal kimeralardan çoğaltılan adventif sürgünler yoluyla kasımatıda yeni çiçek renklerinin ortaya çıkması da dahil olmak üzere, bir ıslah programında genetik varyasyonun oluşturulması için önemli bir fenomen olabilir (Zalewska et al., 2007; Teixeira da Silva et al.'dan, 2015). Kasımpatı *in vitro* rejenerasyonunda çiçek dokusunun kullanımına ilişkin birçok çalışma vardır ve bunların büyük bir kısmı, radyasyona bağlı çiçeklerde oluşan kimerik dokuyu (dilsî veya tüpsü çiçeği) yeniden oluşturmak için doku kültürünün kullanımına odaklanmıştır (Datta and Teixeira da Silva, 2006). Kasımpatılarda, L1, L2 ve L3 katmanlarından meydana gelen yapraklardan kimera oluşurken, çiçek renginin belirlendiği L1 ve L2 katmanlarından ve çiçek şeklinin belirlendiği L2 katmanından kimeralar oluşmaktadır (Stewart ve Dermen 1970; Bush et al., 1976). Adventif sürgünler veya somatik embriyolar *in vitro* koşullarda kültüre alındığında, rejenerasyon L1 veya L2 tabakasındaki tek bir hücreden gerçekleşir ve L1 veya L2 tabakasının genotipini gösterir, genetik olarak kararlı bitkiler üretir (Chakrabarty et al., 1999, 2000; Teixeira da Silva et al.'dan, 2015).

Mutasyon ıslahı, yeni ve özgün bitki gen kaynaklarının geliştirilmesi için güçlü bir araç haline gelmiştir. Gama ışınlaması, iyon ışınları ve kimyasal mutagenler gibi yöntemler, mutasyonların indüklenmesi için uygulanmaktadır. Geleneksel mutagenizde hala büyük miktarda mutagenize edilmiş populasyonların elde edilebilirliği ve seçim yöntemleri bir engel oluşturduğundan, kültürlü eksplantlar, hücreler ve doku kültürleri üzerinde *in vitro* mutageniz, genetik değişkenliğin indüksiyonu için uygun bir yöntem olarak görülmektedir. Bu şekilde istenilen özellikler için hücresel düzeyde seçim yapılabilen ve birçok bitkide bu başarı ile uygulanabilmektedir (Penna et al., 2012).

Günümüzde biyoteknolojinin ilerlemesi, modern ıslah yaklaşımını büyük ölçüde değiştirmesine rağmen, uyarılmış mutasyon teknikleri hala tamamlayıcı araçlar olarak kullanılmaktadır. Malezya Nükleer Teknolojileri Araştırma Enstitüsü (MINT), süs bitkilerinde çeşit geliştirme için bu teknikleri kullanma deneyimleri sayesinde birçok süs bitkisi türünde genetik çeşitliliği artırmış, yeni mutant çeşitler

geliştirilmiş ve altı süs bitkisi türü için *in vitro* mutagenез prosedürleri ve mikroçoğaltma için etkili doku kültürü sistemleri geliştirmiştir (Basiran, 2000).

Kasımpatı üzerine yapılan son araştırmalar bu türün genotipten bağımsız fenotipik plastisitesini göstermiştir. Bu da onu, gelişim ve dönüşüm üzerine *in vitro* çalışmalar için model bitki olarak uygun bir aday haline getirmektedir. TCL (Thin Cell Layers) ve biyoteknolojik ıslah protokollerinden (somatik embriyogenез, türler arası somatik hibridizasyon, mutasyon/klasik ıslah ve genetik transformasyon) elde edilen *in vitro* rejenerasyon bulguları; büyüme, gelişme ve çiçek indüksiyonunun altında yatan dinamik süreçleri anlamada önemli araştırmaları göstermektedir. Artık yeni çiçek karakterleri eldesi için iyon ışınları ve genetik transformasyon çalışmalarına eğilim olmasına rağmen, klasik mutasyon ıslahı (fiziksel ve kimyasal mutagenler kullanılarak) önemli bir varyasyon kaynağı olmaya devam etmektedir. Yapılan çalışmalar ayrıca, kasımpatının *in vitro* ve *ex vitro* stres faktörlerine yüksek dayanım kapasitesi nedeniyle, süs bitkileri ıslahı çalışmalarında kullanmak üzere çok uygun adaylar olabileceğini göstermektedir. Rejenerasyon, mutasyon ve transformasyon protokolleri üzerine daha çok çalışılmanın yapılması kasımpatı biyoteknolojisinde hızlı ilerlemelere izin verecektir (Shinoyama et al., 2006).

Kasımpatında yapılan mutasyon ıslahı çalışmaları aşağıda sunulmuştur.

Mutasyona uğramış dokuların rejenerasyonu, bitki doku kültürü teknikleriyle başarıyla sağlanmaktadır. “Maghi” kasımpatı çeşidinin köklü çeliklerine uygulanan farklı dozlardaki gama ışını sonrasında meydana gelen somatik mutasyonlar bitkinin çiçek renginde ve yapraklardaki klorofil dağılımında kendini göstermiştir. Mutant dokulardan bitki rejenerasyonu sağlamak amacıyla boğum, boğum arası, sürgün ucu ve dilsli çiçek eksplantları farklı konsantrasyonlarda ve kombinasyonlardaki BBD’lerin bulunduğu MS ortamında kültüre alınmışlardır ve tüm mutant dokulardan bitki rejenerasyonu başarıyla sağlanmıştır. Çalışmada yapraklardan ve iki yeni çiçek renginden alınan mutant dokular sırasıyla %64 ve %100 oranlarında saf halde izole edilmiştir. En iyi sürgün oluşumu %80 oranında 6.3 ± 1.4 ile $9.29 \mu\text{M}$ kinetin + $1.07 \mu\text{M}$ NAA bulunan ortamda meydana gelmiştir (Mandal et al., 2000a).

Mandal et al. (2000b) yaptıkları çalışmada, *Chrysanthemum morifolium* türüne ait beyaz çiçekli Purnima ve kırmızı çiçekli Colchi Bahar çeşitlerinin köklü çeliklerine gama ışını uygulanmıştır. Her iki çeşidin de çiçek renginde sektöriyel somatik mutasyonlar gözlemlenmiştir (her iki çeşitte de yeşil renk). Mutasyona uğramış dilsî çiçekleri BAP/kinetin ve NAA'nın farklı kombinasyonlarını içeren MS ortamına dikilmiş ve 2 hafta içerisinde doğrudan sürgün gelişimi gözlemlenmiştir. Sürgün farklılaşması SEM (Scanning Electronic Microscope) çalışmaları ile onaylanmıştır. En iyi rejenerasyon 0.2 mg/l NAA ve 0.5 mg/l BAP içeren ortamda gözlemlenmiş, sürgünler köklendirilerek dış koşullara aktarılmıştır. Dış koşullarda çiçeklendirilen bitkilerin eksplant ile aynı rengi (yeşil) taşıdığı gözlemlenmiştir. Böylece ışınlama sonrası meydana gelen yeşil mutant kısım, kimera izolasyonu ile başarıyla sonraki generasyona aktarılmıştır.

Lamseejan et al. (2000), mor renkli kasımpatı bitkisinde *in vitro* gama ışını uygulamasının etkisini test etmek için yaptıkları çalışmada, dilsî çiçekleri 10.0 mg/l BAP içeren MS ortamında kültüre almışlardır. Çoğalan çoklu sürgünler 0, 10, 30, 50, 70, 90, 110 Gy gama ışını ile ışınlanmışlardır. M_1V_1 den M_1V_4 ' e kadar alt kültüre aldıkları bitkileri daha sonra köklendirip seraya aktarmışlardır. LD₅₀ 14 Gy olarak tespit edilmiştir. Sadece kontrol bitkileri ve 10 Gy ile muamele edilen bitkiler hayatta kalıp tam çiçeklenme göstermişlerdir. Seraya aktarmadan 60 gün sonra, kontrol bitkileri ile ışın uygulananlar arasında ortalama boy, ortalama yaprak sayısı, ortalama nod sayısı ve % çiçeklenmelerinde farklılıklar tespit edilmiştir. Bitkiler üçer ay arayla 2 kez budanmıştır ve çiçeklenmeye bırakılmıştır. Hem kontrol bitkilerinin hem de ışınlanan bitkilerin çiçek karakterlerinde değişimler olmuştur. Sonuç olarak ışınlanan bitkiler kontrole göre daha fazla varyasyon göstermiş ve yeni sarı renkli bir çiçek saptanmıştır.

Datta et al. (2001), *Dendranthema grandiflorum* cv. "Puja" köklü çeliklerini farklı dozdaki gama ışınları ile muamele etmişlerdir. Tüm dozlarda çiçek renk ve şekillerinde sektöriyel mutasyonlar meydana gelmiştir. "Puja" çeşidinin orijinal rengi kırmızı mor ve şekli ise düz spoon tarzı olduğu bildirilmiştir. Mutant çiçeklerden biri sarı turuncu iken, şekil olarak bir değişiklik gözlenmemiştir. Bir diğer mutant çiçeğin ise rengi sarı turuncu iken, çiçek şekli ise tubular olarak değişmiştir. Orijinal ve mutant dilsî çiçekleri, şeker ve farklı kombinasyonlardaki

NAA ve BAP içeren MS temel besin ortamında kültüre almışlardır. Kültür başlangıcından itibaren iki hafta içerisinde direk sürgün organogenesizi gözlenmiştir. 1.0 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA ilave edilmiş ortamda en iyi rejenerasyon gerçekleşmiştir. Tüm eksplantlar sürgün rejenerasyonundan sonra köklendirilerek dış ortama aktarılmıştır. Çiçeklenen rejenere bitkilerin ana eksplant ile aynı renk ve şekilde olduğu belirlenmiştir. Işınlama sonrası elde edilen mutant renk ve şekil, *in vitro* aracılığıyla başarıyla sonraki generasyona aktarılmıştır.

Misra et al. (2003), çiçekleri soluk kırmızı renkte ve flat spoon şeklinde olan *Chrysanthemum morifolium* Ramat cv. Lalima bitkisinde yaptıkları çalışmada, dilsî çiçekleri 1.07 µM NAA ve 8.87 µM BA ile güçlendirilmiş MS ortamında kültüre almışlardır ve ardından 0.5 Gy ve 1 Gy dozlarında gama ışını ile ışınlamışlardır. Tüm kontrol ve gama ışını ile ışınlanan çiçeklerden rejenere olan sürgünler köklendirilip dış ortama aktarılmıştır. 0.5 Gy ışınlamasında 2 tane mutant tespit edilmiştir. Her iki mutantta sarı renkli olmasına rağmen biri orijinal varyetedeği gibi düz spoon dilsî çiçekli, diğeri ise tubular çiçekli olduğu saptanmıştır. Mutantlar vejetatif olarak çoğaltılmış ve doğru tipte çiçekler vermiştir.

Datta et al. (2005), *Chrysanthemum morifolium* Ramat. Cvs. Flirt, Puja, Maghi ve Sunil çeşitlerini, 500 ve 1000 rad gama ışını uygulamasından sonra farklı konsantrasyonlarda ve kombinasyonlardaki BBD ile desteklenmiş MS temel besin ortamında kültüre almışlardır. Gama ışını ile muamele edilen çiçek kısımlarındaki direk sürgün oluşum oranları düşüş göstermiştir. Radyasyonun etkisi gama ışını uygulanan çiçek eksplantlarının yanı sıra, bitki yüksekliği, yaprak ve çiçek boyutlarında da olmuştur. Beş mutant çiçek rengi ve şekli değişimi dilsî çiçeklerde tespit edilmiştir. *In vitro* mutasyon ile direk rejenerasyonun birlikte kullanımı stabil mutantların kısa bir sürede eldesini sağlamıştır.

Yeşilimsi beyaz renkli büyük çiçekli kasımpatı çeşidi 'Madam E Roger''da daha fazla genetik çeşitlilik oluşturmak için *in vitro* çoğaltma ve mutasyon çalışmaları yürütülmüştür. Bu amaçlar ticari kullanım için büyük ölçekli kaliteli dikim materyali geliştirmek üzere bir protokol standardize edilmiştir. 0.5 mg/l NAA + 2.0 mg/l BA ile desteklenmiş besin ortamındaki dilsî çiçeklerinde sürgün tomurcuğu farklılaşması sağlanmıştır. Farklılaşan sürgünler, aynı ortamda çoğalıp,

0.5 mg/l NAA ilaveli besin ortamında köklenmiştir ve aklimatizasyonu tamamlanarak dış koşullara dikimi yapılmıştır. Dilsî çiçekler kültüre alınır alınmaz 1.0 Gy γ - ile ışınladığında, sarı renk stabil mutant bir çiçek rengi kaydedilmiştir (Misra and Datta, 2007).

Toplam ışınlama dozu ve doz hızının çiçek renk mutasyonu üzerindeki etkisi ve radyasyon hasarı göstergesi olarak nükleer DNA içeriği kasımpatıda araştırılmıştır. *In vitro* kültür koşullarındaki *Chrysanthemum morifolium* cv. 'Taihei' çeşidine 15, 30, 60 Gy dozlarında gama ışınlarına 0.5, 1, 2 ve 5 Gy/s hızlarında maruz bırakılmıştır. Işınlanan bitkilerden alınan yaprak eksplantlarının *in vitro* koşullarda kültürü yapılarak, rejenerasyon oranları ile çiçeklerdeki renk mutasyonun sıklığı incelenmiştir. Nükleer DNA içeriği, flow sitometrik analiz ile ölçülmüştür. Rejenerasyon oranının, toplam doz ve doz hızı arttıkça azaldığı tespit edilmiştir. Mutasyon sıklığı ile doz hızı arasında önemli bir fark çıkmadığı, bu da mutasyon sıklığının doz hızına bağlı olmadığını, daha çok toplam doza bağlı olduğunu gösterdiği bildirilmiştir. Her bir doz uygulaması ile nükleer DNA içeriğinin ortalaması karşılaştırıldığında, DNA içeriğinin hem doz hızı hem de toplam dozdan etkilendiğini ve nükleer DNA içeriğindeki azalmanın, toplam dozlar yüksek olsa bile, düşük doz hızlarında daha az olduğu belirlenmiştir. 0.5 Gy/s hızı ile 2 Gy/s hızı karşılaştırıldığında, büyük bir nükleer DNA içeriği azalması olmadan aynı mutasyon sıklıklarının elde edildiği belirlenmiştir. Sonuç olarak, düşük doz hızlarında yüksek toplam dozlarla yapılan gama ışınları, kasımpatıda daha az radyasyon hasarıyla mutasyonları etkin bir şekilde indüklemektedir (Yamaguchi et al., 2008).

Datta and Chakrabarty (2009) yaptıkları çalışmada kasımpatı çeşitlerinin 13 cm boyundaki köklü çeliklerinde (Puja, Lilith, Maghi, Purnima and Colchi Bahar) 1.5, 2.0, ve 2.5 Krad gama ışını uygulaması yapmışlardır. Çiçeklenen bitkilerde kimerik yapı gösteren dilsî çiçekleri *in vitro* koşullarda BAP/kinetin ve NAA' nın farklı kombinasyonlarını içeren ortamda kültüre almışlardır. Yüzey sterilizasyonu yapılan farklı çeşitlere ait dilsî çiçekleri kültüre almadan önce 0.5 ve 1.0 Krad gama ışınına maruz bırakmışlardır. Rejenere olan tüm sürgünler köklendirilmiş ve gözlemleri yapılmak üzere dış ortama aktarılmıştır. Yapılan gözlemler sonucunda

çok sayıda mutant bitki eldesi sağlanmıştır ve vejetatif olarak çoğaltıldıklarında doğru tipte oldukları saptanmıştır.

Nagatomi'nin farklı yıllarda yürüttüğü çalışmalarda *in vitro* kültür kullanılarak yapılan kronik (gama alanı) ışınlamanın ve akut (gama odası) ışınlamanın kasımpatı bitkisi üzerine etkileri araştırılmıştır. Işınlama ile birleştirilen *in vitro* kültür tekniği ile, kimera oluşum sorununun üstesinden gelindiği ve geleneksel mutasyon yöntemine göre 10 kat daha fazla mutasyon verimliliği sağlandığı bildirilmiştir. Kronik ışınlama yönteminin, kasımpatıda en geniş renk spektrumunu gösterdiği bununla birlikte, akut ışınlama yöntemlerinin nispeten düşük bir mutasyon oranı ve çok sınırlı bir çiçek renk spektrumu gösterdiği belirtilmiştir. Çiçek rengi mutasyonlarının, yapraklardan çok petaller ve tomurcuklardan elde edildiği bildirilmiştir. Bu açıdan, çiçek organlarında tam olarak ifade edilen gen lokuslarının mutageniz ve kültür yoluyla mutasyona karşı kararsız olabileceğinden kaynaklandığı, ancak istenen yönde mutasyona neden olabileceği düşünülmektedir. Kronik ışınlama yönteminin daha yüksek frekanslar göstermesinin olası bir nedeni de, doku ve organları oluşturan hücrelerin çoğunun, ışınlamaya karşı oldukça duyarlı ve daha değişken olduğu hücre bölünmelerinde sürekli olarak ışınlanmış olması olarak bildirilmiştir. Bu koşullar altında, büyüyen organların hücrelerinde birçok mutasyona uğramış sektör birikebileceği düşünülmektedir. Mutasyona uğrayan hatların, ışınlama ile kromozom sayılarında dikkate değer bir azalma gösterdiği tespit edilmiştir ve bunun radyasyon hasarını izlemek için uygun bir gösterge olduğu belirtilmiştir. 2001 yılında yapılan çalışmada çiçek rengi değişen altı adet mutant çeşidin, kronik ışınlama ile elde edildiği; 2009 yılında yapılan çalışmada ise kayıtlı mutant çeşitlerin 10 tanesinden 9'unun kronik ışınlama ile elde edildiği bildirilmiştir. Kronik ışınlamanın çiçek türlerinin yanı sıra diğer türlerin mutasyon ıslahı için de pratik olarak kullanılabileceği belirtilmiştir (Nagatomi, 2001; Nagatomi and Degi, 2009).

Barakat et al. (2010b), *Chrysanthemum morifolium*'un Delistar White çeşidinde iki doz (0.5 ve 1.0 Gy) gama ışını uygulayarak *in vitro* mutagenesis oluşturmayı amaçlamışlardır. Kasımpatı mutantları ve ebeveynleri arasındaki genetik polimorfizmi belirlemek için RAPD analizini kullanmışlardır. Kallus ve sürgün oluşumu oranları gama ışını dozlarından etkilenirken ortamlar arasındaki

farklılık ile varyasyonlarla ortam interaksyonu istatistikî olarak önemsiz bulunmuştur. Kontrol ile kıyaslandığında, gama ışını uygulanan örneklerde sürgün uzunluğunun azaldığı tespit edilmiştir. Kimera olmadan çiçek şekli ve bir saptaki çiçek sayısında 0.5 Gy uygulaması en etkili doz olmasına rağmen çiçek renginde bir değişim gözlemlenmemiştir. Fakat kimera olmadan çiçek rengi/şekil mutasyonları ile sonuçlanan boru şeklinden kaşık şeklinde çiçeğe dönüşümün kimera safhasından kaçınarak doğrudan *in vitro* mutagenesis ile geliştirilebilir olduğu ortaya çıkmıştır. Çalışmada kasımpatıların 13 somatik klonundan genomik DNA çıkartılmış ve 5 RAPD primeri kullanılmıştır. 14 genotip arasındaki genetik benzerlik 0.43'ten 0.95'e kadar değişmiştir. Kasımpatı çeşitlerinin 13 somatik klonu 5 kısma (cluster) ayrılmıştır.

Zalewska et al. (2010) yaptıkları çalışma 1977 yılından itibaren *Chrysanthemum × grandiflorum* (Ramat.) Kitam. bitkisinde iyonize radyasyon ile yapılan somatik mutagenesis çalışmalarını içermektedir. İlk önemli sonuçlar çiçekli kasımpatılardan *in vivo* ortamda ışınlanmış yaprakların ayrılmasıyla elde edilmiştir. Mutasyon ıslahı çalışması daha sonraki denemelerde *in vitro* ortamda rejenerasyon için adventif sürgün tekniğinin kullanımıyla birlikte yürütülmüştür. Eksplant olarak yapraklar, kalluslar, boğum araları ve tekli sürgünler kullanılmıştır. Kallus dışındaki tüm eksplantlar mutagenik uygulama sırasında büyüyen mikrosürgünlerin ışınlanmasıyla elde edilmiştir. Yapılan uygulamalarda X ışını ve gama ışını ışınlamaları 15-25 Gy dozları arasında değişmiştir. Rejenerasyonlar 0.6 mg/l BAP ve 2.0 mg/l IAA ile desteklenmiş MS ortamında sağlanmıştır. En etkili sonuçlar gama ışını ile birlikte *in vitro* rejenerasyon uygulamaları kullanıldığında elde edilmiştir. Mutantlarda meriklinal ve sektöriyel kimeralar tespit edilmiş ve hepsinin stabil olduğu gözlenmiştir. Çalışmalar sonucunda çok kısa bir zaman diliminde sadece tek bir anne çeşitten pek çok sayıda işe yarar mutantların ve dolayısıyla yeni çeşit adaylarının geliştirilebileceği saptanmıştır.

Zalewska et al. (2011) yaptıkları çalışmada *Chrysanthemum × grandiflorum* (Ramat.) Kitam. bitkisinin “Albugo”, “Alchemist” ve “Satinbleu” çeşitleri 15 Gy dozunda gama ışınına maruz bırakılmışlardır. “Albugo” ve “Satinbleu” çeşitlerinin MS ortamında bulunan mikro sürgünlerindeki tekli koltuk eksplantları ve yaprakları ışınlamadan sonra çıkarılmış ve 0.6 mg/l BAP ve 2.0 mg/l IAA ile desteklenmiş

MS ortamında alt kültüre alınmışlardır. “Alchemist” çeşidinde yaprak saplarında oluşan kalluslar ile birlikte yaprak eksplantları ışınlanmıştır. Bu eksplantlar 1 ay öncesinde 0.6 mg/l BAP ve 2.0 mg/l IAA ilave edilmiş MS ortamına yerleştirilmiştir. Rejenere olan adventif sürgünler alt kültüre almadan taze ortama nakledilmişlerdir. Yeni oluşan sürgünler ışınlamadan 4 ay sonra köklendirme ortamına transfer edilmişlerdir. Gama ışını eksplantlar üzerindeki sürgün rejenerasyonunu etkilemiştir. M₂ generasyonunda tanıtılmaya değer çok ilginç mutantlar saptanmıştır. Bunlar; ‘Albugo Sunny’, ‘Alchemist Tubular’, ‘Alchemist Golden Beet’, ‘Satinbleu Minty’, ‘Satinbleu Honey’dir.

Kaul et al. (2011), *Dendranthema grandiflora* Tzelev cv. “Snow Ball” çeşidinde yaptıkları çalışmada, çıkarılan gövde parçalarını 0.5 mg/l BA; 0.1 mg/l IAA ve 1.0 mg/l GA₃ ile desteklenmiş MS ortamında kültüre almışlardır. *In vitro* koşullarda uzayan sürgünler (2-3cm) 5, 10, 20, 30 Gy gama ışını ile ışınlanmış ve aynı ortamda çoğaltılmıştır. 3-4 cm uzunluğuna gelen sürgünler, 0.3 mg/l IBA ve %0.2 aktif kömür bulunan ½ MS ortamında köklendirilip morfolojik gözlemler için dış ortama aktarılmışlardır. *In vitro* mutasyon, 10 Gy ile ışınlanan bitkinin 1 dalında çiçek renginde belirlenmiştir. Orijinal çiçek rengi beyaz ve çiçek şekli flat ve incurving olan “Snow Ball” çeşidinin mutantının çiçek rengi ise sarı iken, çiçek şekli ise değişmemiştir. Mutant daldaki çiçeklerden rejenere olan bitkilerin tümünün rengi ve şekli aynı devam etmiştir. Böylece stabil mutant kısa bir sürede geliştirilmiştir.

Verma et al.’a (2012a) göre mutasyon ıslahı, kasımpatıda genetik varyasyon oluşturmada kilit bir rol oynamaktadır. Gama ışınlamalarıyla kimerik formdan çiçek rengi, şekli ve boyutu farklı olan yeni mutant ortaya çıkmaktadır. Bu tür mutasyona uğramış dokunun izole edilmesi, geleneksel tekniklerle mümkün değildir. Bu nedenle, tüm bu yeni mutantlar, geleneksel çoğaltma yöntemleriyle izole etmek için uygun araçların eksikliği nedeniyle her yıl kaybedilmektedir. Bu nedenle, bu kimerik mutantlardan etkili bir rejenerasyon sistemi geliştirme çalışmaları yapılmakta, böylece yeni mutant izole edilebilir, saflaştırılabilir ve yeniden bitki elde edilebilir. Dilsı çiçeklerin mancozeb-45 (0.2%) + carbendazim (0.2%) + 8-HQC (200 mg/l) ile 3 saat ön işleme tabi tutulmasından sonra HgCl₂ (0.2 mg/l) ile yüzey sterilizasyonunun yapılması kültürlerde maksimum hayatta

kalma oranı vermiştir ve en yüksek mikro sürgün proliferasyonu (100.0%) elde edilmiştir. Kallus indüksiyonu, BAP (4.0 mg/l) ve NAA (1.0 mg/l) ile desteklenmiş MS besiyerinde maksimum düzeyde elde edilmiştir. Dilsî çiçeklerden indüklenen kallustan mikro sürgünlerin maksimum rejenerasyonu (95.56%) BAP (4.0 mg/l) ve NAA (0.1 mg/l) ile takviye edilmiş MS besiyeri üzerinde kaydedilmiştir. Köklenme için MS besiyeri, BAP (5.0 mg/l) + NAA (0.1 mg/l) + GA₃ ile ½ MS besiyerinde 0.5 mg/l NAA takviyesi ideal sonuçları (99.0%) vermiştir. Köklü fidelerin dış koşullara aktarımı, aklimatizasyon süresinden 3-4 hafta sonra başarıyla gerçekleştirilmiştir. İzole edilen mutant, orijinal kırmızı mutant (stabil) olan özgün tip çiçeklerden üretilmiştir.

Kumar et al. (2012) tarafından yapılan çalışma, kasımpatı (*Dendranthema grandiflora* Tzelev) cv. Snow Ball'un, bir yaprak leke patojeni olan *Septoria obesa*'ya karşı dayanıklılığını artırmaya yönelik *in vitro* mutasyon seçim tekniğine dayanmaktadır. Yaprak eksplantında 10.0 mg/l kinetin ve 1.0 mg/l NAA ile desteklenmiş MS ortamında kallus oluşumu uyarılmıştır. Optimal gama dozu ve patojen kültürü yüzdesi, kallusların hayatta kalmasına göre standardize edilmiştir. Gama ışınlamasının optimal dozu 20 Gy, patojen kültürü ise %15 olarak tespit edilmiştir. Dirençli hatların seçimi %15 kültür filtratı konsantrasyonunda yapılmıştır ve kalluslar dirençli hücre hatlarını elde etmek için iki ek seçim döngüsüne daha tabi tutulmuşlardır (30 günlük döngü). Rejenere olan bitkilerin %100'ü serada saksıda patojene karşı dirençli olduğu belirlenmiştir. Bitkilerin, mantar spor süspansiyonunun düzenli olarak inokülasyonu ile dört yıl boyunca herhangi bir belirti göstermeden korunduğu ve dirençli bitkilerde fenotipik farklılık gözlenmediği bildirilmiştir.

Kore'de kasımpatı, güllerden sonra en popüler kesme çiçektir ve kullanımlarına göre spre ve standart tipler olmak üzere iki ana gruba ayrılabilir. Standart tip kasımpatılar genellikle taziye amaçlı kullanılır ve bu türün önemli özellikleri arasında dallanma olmaması ve uzun çiçeklenme dönemi yer alır. Yapılan çalışmada, orijinal çeşit ile gama ışınına maruz bırakılan *in vitro* bitkiler arasındaki polimorfizm, genetik çeşitlilik ve genetik mesafeleri, çoğaltılmış parça uzunluğu polimorfizmi (AFLP) markörleri kullanılarak belirlenmiştir. 'Migok' adlı standart tip çiçekten alınan *in vitro* eksplantlar, sırasıyla 0, 30, 50, 70 ve 100 Gy

dozlarında gama ışınına maruz bırakılmış ve elde edilen genetik varyasyonlar, konvansiyonel kesimlerden elde edilen bitkilerden daha çeşitli olmuştur. 12 primer kombinasyonu kullanılarak polimorfizmlerin %83'ü (866 bant) tespit edilmiştir ve en yüksek polimorfizm, 30 Gy ışınlama uygulamasında elde edilen bitkilerde M-CAT/E-ACC kombinasyonu kullanılarak belirlenmiştir. Ayrıca, genetik çeşitlilik ve polimorfik bilgi içeriği değeri, *in vitro* popülasyonun 30 Gy ışınlamasında en yüksek, genetik mesafe ise 30 Gy ışınlanmış popülasyon ile diğer popülasyonlar arasında en uzak olduğu saptanmıştır. Bu nedenle, standart tip Migok'ta *in vitro* genetik varyasyonların uyarımı için en etkili doz 30 Gy olarak belirlenmiştir (Kang et al., 2013).

Soliman et al. (2014) tarafından kasımpatıda *in vitro* mutasyon indüksiyonunun radyasyonun etkisi araştırılmıştır. Beyaz dilsî çiçeklere sahip kasımpatı (*Chrysanthemum morifolium* Ramat cv. Youka) çeşidinde mutasyon uyarımı için gama ışınları kullanılmıştır. Dilsî çiçeklerden uyarılan kalluslar 0, 10, 15 ve 20 Gy dozunda gama ışınlarıyla ışınlanıp rejenere olan bitkiler, seraya dikildikten sonra yaklaşık 70 gün gözlenmiştir. Mutantların kontrol bitkilerinden yaprak sayısı, yaprak uzunluğu ve genişliği, çiçek sayısı, çiçek çapı, sap çapı ve sap uzunluğu gibi özellikler bakımından farklılıklar gösterdiği saptanmıştır. 15 Gy ile ışınlanan bitkilerde üç farklı çiçek rengi ve şekli mutanıtı tespit edilmiştir. İlk tip mutant (M.1) tubuler taç yapraklara, ikinci (M.2) ve üçüncü (M.3) mutantların ikisinin de sarı çiçeklere sahip olduğu belirlenmiştir. Ancak bunlardan biri orijinal çeşide benzer şekilde kaşık şeklinde taç yapraklara, diğerinin ise düz şekilli taç yapraklara sahip olduğu görülmüştür. Yarı nicel RT-PCR, orijinal 'Youka' ve mutantlarının (M₂ ve M₃) taç yapraklarında, violaxanthin deepoxidase (VDE) ve lycopene e-cyclase (LCYE) dışındaki çoğu karotenoid biyosentezi ile ilgili genlerin benzerlik gösterdiği saptanmıştır. Sarı mutantlar, vegetatif olarak çoğaltılarak, bir sonraki nesilde de aynı özellikleri korumuştur. Sonuç olarak, 15 Gy dozunda gama ışınlamasının Youka kasımpatı çeşidinde *in vitro* olarak çiçek renk ve şekil mutasyonlarının uyarımı için kullanılabileceği belirtilmiştir.

Kasımpatı mutasyonla ıslahında, dilsî çiçeklerden adventif sürgünlerin *in vitro* rejenerasyonu, kimeraların ayrılmasına ve sonuç olarak yeni bir orijinal çeşidin üretilmesine yol açabilmektedir. Bu yöntemin başarısı büyük ölçüde oluşan

sürgünlerin sayısına bağlıdır. Ne kadar çok sürgün eldesi sağlanırsa, yeni bir çeşit yaratma şansı o kadar artar. Yürütülen bir çalışmada, çiçek açma gelişim aşamasının, eksplantın türünün ve eksplantın kültür ortamına dikim şeklinin adventif sürgünlerin oluşumu üzerine etkileri incelenmiştir. *Chrysanthemum* × *grandiflorum* (Ramat.) Kitam. "Cool Time"ın dilsî çiçekleri. 2.0 mg/l BAP ve 0.5 mg/l NAA ile desteklenmiş MS ortamında kültüre alınmıştır. Çiçek açma gelişim aşamasının (kısmen görünür bir diski olan açık olmayan veya tüpsü çiçeklerin polen üretmediği tamamen açık veya tüpsü çiçeklerin yarısının veya iki tam turun açık olduğu tamamen açık) sürgün rejenerasyon verimine önemli bir etkisi olmadığı belirlenmiştir. En fazla sürgünün, enine veya uzunlamasına kesilmiş dilsî çiçeklerde yatay olarak besin ortamına yerleştirilmiş, alt eksen tarafı ortam üzerinde olacak şekilde kültüre alınan eksplantlarda gerçekleşmiştir (Tymoszuk and Zalewska, 2014a). Aynı araştırmacıların yaptığı bir başka çalışmada yine *Chrysanthemum* × *grandiflorum* (Ramat.) Kitam. 'Cool Time' çeşidinde, dilsî çiçeklerde *in vitro* rejenere olan sürgünlerin sayısı ve uzunluğuna etkisi olan çeşitli faktörler irdelenmiştir. Dilsî çiçekler, sitokinin (0; 4.44; 8.88; 13.32; 22.20 $\mu\text{M} \cdot \text{dm}^{-3}$ BAP; 4.65; 23.23; 46.47; 69.70 $\mu\text{M} \cdot \text{dm}^{-3}$ kinetin) ve oksin (0; 0.54; 1.08; 1.61; 2.69 $\mu\text{M} \cdot \text{dm}^{-3}$ NAA) ile güçlendirilmiş MS ortamında kültüre alınmıştır. En çok sürgün 8.88; 13.32 $\mu\text{M} \cdot \text{dm}^{-3}$ BAP veya 69.70 $\mu\text{M} \cdot \text{dm}^{-3}$ kinetin ve 2.69 $\mu\text{M} \cdot \text{dm}^{-3}$ NAA veya 8.88 $\mu\text{M} \cdot \text{dm}^{-3}$ BAP ve 1.61 $\mu\text{M} \cdot \text{dm}^{-3}$ NAA ile desteklenmiş MS besin ortamında gözlenmiştir. 8.88 $\mu\text{M} \cdot \text{dm}^{-3}$ BAP ve 2.69 $\mu\text{M} \cdot \text{dm}^{-3}$ NAA içeren MS ortamına 0.29; 1.44 veya 2.89 $\mu\text{M} \cdot \text{dm}^{-3}$ GA₃ ilavesi, sürgün rejenerasyon verimliliğini sınırlar ve uzamayı teşvik etmez. Sürgün sayısı ve uzunluğundaki artış, 8.88 $\mu\text{M} \cdot \text{dm}^{-3}$ BAP ve 2.69 $\mu\text{M} \cdot \text{dm}^{-3}$ NAA içeren MS ortamında rejenerasyon gösteren dilsî çiçeklerin, 2.89 $\mu\text{M} \cdot \text{dm}^{-3}$ GA₃ ve 2.69 $\mu\text{M} \cdot \text{dm}^{-3}$ NAA içeren ortama aktarılmasıyla sağlanmıştır. 8.88 $\mu\text{M} \cdot \text{dm}^{-3}$ BAP ve 2.69 $\mu\text{M} \cdot \text{dm}^{-3}$ NAA ilaveli katı veya sıvı MS ortamında kültüre alınan dilsî çiçeklerde rejenerasyon gösteren sürgünlerin sayısında ve uzunluğunda farklılıklar görülmemiştir. Rejenerasyon gösteren dilsî çiçeklerin katı ortamdaki sıvı ortama aktarılması, rejenerasyon sürgünlerinin sayısını arttırıp uzamasını uyarmasına rağmen, bu sürgünlerin şekilsiz olduğu tespit edilmiştir (Tymoszuk and Zalewska, 2014b).

Sadhukhan et al. (2015) tarafından yürütülen çalışmada kasımpatının üç farklı çeşidinin (BC-8-05, Winter Queen ve Bidhan Shova) köksüz çelikleri farklı düzeylerde gama ışınlamasına (0, 10, 15, 20, 25 ve 30 Gy) tabi tutularak köklendirme potansiyeli araştırılmıştır. Birçok durumda kök sayısı ve kök uzunluğu, kontrol grubuna kıyasla 10 Gy' de önemli ölçüde arttığı, ancak dozun daha da artmasıyla uzunluğun azaldığı ve kötü morfolojik görünüme neden olduğu bildirilmiştir. Radyasyon dozlarının artması ayrıca kök oluşumu süresinin gecikmesine ve hayatta kalma yüzdesinin azalmasına neden olduğu belirtilmiştir. Köksüz çelikler açısından LD değerlerinde çeşitler arası farklılık bulunmuş ve köklü çeliklere kıyasla daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Winter Queen'in köksüz çelikleri için en yüksek LD değeri (20.1 Gy) kaydedilirken, köklü çeliklerde Bidhan Shova'da en düşük olduğu bulunmuştur (10.2 Gy).

Tarım Genetik Enstitüsü tarafından seçilip geliştirilen CN93, CN01, CN98 ve CN20 adlı dört adet kasımpatı çeşidinde, mevcut pazarın gereksinimlerine uygun olarak, orijinal çeşitlerin morfolojisini değiştirmek ve uzun süredir yetiştirilmesinden kaynaklı kısıtlamaları aşmak için mutasyon ıslahı çalışmaları yürütülmüştür. Çeşitlerin kalluslarına 0, 5, 10, 20 ve 30 Gy dozlarında gama ışını (Co^{60}) uygulanmıştır. İlk sonuçları değerlendirmek için, daha kısa gövde, kısaltılmış büyüme süreci, daha küçük yaprak açısı, çiçek renginin değişimi, daha büyük çiçekler ve daha geniş çiçek sapı kalınlığı gibi morfolojik özelliklere sahip 110 mutant hattı elde edilmiştir. 110 mutant hat orijinal çeşitlerle karşılaştırılarak tarla koşullarında gözlemlenmiş ve değerlendirilmiştir. 13 umut vadeden hat geliştirilmek üzere seçilmiştir (Thao, 2015).

Kim et al. (2016), gama ışınlarının mutasyon ıslahında yeni çeşitler geliştirmek için kullanışlı olduğunu, toplam doz ve doz hızının önemli olduğunu belirtmişlerdir. 'Noble Wine' ve 'Pinky' olmak üzere iki çeşitte doz hızının etkisi test edilmiştir. Işınlamadan dört hafta sonra, 30 Gy/1 saat doz hızında hayatta kalma oranı ve bitki boyunun önemli ölçüde azaldığı, her iki çeşitte de 30 Gy/4 saat doz hızının en yüksek mutasyon sıklığını ürettiği ve geniş bir mutasyon spektrumu sağladığı bildirilmiştir. Ayrıca sukrozun, antosiyanin biyosentezinin uyarıcı etkisinden dolayı, antosiyaninle ilişkili çiçek rengi mutasyonlarının uyarımı için, 4 haftalık bitkilerin ışınlamadan önce 100, 200 ve 300 mM sukroz ile ön işlem

gördüğü belirtilmiştir. 'Pinky' çeşidi tüm uygulamalarda yüksek bir hayatta kalma oranı gösterirken, 'Noble Wine' çeşidinin 200 ve 300 mM sukroz ile işlem gören örneklerde neredeyse tüm bitkilerinin öldüğü saptanmıştır. 'Noble Wine' çeşidinde 100 mM sukroz + 30 Gy/24 saat ışınlama ile birçok mutasyona uğramış dal tespit edilmiştir. Bu şekilde, uygun bir gama ışını doz hızı ve sukroz ön işleminin kasımpatı bitkisinde çiçek renk mutasyonunu uyurabileceği bildirilmiştir.

Mutasyona uğramış dokunun izolasyonu ve saflaştırılması, geleneksel yöntemlerle her zaman mümkün değildir ve bu durum değerli mutantların tamamen kaybolmasıyla sonuçlanabilmektedir. Kumar et al. (2017) tarafından yapılan bir çalışmada *Chrysanthemum morifolium* cv. Lalit (beyaz) türünde spontan olarak ortaya çıkan sarı çiçekli bir kimeranın izole edilmesi, saflaştırılması ve yeni bir mutantın oluşturulması için bir dils çiçek rejenerasyon protokolü geliştirilmesi amaçlanmıştır. Dils çiçeklerinin MS besin maddeleri içeren BAP (4.0 mg/l) ve NAA (1.0 mg/l) ile desteklenen bir ortamda kültüre alınması sonucu, en kısa sürede (6.6 gün), en iyi kallus oluşumu (%90.28) ve en yüksek canlılık oranı (%82.0) elde edilmiştir. Dils çiçeklerden maksimum mikro sürgün rejenerasyonu (%80.0), BAP (4.0 mg/l), NAA (0.5 mg/l) ve GA₃ (0.1 mg/l) ile desteklenen MS ortamında gözlenmiştir. BAP (4.0 mg/l) + NAA (0.5 mg/l) + GA₃ (0.1 mg/l) ile desteklenen MS ortamı, mikro sürgünlerin çoğaltımı (%92.0) için en uygun ortam olduğu belirlenmiştir. Mikro sürgünlerin en yüksek köklendirme oranı (%86.0) yarım güçlü MS ortamında 0.5 mg/l NAA ve 50 g/l sakkaroz ilavesi ile sağlanmıştır. Aklimatizasyon sürecinin ardından bitkiler başarıyla dış koşullara aktarılmış ve Lalit çeşidi ile karşılaştırılmıştır. *In vitro* koşullardan çıkan bitkilerin çiçeklerinin, beyaz çiçekli orijinal Lalit çeşidine kıyasla parlak sarı renkte olduğu belirlenmiştir.

Chrysanthemum morifolium'un direkt ve indirekt olarak sürgün rejenerasyonu veya somatik embriyogenez için yaprak ve çiçek dokularının kullanımı, mutasyon ıslahı programları ve genetik transformasyon çalışmaları için büyük önem taşımaktadır. Sitokinin ve oksin hormonları sürgün rejenerasyonunda ve kallus oluşumunda etkilidir. Kallustan sürgün rejenerasyonu yeteneği, başarılı bir bitki kültür sistemi kurmak için ve *in vitro* mutasyon çalışmaları için önemlidir (Nasri et al., 2018).

Beyaz çiçekli bir kasımpatı çeşidi olan “Bacardi”de yapılan çalışmada gama ışınlanması ile varyasyon yaratmak ve mutasyon ıslahı ile bitki özelliklerini geliştirmek amaçlanmıştır. Etkin Mutasyon Dozunu belirlemek için *in vitro* çelikler gama (Co^{60}) kaynağı ile 0, 5, 10, 15, 20, 25 ve 30 Gy olmak üzere 7 farklı dozda ışınlanmıştır. Her dozda, 30 genç bitki olmak üzere 150 tomurcuk ışınlanmıştır. Işınlamadan sonra alt kültüre alınan bitkilerin rejenerasyonun 60. gününde sürgün ve kök uzunlukları ölçülmüştür. Lineer regresyon analizi sonucu EMD_{50} 20 Gy olarak ile hesaplanmıştır. Ana populasyonu oluşturmak için 3000 *in vitro* bitkicik 20 Gy ile ışınlanmıştır ve *in vitro* alt kültürlerle M_1V_4 dönemine kadar devam edilmiştir. Bitkilerin yaprak ve çiçeklerinde farklı çiçek yapıları, çiçeklenme zamanı, bitki boyunda farklılaşma, kimerik yapraklar, demet başına çiçek sayısı ve ışın çiçeği farklılaşması Işın çiçeklerinin değişimleri; pembe renk, pembe şeritler ve uzunluk değişiklikleri gibi farklılıklar tespit edilmiştir (Haspolat et al., 2019).

“Gul-e-Sahir” çeşidinin terminal köklü çeliklerinin kullanıldığı çalışmada farklı dozlarda gama ışınlarının etkinliği araştırılmıştır. Köklenen çelikler, Co^{60} kaynağı kullanılarak farklı dozlarda gama ışınlarına (0, 10, 20 veya 30 Gy) maruz bırakılıp ve saksılara dikilmiştir. Mutasyona uğramış bitkiler ve kontrol bitkileri arasında yaprak rengi, yaprak şekli, çiçek boyutu, çiçek şekli ve çiçek renginde belirgin farklılıklar tespit edilmiştir. Orijinal çiçek renginden farklı, yeni çiçek renklerine sahip dört varyant izole edilmiştir. Gul-e-Sahir’in orijinal çiçek rengi sarı iken, mutasyona uğramış populasyonun çiçek rengi RHS renk skalasına göre yeşil sarı grubun en yakın tonları olduğu gözlenmiştir. Kontrol grubunda dils çiçekler normal iken, mutasyona uğramış populasyonda dils çiçekler spoon şeklinde, dar, geniş, yassı ve boru şeklinde değişim göstermiştir. Bu mutantlar büyük miktarlarda çoğaltılıp, stabiliteelerini kontrol etmek için değerlendirilmiştir (Singh and Bala, 2019).

Susila et al.’ a (2019) göre kasımpatıda üstün çeşitlere ulaşmanın yollarından biri, morfolojik çeşitliliği artıran gama ışını mutasyon uyarımını kullanmaktır. Araştırmacıların yapmış oldukları çalışmanın amacı, gama ışınlanması sonucunda elde edilen kasımpatı bitkilerinde meydana gelen varyasyonu, morfolojik belirteçler aracılığıyla belirlemektir. 0 Gy (kontrol), 10 Gy, 15 Gy ve 20 Gy dozları kullanılarak yapılan araştırmanın sonuçları, gama ışını dozunun artırmanın bitki

büyümesini engellediğini göstermiştir. 10 Gy ve 20 Gy ışınlaması, diğer dozlara kıyasla çiçeklerde en fazla renk değişimine neden olan dozlar olduğu, kontrolün temel rengi mor iken, 10 Gy ve 20 Gy ışınlaması koyu mor ve koyu kırmızı çiçek renklerini verdiği bildirilmiştir. Yapılan nicel gözlemlerde gama ışını uygulamasının yaprak uzunluğu, yaprak genişliği, çiçek sapı kalınlığı, gövde uzunluğu ve çiçek çapı üzerinde önemli bir etkisi olduğu ortaya konulmuştur. Işınlanmanın ayrıca yaprakların şekil ve dokusunda değişikliklere neden olduğu, 20 Gy ışınlamasının kontrol, 10 Gy ve 15 Gy'ye kıyasla en fazla çeşitliliğe sebep olan doz olduğu belirtilmiştir.

Yedi çeşit kasımpatı yaprağı eksplantı, kallus eldesi için 2.0 mg/l 2,4D ve 1.0 mg/l kinetin ile desteklenmiş MS ortamında kültüre alınmıştır ve 1.0 mg/l BA ve 0.1 mg/l NAA ile desteklenmiş MS ortamında sürgün başlangıcı için rejenere edilmiştir. *In vitro* bitkicikler 0, 20, 40, 60, 80 ve 100 Gy olmak üzere 6 farklı gama dozu ile ışınlanmıştır. Mutagen uygulamasından sonra hayatta kalan bitkiler seçilerek, sürgün ve kök gelişimleri tamamlanana kadar *in vitro* kültürde tutulmuştur. Aklimatizasyonu tamamlanan bitkilerin serada saksılara dikimleri yapılmıştır. Seradaki D23 ve D27 numaralı kasımpatılarda, 16 haftanın ardından çiçeklenme olmamış ve yavaş büyümüşlerdir. Serada yapılan gözlemlerde mutant bitkiler saptanmıştır. Ebeveyn hatları pembe turuncu olan ve 20 Gy ile ışınlanan 12-10 numaralı kasımpatı petallerinin değişim göstererek tamamen pembeye döndüğü tespit edilmiştir. 11-4 numaralı bitkinin çiçekleri pembe-turuncu ebeveyn hat ile karşılaştırıldığında sarı taç yaprağında azalma ve 11-8 numaralı bitkinin çiçekleri, pembe-turuncu ebeveyn hat ile karşılaştırıldığında çiçek ortasındaki sarı petallerde artış olduğu gözlenmiştir. M07-4 numaralı bitkide ise mutasyon sonucu fazla sayıda petal oluştuğu bildirilmiştir (Puripunyavanich et al., 2019).

Din et al. 'a (2020) göre çiçek rengi, kasımpatı (*Dendranthema grandiflorum* kitam.) çeşitlerinin ticari değerini etkileyen önemli bir özelliktir. Kasımpatı ıslahında kazandırılmak istenen özelliğin, örneğin yeni çiçek renkleri gibi zaman ve maliyet açısından etkili bir şekilde geliştirilmesi, yetiştiricilerin nihai hedefidir. Çiçek pigmentasyonunu düzenleyen moleküler mekanizmaların anlaşılması, çiçek renginin mantıklı bir şekilde düzenlenmesi için önemli ipuçları sağlayabilir. Araştırmacıların "Candid" kasımpatı çeşidinde yaptıkları çalışmada çeşitli çiçek

renk mutasyonlarının oluşturulması için *in vitro* yetiştirilen mikro sürgünler, 100 Gy/dakika hızında 10 Gy, 20 Gy, 30 Gy ve 40 Gy gama ışınlamasına maruz bırakılmıştır ve farklı parametreler açısından değerlendirilmiştir. Köklenme parametreleri, 0 Gy'den 40 Gy'ye ışınlama dozunun artmasıyla azaldığı, ancak 10 Gy dozunun kontrol grubuna kıyasla minimum düşüş kaydettiği görülmüştür. Hayatta kalma, yaprak boyutu ve sekizinci hafta aralığından sonra bitki başına yaprak sayısı da gama ışınlaması dozunun artmasıyla azaldığı, ancak kontrol grubuna kıyasla 10 Gy gama ışınlaması dozundan geliştirilen bitkilerde minimum düşüş olduğu kaydedilmiştir. En fazla çiçek renk mutasyon sayısı 10 Gy altında (açık pembe, turuncu pembe, beyaz ve sarı) tespit edilmiştir. Çiçek rengine dayalı olarak hesaplanan mutasyon sıklığı, en az 10 Gy dozunda ışınlanan bitkilerde istenen düzeyde çıktığı bildirilmiştir.

Setia et al. (2020) tarafından beyaz çiçek renkli Thiching Queen ve turuncu çiçek renkli Purnima kasımpatı çeşitlerine radyasyon uygulanarak, radyasyona maruz kalan populasyonlardan çiçek rengi ve çiçeklenme formunda yenilik tespit edilen tipleri tanımlamak ve izole etmek amacıyla bir çalışma yürütülmüştür. İki standart tip kasımpatı çeşidi olan Thiching Queen ve Purnima, köklü çelik uçları, γ -ışınlarına (0, 5, 10, 15 ve 20 Gy) farklı dozlarda maruz bırakılmıştır. Radyasyona maruz kalan mutant populasyon, diğer radyasyona maruz kalmamış (kontrol) bitkilere kıyasla çeşitli bitkisel ve çiçeklenme karakterlerinde olası değişiklikler açısından değerlendirilmiştir. Thiching Queen *Chrysanthemum* çeşidinde radyasyona maruz kalan populasyonlardan ticari açıdan arzu edilen yedi ve Purnima'da ise iki çiçek rengi varyantı izole edilmiştir. İzole edilen çiçek renginde varyasyon gösteren mutant populasyonlarda yaprak anormallikleri, yaprak şekli ve boyutunda değişimler gözlenmiştir. Bazı çiçek anormallikleri de artan γ -ışını dozunun artmasıyla ilerlemiş olarak tespit edilmiştir. Sonuç olarak köklenmiş çelikler 10 Gy veya 15 Gy dozda maruz bırakıldığında, bu çeşitlerdeki yeni çiçek rengi varyantlarının uyarılmasında etkili olduğu bildirilmiştir.

Wang et al. (2020), 'Donglinruixue' kasımpatı çeşidi üzerinde gama ışınlarının ölüm oranı, morfolojik özellikler ve meiotik anormallikler üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Ayrıca, DNA polimorfizmini belirlemek için basit dizi tekrarları (ISSR) markörleri kullanılmıştır. Sonuçlar, ölüm oranının radyasyon

dozuyla birlikte önemli ölçüde arttığını göstermiştir. Yarı ölümcül (LD₅₀) doz yaklaşık olarak 35 Gy olarak belirlenmiştir. Radyasyona maruz kalmayan kontrol grubuna göre bitki büyümesi önemli ölçüde inhibe edilmiştir. Işınlama sonrasında, ışınlanmış bitkilerde bir dizi morfolojik varyasyon ve sitolojik sapmalar meydana gelmiştir. Varyasyon frekansındaki tepe noktası 35 Gy'de ortaya çıkmıştır. ISSR analizi toplamda 72 sayılabilir bant üretmiş ve bunların 64'ü (%88.89) polimorfik olmuştur. Bu çalışma, gama ışınlamanın yeterli sayıda uyarılmış mutasyonu oluşturduğunu ve ISSR analizinin mutasyonların tanımlanmasında kullanışlı bir moleküler işaretleyici analizi sunduğunu göstermektedir.

Gama ışınıyla birlikte farklı fiziksel ışınlama kaynakları da pek çok çalışmada araştırılmıştır. Bu çalışmalar aşağıdaki sunulmuştur.

Chrysanthemum morifolium RAM'ın yaprak eksplantları üzerinde yapılan deneylerde, *in vivo* adventif tomurcuk oluşumunu kontrol eden faktörleri incelemek amacıyla, X-ışınlarıyla 500 rad dozunda ışınlanmış yapraklardan adventif sürgünler rejenere edilmiştir. Çalışmanın en önemli ancak dezavantajlı sonucu, çoğunlukla adventif sürgünlerin kimeral bir yapıya sahip olması ve açıkça birden fazla hücreden gelişmesi olduğudur. Adventif tomurcuk tekniği farklı eksplant tipleri kullanılarak araştırılmıştır. Pedisel segmentleri, adventif sürgünlerin en fazla sayıda rejenere olduğu eksplant olmuştur. Ayrıca genç çiçek veya yapraklarla karşılaştırıldığında daha hızlı geliştiği görülmüştür. Farklı eksplantlarla ışınlama sonucu üretilen mutasyonların kimerik olmadığı bildirilmiştir. Ayrıca, histolojik gözlemler, adventif sürgün apekslerinin başlatılmasında tek epidermal hücrelerin yer aldığını göstermektedir. Mutant populasyon oluşturmak üzere optimum doz yaklaşık 800 rad X-ışını olarak belirlenmiştir (Broertjes et al., 1976).

Bydgoszcz'daki Teknoloji ve Tarım Akademisi Süs Bitkileri Laboratuvarı'nda, X-ışınları ve gama ışınları kullanılarak yaprak eksplantlarında *in vitro* mutasyon ıslahı çalışmaları yürütülmüş ve adventif sürgünlerin geliştirilmesi için yöntem geliştirilmiştir. X-ışınları ve gama ışınları, sırasıyla 0.92 Gy/dk ve 1.92 Gy/dk doz hızlarıyla 5 ila 25 Gy dozlarında uygulanmıştır. Işınlanan kasımpatı yaprakları adventif sürgün üretimi için, 2.0 mg/l IAA ve 0.6 mg/l BA içeren MS ortamında kültüre alınmıştır. Rejenere olan bitkilerin çiçeklerinde renk, boyut ve

şekil değişiklikleri gözlemlenmiştir. Mutasyonlar ayrıca yaprak morfolojisinde ve bazen tüm bitkilerin şeklinde değişikliklerle birlikte görülmüştür, istenmeyen meriklinal veya sektöriyel kimeralar gözlenmemiştir. Bu durum aynı zamanda adventif sürgünlerin genellikle yaprak sapının tek bir hücrelerinden geliştiğini göstermektedir. Böylece geliştirilen yeni bitki genetik olarak homojen dokulardan oluşmaktadır. *Dendranthema grandiflora*'nın 12 yeni çeşidinin elde edilebilmesi, bu tekniğin etkinliğini kanıtlamıştır. Bunlardan altısı 1993 yılında Polonya Çeşit Kaydı'na girmiştir. 'Lady Antee' (altın sarısı), 'Lady Bronze' (kahverengimsi kahverengi), 'Lady Rosy' (krem pembesi) X-ışınları ile 15 Gy ışınlanarak elde edilmiştir. 'Lady Pink' (pembe), 'Lady Salmon' ve 'Lady Yellow' ise 15 Gy gama ışınları uygulanarak elde edilmiştir. İki çeşit, 'Bronze Wonder' ve 'Red Wonder', menekşe pembesi 'Lilac Wonder' yaprak eksplantlarının 15 Gy gama ışınları ile işlenmesi sonucunda elde edilmiştir (Jerzy and Zalewska, 1996).

Matsumura et al. (2010), iyon ışını radyasyonunun, süs bitkileri ıslahında yeni çeşitleri geliştirmek için mutasyon ıslahında kullanılan yöntemlerden biri olduğunu bildirmişlerdir. Yapılan çalışmada iki kasımpatı çeşidinin ('Shiroyamate' ve 'H13') dilsî çiçekleri ve yaprak eksplantları, MS ortamında kültüre alınmış ve $^{12}\text{C}^{5+}$ iyon ışını ile 1, 2, 4 ve 8 Gy dozlarında ışınlanmıştır. 'Shiroyamate' çeşidinin ve 'H13' çeşidinin dilsî çiçek eksplantlarında sürgün oluşum sıklığı sırasıyla 8Gy ve 4Gy ışınlanmasıyla azalmıştır. İyon ışınının etkili dozu, 'Shiroyamate' için 4 Gy'den az, 'H13' için ise 2 Gy'den az olduğu tespit edilmiştir. Etkili bir iyon demeti dozuna maruz kaldıktan sonra rejenere olan bitkiler sera ve tarlada yetiştirilmiştir. 'Shiroyamate' çeşidinden sarı dilsî çiçek mutasyonları ve 'H13' çeşidinden çeşitli dilsî çiçek renk mutasyonları (koyu kırmızı, açık kırmızı, pembe, pembe sprej) ve bir çiçek şekli mutasyonu (çift-dilsî çiçekli) iyon demeti radyasyonu ile elde edilmiştir. Ayrıca, kimerik bir mutasyondan beyaz bir mutant elde edilmiştir. İyon demeti radyasyonu ve doku kültürünün birleşiminin yüksek verimlilikle mutasyonlar oluşturmak için etkili bir yöntem olduğu çalışma ekibi tarafından bildirilmiştir.

Salleh et al. (2012) tarafından *Chrysanthemum morifolium* cv. 'Reagan Red' in dilsî çiçekleri ve boğum eksplantlarında iyon ışını ile mutasyon oluşturma etkinliği araştırılmıştır. İyon ışınları, mutasyon ıslahı için yeni bir fiziksel mutagen

haline gelmiştir. Dilsî çiçekler ve boğum eksplantları 0, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 5.0, 8.0, 10, 15, 20 ve 30 Gy dozlarında iyon ışını ile ışınlanmıştır. Dilsî çiçek eksplantları için *in vitro* sürgün rejenerasyonunun %50'si (RD₅₀) 2.0 Gy iken; nodal eksplantlar için 4.0 Gy olarak tespit edildi. Bu nedenle, dilsî çiçekler için göreceli biyolojik etkinlik, boğum eksplantlardan 2.0 kat daha yüksek bulunmuştur. Rejenere olan bitkiler, MARDI, Cameron Highlands'taki sera alanına dikilmiş ve morfolojik tarama için değerlendirilmiştir. Çalışılan karakterler arasında bitki morfolojisi ve çiçeklenme özellikleri yer almıştır. Dilsî çiçek eksplantları, iyon ışınına daha duyarlı olduğu ve boğum eksplantlarına kıyasla daha fazla mutasyon oluşturduğu gözlenmiştir.

Yamaguchi'e (2018) göre zengin çiçek renklerine ve şekillerine sahip süs bitkileri, ticari çiçek pazarında büyük değer taşır ve bu nedenle büyüme alışkanlıklarını koruyarak farklı çiçek tipleri üreten mutant çeşitler talep edilir. Ayrıca, mutasyon ıslahı süs bitkileri için uygun bir yöntemdir çünkü birçok tür kolayca vegetatif olarak çoğaltılabilir, bu da spontane ve uyarılmış mutasyonların üretimini kolaylaştırır. İyon demetlerinin mutasyon ıslahında kullanımı, Japonya'da 1990'lardan bu yana hızla yayılmış ve daha fazla iyon demeti radyasyonuna özgü mutantların üretileceği beklentisi bulunmaktadır. Japonya'da şu anda bitki materyalleri için iyon demeti radyasyonu sağlayan dört ışınlama tesisi bulunmaktadır. Süs bitkileri kullanılarak iyon demetiyle mutant çeşitlerin geliştirilmesi şu ana kadar birçok türde denenmiş ve bazı türler mutagenез sürecini araştırmak için kullanılmıştır. Ayrıca, önemli özellikleri ifade etmek için genetik mekanizmanın açıklığa kavuşturulmasında ilerleme kaydedilmekte olup, bu da süs bitkileri için daha verimli mutasyon ıslah yöntemlerinin geliştirilmesine yol açabilir. Kasımpatıda iyon demeti radyasyonu ile pek çok çalışma yürütülmüştür (Asami et al. 2011; Furutani et al. 2008; Hisamura et al. 2016; Imakiire et al. 2006; Matsumura et al. 2010; Okada et al. 2010; Okamura et al. 2015; Sakamoto et al. 2016; Shirao et al. 2007; Suzuki et al. 2005; Tamaki et al. 2017; Tamari et al. 2017; Tanokashira et al. 2014; 2016; Wakita et al. 2008; Yamaguchi'den, 2018).

Miler and Kulus'a (2018) göre bitki hücrelerinin DNA'sı üzerinde mikrodalga etkisinin etkisi hala belirsizdir, ancak bu elektromanyetik radyasyonun mutasyon ıslahında bir varyasyon kaynağı olarak kullanılması çok avantajlı olabilir.

Araştırmacılar tarafından yürütülen çalışmada, mikrodalga radyasyonunun *in vitro* rejenerasyon ve aklimatizasyon verimliliği üzerindeki etkisini ve Alchemist' çeşidi üzerinde genetik ve fenotipik varyasyonun etkisini incelemek amaçlanmıştır. Farklı sürelerde ve farklı ortamlarda kallus ile ya da kallus olmadan yaprak eksplantlarına mikrodalga ışınları uygulanmıştır. Mikrodalgalar, 2.45 GHz frekansında, 800 W/cm² gücünde bir ev tipi manyetron tarafından sağlanmıştır. Uzun süreler uygulandığında, ışınlamanın sürgün oluşumunu olumsuz etkilediği bununla birlikte köklendirme ve aklimatizasyon çalışmalarında bir etkisi olmadığı bildirilmiştir. Mikrodalga ışınlarına maruz bırakılan eksplantlardan rejenere olan bitkilerde daha uzun sürgünler, daha büyük çaplı çiçek demetleri dikkat çekerken, fenotiplerinin de değiştiği saptanmıştır. Ayrıca, mikrodalga ışınlarının tomurcuk renklendirme dönemini uzatarak generatif evreyi etkilediği bildirilmiştir. Genetik varyasyonun değerlendirilmesi, RAPD tekniği kullanılarak yapılmıştır ve tüm rejenerasyon sürgünleri için 10 primer kullanılmış; toplamda 116 genotip analiz edilmiştir. Mikrodalga ile muamale edilen eksplantlardan rejenerasyonu gerçekleştiren bitkilerin yaklaşık %22'si, referans kontrolünden farklı bant profilleri gösterdiği belirtilirken, değişen bant profillerine sahip bitkilerin çoğunun (%86), ışınlanmış kallustan geldiği bildirilmiştir. Bu bitkiler aynı zamanda daha yüksek ortalama genetik uzaklık katsayısına sahip olduğu kaydedilmiştir. Sonuç olarak, mikrodalgaların *Chrysanthemum* 'Alchemist'in mutasyon ıslahında verimli ve kolay erişilebilir bir araç olarak değerlendirilebileceği belirtilmiştir. Jo and Kim'e (2019) göre, varyasyon frekansı birkaç parametreden etkilenir. En önemlileri ışınlama türü ve dozu, lineer enerji transferi ve ışınlanan doku türüdür. Son zamanlarda, ovaryumlar, mutant kasımpatı geliştirmek için pek çok araştırmacı tarafından çalışılmıştır (Miler and Muszczyk, 2015; Wang et al., 2014; Miler et al., 2021) ve radyasyon için kullanışlı eksplantlar olduğu bildirilmiştir. Kasımpatı mutasyon ıslahı için eksplant olarak kullanılacak ovaryumların, çiçek içinde yer almaları ve yüksek rejenerasyon yeteneğine sahip olmaları avantajlarıdır (Teixeira da Silva et al., 2015). İki kasımpatı çeşidi olan 'Profesor Jerzy' ve 'Karolina' çeşitlerinin yumurtalıklarının *in vitro* rejenerasyon kapasitesi, yüksek enerjili fotonlarla (toplam doz 5, 10 ve 15 Gy) ve yüksek enerjili elektronlarla (toplam doz 10 Gy) muamele edilerek araştırılmıştır. Rejenerasyon verimine genotipin etkisinin güçlü olduğu tespit edilmiştir. 'Karolina' çeşidi sadece 7 sağlıklı sürgün üretirken, 'Profesor Jerzy' toplamda 428 sürgün üretmiştir. Radyasyon dozunun artmasıyla rejenerasyon oranı

azalmış ve en az tepki gösterenler, 15 Gy yüksek enerjili fotonlarla ve 10 Gy yüksek enerjili elektronlarla radyasyona maruz kalan eksplantlar olmuştur. Bu eksplantlardan elde edilen 'Profesor Jerzy' rejenerantları daha kısa sap oluşturmuş ve daha geç çiçek açmıştır. En yüksek sayıda stabil renk ve şekil değişiklikleri, 10 Gy yüksek enerjili fotonlarla işlenen eksplantlardan elde edilmiştir. Çiçek kümelerindeki varyasyonlar çoğunlukla şekil değişiklikleri ile kendini göstermiştir. Yeni renk fenotipleri koyu sarı, açık sarı ve pembe olarak saptanmış olup, bunlardan sadece koyu sarı fenotipi ikinci yıl yetiştirme sürecinde stabil kaldığı belirtilmiştir (Miler et al., 2021).

Miler et al. (2020) tarafından yürütülen çalışmanın amacı kasımpatıda erken dönemde somaklonal varyantların tespiti ve/veya kimera bileşenlerinin ayrıştırılmasında DNA içeriği ölçümünün kullanışlı olup olamayacağını belirlemektir. 11 *Chrysanthemum × morifolium* (Ramat.) Hemsl. Lady grubu çeşidi (bir anne çeşit ve X-ışını veya γ -ışınlama ile elde edilen on mutant; stabil ve periklinal kimeralar) *in vitro* koşullarda çoğaltılmıştır. Tek boğum eksplantları, BBD bulunmayan veya BA ve IAA ile takviye edilmiş MS ortamında kültüre alınmıştır. Nükleer DNA içeriği, *in vitro* olarak üretilen sürgünlerde flow sitometri ile ölçülmüştür. Aklimatizasyonu sağlanan bitkiler çiçeklendirilerek takibi yapılmıştır. BBD'lerin MS ortamına eklenmesi, *in vitro* olarak çoğaltılan sürgünlerin ortalama sayısını neredeyse ikiye katlarken, tüm bitkilerde (Lady Apricot; periklinal kimera) veya bazı bitkilerde (Lady Amber; stabil mutant ve Lady Salmon; periklinal kimera) çiçeklenme renginde değişikliklere neden olduğu saptanmıştır. Tüm mutantların, ana çeşit "Richmond"dan daha az DNA içerdiği tespit edilmiştir. Lady Apricot ve Lady Salmon için BBD içeren ve içermeyen ortamlarda yetiştirilen bitkiler arasında DNA içeriği açısından önemli farklılıklar olduğu, ancak BBD içermeyen ortamda çoğaltılan kasımpatılarda orijinal çeşitlere göre fenotip değişikliği olmadığı, aksine BBD içeren ortamda, kimeraların orijinal renkten farklı çiçekler ürettiği bildirilmiştir. Lady Amber dışında tüm çeşitlerde (katı mutant Lady Amber) her iki ortamda yetiştirilen bitkiler arasında genom boyutunda farklılık olmaması, stabil bir çiçek rengi göstermesi sonuçlarıyla uyumlu olduğu belirtilmiştir. Lady Amber'de farklı çiçeklenme renklerine sahip bazı bitkilerin varlığı, Flow Sitometri ölçümleriyle tespit edilemeyen küçük DNA değişikliklerinden kaynaklanabileceği bildirilmiştir. Sonuç olarak, genç

bitkilerdeki DNA içeriğinin analizi, özellikle kimerik çeşitlerde, kasımpatıda çiçek renginin kararlılığını ve mutasyon tespitini belirlemede işaretleyici olabileceği kaydedilmiştir.

Kiranmayi et al.'a (2022) göre elektromanyetik ışınların mutagenik kapasitesi hala belirsizdir fakat mikrodalga ışınlarının bitki ıslahında kullanılması faydalı olabilir. Kasımpatı bitkisinin *in vitro* rejenerasyonu üzerinde mikrodalga ışınlarının etkisinin araştırıldığı çalışmada, kasımpatı çeşitleri olan Marigold (Sarı), New Man (Beyaz) ve Journey Dark'ın (Mor) *in vitro* yaprakları, eksplant kaynağı olarak kullanılmıştır. Yapraklar farklı mikrodalga ışınlanma sürelerine (0 saniye, 8 saniye, 16 saniye, 32 ve 48 saniye) maruz bırakıldıktan sonra 4.0 mg/l BAP + 1.0 mg/l NAA ile desteklenmiş MS ortamında kültüre alınmıştır. Gözlemler, farklı döngülerde, ışınlanma süresinin sıfırdan 48 saniyeye kadar artmasıyla birlikte, eksplantların canlılık oranlarının, kallus oluşturma yüzdesinin ve eksplant başına sürgün sayısı gibi parametrelerin azaldığını bildirmişlerdir.

Kimyasal mutagenler ile ilgili çalışmalar aşağıda sunulmuştur.

Kasımpatı 'Maghi' çeşidinin köklendirilmiş çelikleri, EMS ve DES'nin üç farklı konsantrasyonuna (%0.02, %0.03 ve %0.04) ve beş farklı dozda gama ışınlarına (0.5, 1.0, 1.5, 2.0 ve 2.5 kR) maruz bırakılarak, değişkenliği değerlendirmek için çeşitli parametrelerde (yaşama oranı, morfolojik ve çiçeklenme) kalıtsal etkileri araştırılmıştır. Kimyasal mutagenler ve daha yüksek dozda gama ışını uygulamasıyla birlikte yaşama oranında ve çeşitli morfolojik parametrelerde azalma kaydedilmiştir. Tüm mutagenik uygulamalar, çiçeklenmeyi 6 ila 7 gün kadar geciktirmişse de çiçeklenme süresinin önemli ölçüde azaldığı belirlenmiştir. Çiçek başı çapı (sırasıyla 3.44 ve 3.57 cm), yaprak (130.27 ve 132.60) ve tüpsü çiçeklerinin sayısı (sırasıyla 27.93 ve 26.33), 0.5 ve 1.0 kR gama ışınlarıyla önemli ölçüde artmıştır. Çiçek ağırlığı, çiçek sayısı ve bitki başına çiçek verimi, γ -ışınlarının en düşük dozunda en yüksek seviyede sağlanmıştır. Vegetatif ve çiçeksel karakterlerdeki anormallikler, EMS ve DES'ye kıyasla γ -ışınlarında daha yüksek olmuştur. 'Maghi' çeşidi, %0.03 EMS ve 1.0 kR gama ışınlarıyla yaprak dokusunda iki mutant bitki elde edilmiş ancak bu mutantların çiçeklenme yeteneklerini kaybettikleri bildirilmiştir (Kapadiya et al. 2014).

Ghormade et al. (2020) tarafından kasımpatı bitkisinde yapılan çalışmada uygulamalar faktör A ve faktör B olmak üzere 2 faktör üzerinden yürütülmüştür. Faktör A, 3 çeşidi (V1-Raja Pandharpuri, V2-Brown ve V3-Shinaton) içerirken, faktör B, farklı konsantrasyonlarda ve farklı kimyasallarla toplamda 10 farklı uygulama içermektedir (T1 - %0.01 kolhisin, T2 - %0.02 kolhisin, T3 - %0.03 kolhisin, T4 - EMS %0.01, T5 - %0.05 kolhisin, T6 - %0.1 kolhisin, T7 - %0.5 kolhisin, T8 - %1.0 kolhisin, T9 - %1.5 kolhisin, T10 - Kontrol) Kasımpatı çeliklerine kolhisin ve EMS ile yapılan farklı uygulamaların, bitkinin gövde ve çiçek özellikleri üzerinde anlamlı bir etkiye sahip olduğu ve çeşitlilik yarattığı saptanmıştır. Kasımpatı çeşitlerinin hem kolhisin hem de EMS ile muamele edilen fidelerinde bitki boyu, bitki başına dal sayısı, bitki yayılımı, ana çiçek sapı kalınlığı ve bitki başına yaprak sayısı açısından önemli bir azalma meydana geldiği, bununla birlikte yaprak alanı ve yaprak sapı uzunluğu, kolhisin ile muamele edilen popülasyonda artarken EMS ile muamele edilen grupta, kontrol bitkilerine göre azaldı tespit edilmiştir. Yüksek dozda kolhisin ve EMS uygulaması, çiçek tomurcuğu başlangıcını, çiçeklenme zamanının ve %50 çiçeklenmeyi geciktirdiği bildirilmiştir.

Purente et al.'a (2020) göre mutasyon ıslahı bitki ıslahında ekonomik ve etkili bir teknik olarak kabul edilir ve EMS gibi kimyasal mutagenlerin kullanımı bitki ıslahıyla ilgili zorluklara potansiyel olarak çözüm getirebilir. Yapılan çalışmanın amacı farklı dozlarda EMS ile *C. indicum* var. *aromaticum*'da morfolojik mutasyonların uyarımı ve elde edilen mutantların morfolojik ve fizyolojik özelliklerini analiz etmek ve olumlu mutantları yakalamaktır. Sonuçlar, EMS dozlarının tohum çimlenmesi üzerinde önemli etkileri olduğunu ortaya koymuştur. Çimlenme oranı EMS dozları arttıkça önemli ölçüde azalmıştır. Elde edilen morfolojik mutantlar yaprak ve gövde mutasyonlarını içeren iki yaşayabilir tip olmuştur. EMS uygulamalarının sonucunda genel yaprak boyutu önemli ölçüde artmıştır. Ayrıca mutant bitkilerin boyu önemli ölçüde daha uzun olduğu saptanmıştır. Mutant bitkilerin hem yapraklarında hem de gövdelerinde anatomik özelliklerde değişiklikler gözlenmiştir. Mutant bitkilerin bükülen gövdelerinin delme direnci düşük olup zayıf penetrasyon direncine sahiptir. EMS uygulamalarının sonucunda mutant bitkilerin gövdesindeki toplam lignin ve selüloz içeriği önemli ölçüde azalmıştır. Bu sonuçlar, *C. indicum* var. *aromaticum*'da

mutasyonların indüklenmesinde EMS'nin etkinliğini göstermektedir ve bu yöntem gelecekte bu bitkinin ıslahına yardımcı olabileceği bildirilmiştir.

Dört kasımpatı çeşidinde ('Homa', 'Fariba2', 'Arina' ve 'Delkash') mutasyon uyarımı amacıyla yaprak diskleri üzerine EMS'nin farklı dozları (0, 0.125, 0.25 ve 0.5%) kullanılarak yeni varyantlar elde edilmeye çalışılmıştır. Ayrıca, mutasyona uğramış bitkilerle ana bitkiler arasındaki genetik polimorfizm, ISSR ve IRAP moleküler işaretleyiciler kullanılarak tespit edilmiştir. *In vitro* koşullarda EMS ile uyarılmış mutasyon sonucunda toplamda 2082 bitki elde edilmiş, yaprak ve çiçek mutasyonları içeren toplam 58 mutant fenotipik ve moleküler varyasyon açısından analiz edilmiştir. Eksplantların hayatta kalma oranı EMS konsantrasyonunun artmasıyla azalmıştır. Dört kasımpatı çeşidinde geniş bir yaprak ve çiçek değişkenliği elde edilmiş ve bu durum EMS'nin genetik varyasyon ve istenen mutantların oluşturulmasında etkinliğini doğrulamıştır. Farklılık gösteren tüm varyantların çelikleme ile devamlılığı korunmuş ve bir sonraki nesilde aynı özellikleri göstermiştir. Mutantlar yaprak boyutu ve şekli, bitki yüksekliği, çiçeklenme zamanı, çiçek başı boyutu, çiçek yaprağı rengi ve çiçek yaprağı boyutu gibi özelliklerde farklılık göstermiştir. Kullanılan ISSR ve IRAP primerleri, kasımpatı mutantlarını çeşide göre ve bir ölçüde kullanılan EMS konsantrasyonuna göre sınıflandırabilmiş ve gerçek varyantların ayırt edilmesi için etkinliğini doğrulamıştır (Nasri et al., 2022).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Çalışmanın Yürütüldüğü Yer ve Yıl

Bitki doku kültürü çalışmaları Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'ne ait Biyoteknoloji Laboratuvarı - Bitki Doku Kültürü Laboratuvarında yürütülmüştür. *In vitro* Gama (Co^{60}) ışınlamaları Türkiye Enerji, Nükleer ve Maden Araştırmaları Kurumu (TENMAK)-Nükleer Enerji Araştırma Enstitüsü'nde (NÜKEN) yapılmıştır. Doku kültüründen çıkan bitkilerin dış koşullara alıştırılması Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü'ne ait iklim odası ve seralarda gerçekleştirilmiştir. Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü (ETAE), Bahçe Bitkileri Bölümü, Süs Bitkileri Şubesi arazisinde bitkilerin dikimleri gerçekleştirilmiştir. Bitkilerin üretici koşullarındaki gözlem ve seçimleri, süs bitkisi üreticisi Kemal Kuşkovan'a ait serada (Menderes/İzmir) yapılmıştır. Çalışma 2018-2023 yılları arasında yürütülmüştür.

3.2 Tez Çalışmasında Kullanılan Bitkisel Materyaller

Çalışmanın bitkisel materyalini *Chrysanthemum morifolium* L. türüne ait pembe renkli "Pusan" ve beyaz renkli "MW" çeşitleri oluşturmaktadır. Pembe renkli Pusan kasımpatı çeşidi orta kompakt bir yapı göstermektedir ve çiçek tipi yarı katmerlidir (half filled semi-double). Çiçek büyüklüğü 8 cm olup, tepki süresi 8 haftadır. Beyaz renkli MW kasımpatı çeşidi de orta kompakt yapıda olmakla birlikte çiçek tipi top (form of ball), çiçek büyüklüğü 13 cm ve tepki süresi 10 haftadır. Kasımpatı çeşitlerine ait görüntüler Şekil 3.1'de verilmiştir.



Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan kasımpatı çeşitlerine ait çiçekler, a) Pusan, b) MW (Brandkamp, 2021)

3.3 *In Vitro* Rejenerasyon Denemeleri

In vitro rejenerasyon protokollerinin geliştirilmesi amacıyla kasımpatı çeşitlerine ait yaprak, dilsî çiçek, boğum ve boğum arası eksplantları, farklı oksin (NAA, 2,4-D) ve sitokinin (BAP, kinetin) kombinasyonları ile desteklenmiş MS (Murashige and Skoog, 1962) (MS bazal ortamı, 30 g/l sakkaroz ve 7 g/l agar, pH:5.7-5.8) ortamında kültüre alınmışlardır (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. MS bazal besi ortamında bulunan makro-mikro elementler, vitaminler, aminoasitler, diğer maddeler ve konsantrasyonları (Murashige and Skoog, 1962)

Makro Elementler	mg/l
KNO ₃	1900
NH ₄ NO ₃	1650
MgSO ₄ .7H ₂ O	370
CaCl ₂	332.2
KH ₂ PO ₄	170
Mikro Elementler	mg/l
MnSO ₄ .H ₂ O	16.9
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6
H ₃ BO ₃	6.20
KI	0.83
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025
FeNaEDTA	36.72
Vitaminler ve aminoasitler	mg/l
Myo-inositol	100.0
Pyridoxine-HCl	50
Nicotinik Asit	50
Thiamin- HCL	10
Glycine	2.0
Diğer	g/l
Sakkaroz	30
Agar	3.5
pH	5.7

Deneme planı ve farklı BBD’li ortamların içerikleri Çizelge 3.2’de verilmiştir.

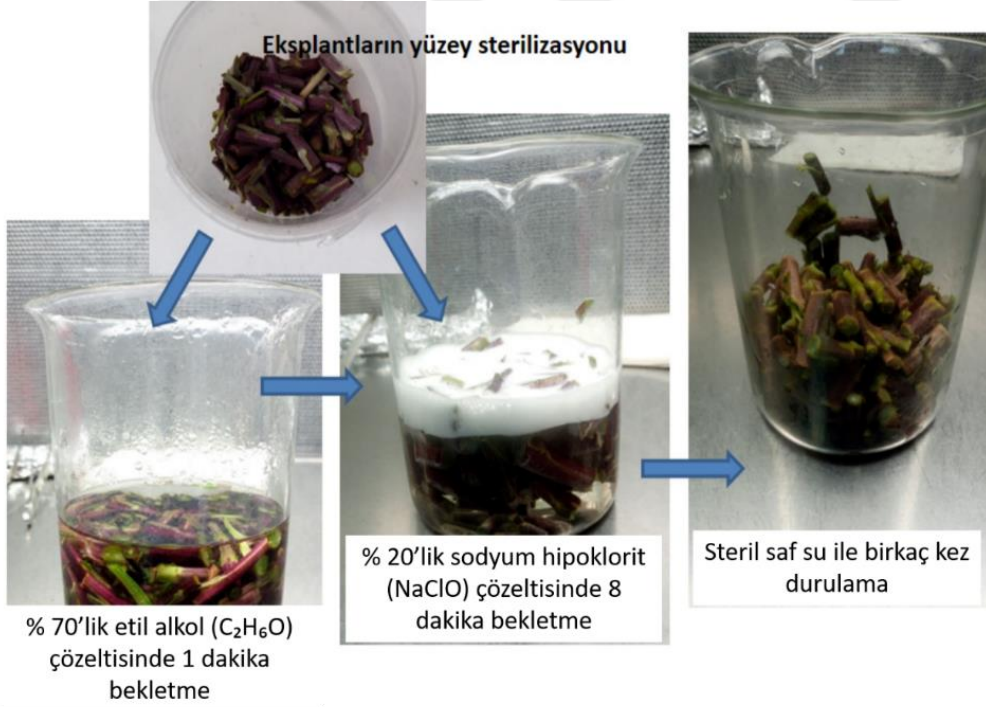
Çizelge 3.2. *In vitro* rejenerasyon deneme planı ve rejenerasyon ortamı içerikleri

		ÇEŞİTLER								
		MW				Pusan				
Ortam No	BBD	Yaprak	Dilsi Çiçek	Boğum	Boğum arası	Yaprak	Dilsi Çiçek	Boğum	Boğum arası	Toplam (adet)
1	1 mg/l Kinetin + 0.5 mg/l NAA	4 petri* 5 eksplant	4 petri* 5 eksplant	4 petri* 5 eksplant	4 petri* 5 eksplant	4 petri* 5 eksplant	4 petri* 5 eksplant	4 petri* 5 eksplant	4 petri* 5 eksplant	160
2	2 mg/l Kinetin + 0.5 mg/l NAA	4 petri* 5 eksplant	4 petri* 5 eksplant	4 petri* 5 eksplant	4 petri* 5 eksplant	4 petri* 5 eksplant	4 petri* 5 eksplant	4 petri* 5 eksplant	4 petri* 5 eksplant	160
3	1 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA	4 petri* 5 eksplant	4 petri* 5 eksplant	4 petri* 5 eksplant	4 petri* 5 eksplant	4 petri* 5 eksplant	4 petri* 5 eksplant	4 petri* 5 eksplant	4 petri* 5 eksplant	160
4	2 mg/L BAP + 0.5 mg/l NAA	4 petri* 5 eksplant	4 petri* 5 eksplant	4 petri* 5 eksplant	4 petri* 5 eksplant	4 petri* 5 eksplant	4 petri* 5 eksplant	4 petri* 5 eksplant	4 petri* 5 eksplant	160
5	1 mg/L 2,4-D + 1 mg/l BAP	4 petri* 5 eksplant	4 petri* 5 eksplant	4 petri* 5 eksplant	4 petri* 5 eksplant	4 petri* 5 eksplant	4 petri* 5 eksplant	4 petri* 5 eksplant	4 petri* 5 eksplant	160
6	2 mg/L 2,4-D + 1 mg/l BAP	4 petri* 5 eksplant	4 petri* 5 eksplant	4 petri* 5 eksplant	4 petri* 5 eksplant	4 petri* 5 eksplant	4 petri* 5 eksplant	4 petri* 5 eksplant	4 petri* 5 eksplant	160
7	1 mg/L 2,4-D + 1 mg/l Kin	4 petri* 5 eksplant	4 petri* 5 eksplant	4 petri* 5 eksplant	4 petri* 5 eksplant	4 petri* 5 eksplant	4 petri* 5 eksplant	4 petri* 5 eksplant	4 petri* 5 eksplant	160
8	2 mg/L 2,4-D + 1 mg/l Kin	4 petri* 5 eksplant	4 petri* 5 eksplant	4 petri* 5 eksplant	4 petri* 5 eksplant	4 petri* 5 eksplant	4 petri* 5 eksplant	4 petri* 5 eksplant	4 petri* 5 eksplant	160
9	1 mg/l 2,4-D	4 petri* 5 eksplant	4 petri* 5 eksplant	4 petri* 5 eksplant	4 petri* 5 eksplant	4 petri* 5 eksplant	4 petri* 5 eksplant	4 petri* 5 eksplant	4 petri* 5 eksplant	160
10	Kontrol	4 petri* 5 eksplant	4 petri* 5 eksplant	4 petri* 5 eksplant	4 petri* 5 eksplant	4 petri* 5 eksplant	4 petri* 5 eksplant	4 petri* 5 eksplant	4 petri* 5 eksplant	160
Kültüre Alınan Toplam Eksplant Sayısı (adet)		1600								

3.3.1 Eksplant hazırlığı ve sterilizasyonu

Yaprak, boğum ve boğum arası eksplantları genç ve sağlıklı bitkilerden alınarak laboratuvara getirilmiş ve sterilizasyonu sağlanmıştır. Sterilizasyon işlemi akan su altında 10 dakika bekletme, laminar hava akışlı kabin içerisinde steril saf su ile yıkama, %70'lik etil alkol (C_2H_6O) çözeltisinde 1 dakika bekletme ve %20'lik sodyum hipoklorit ($NaClO$) (Domestos®) çözeltisinde 8 dakika bekletip birkaç kez steril saf su ile yıkama şeklinde gerçekleştirilmiştir.

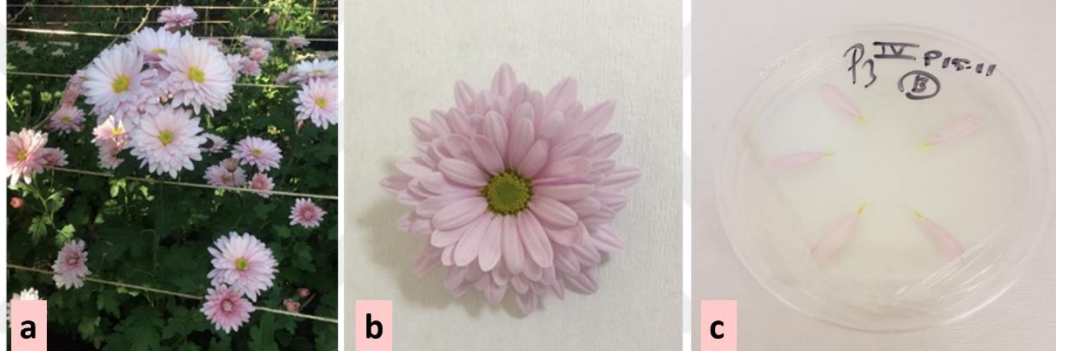
Dilsî çiçek eksplantları, çiçeklenme dönemindeki bitkilerden laboratuvara getirilerek kültüre alınmıştır. Sterilizasyon öncesi akan su altında 10 dakika bekletilerek dış kirlerinden temizlenmiştir. Laminar hava akışlı kabine getirilen dilsî çiçekler steril saf su ile yıkandıktan sonra yüzey sterilizasyonu için %70'lik etil alkol çözeltisinde 30 saniye bekletilmiştir ve steril saf su ile yıkanmıştır. Son olarak ise %20'lik sodyum hipoklorit ($NaClO$) çözeltisinde 8 dakika bekletilip birkaç kez steril saf su ile yıkanarak durulanmıştır.



Şekil 3.2. Boğum eksplantlarının sterilizasyonu

Dilsi çiçek eksplantlarının kültüre alınması

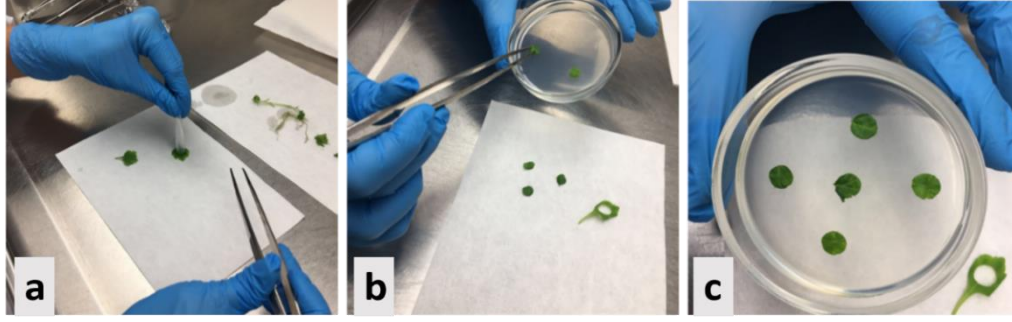
Dilsi çiçekler, çiçeklenme dönemindeki tam açmış çiçeklerden seçilerek kültüre alınmak üzere laboratuvara getirilmiştir (Şekil 3.3). Sterilizasyon işlemleri ardından kurutma kağıdında suları süzülen dilsi çiçek eksplantları alt yüzü besin ortamıyla temas edecek şekilde P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9 ve P10 (kontrol) numaralı ortamlarca desteklenmiş MS bazal besin ortamının bulunduğu (30 g/l sakkaroz ve 7 g/l agar ve pH:5,7) petrilere aktararak büyütme odası koşullarında (6000 lux ışıklandırma, 16 saat gün uzunluğu, $23\pm 2^\circ\text{C}$) kültüre alınmışlardır. 10 farklı ortam denemesinde her petriye 5 adet eksplant yerleştirilmiş ve çalışma her petri bir tekrür olacak şekilde 4 tekrürlü olarak yürütülmüştür.



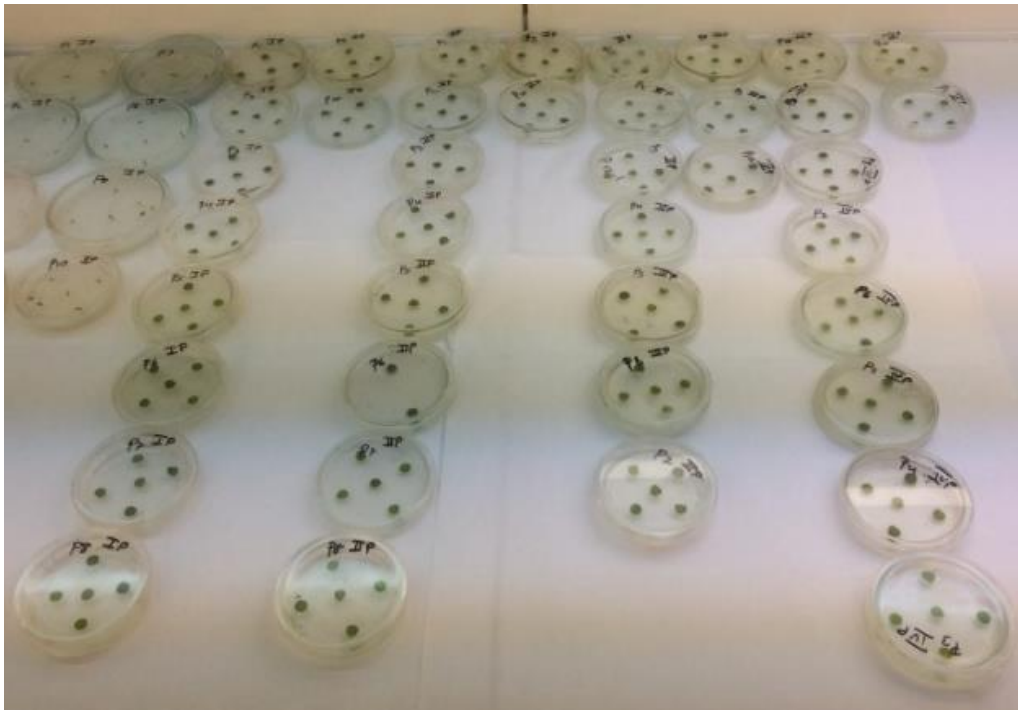
Şekil 3.3. Çiçeklenme dönemindeki kasımpatı bitkileri a) tam açmış kasımpatı çiçekleri, b) laboratuvara getirilen dilsi çiçekler (Pusan) c) petride kültüre alınan dilsi çiçekler

Yaprak eksplantlarının kültüre alınması

5 mm çapındaki yaprak eksplantları alt yüzü besin ortamıyla temas edecek şekilde P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9 ve P10 (kontrol) numaralı ortamlarca desteklenmiş MS bazal besin ortamının bulunduğu (30 g/l sakkaroz ve 7 g/l agar ve pH:5,7) petrilere aktararak büyütme odası koşullarında (6000 lux ışıklandırma, 16 saat fgün uzunluğu, $23\pm 2^\circ\text{C}$) kültüre alınmışlardır (Şekil 3.4, Şekil 3.5). 10 farklı ortam denemesinde her petriye 5 adet eksplant yerleştirilmiş ve çalışma her petri bir tekrür olacak şekilde 4 tekrürlü olarak yürütülmüştür.



Şekil 3.4. Yaprak eksplantlarının a) kesimi, b) petriye aktarımı, c) petriye dikimi gerçekleşen eksplantlar



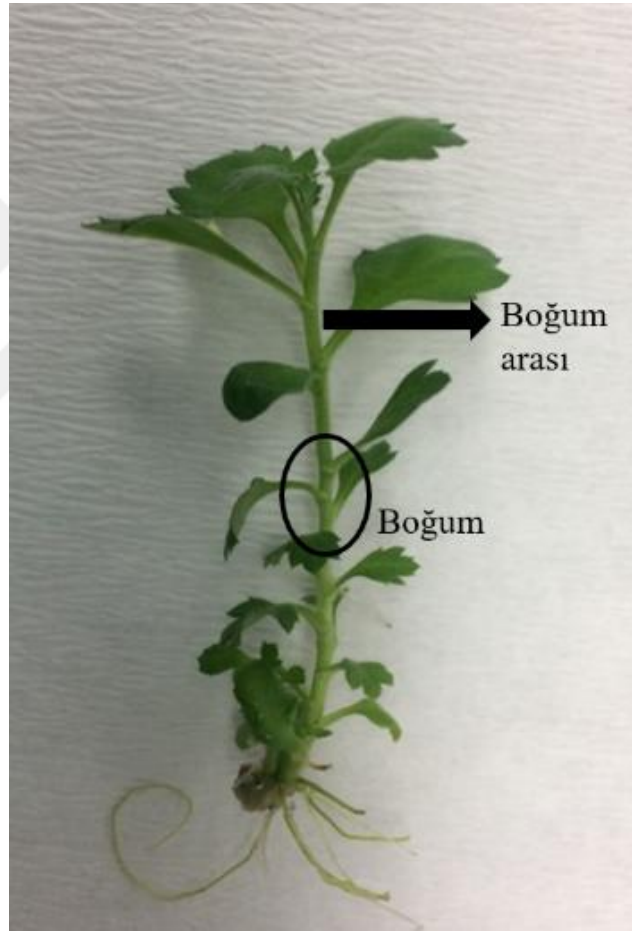
Şekil 3.5. Büyütme odasında petrilere dikilen yaprak eksplantları

Boğum eksplantlarının kültüre alınması

Boğum eksplantları (Şekil 3.6) her bir koltuk boğumu tek tek alınarak P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9 ve P10 (kontrol) numaralı ortamlarca desteklenmiş MS bazal besin ortamının bulunduğu (30 g/l sakkaroz ve 7 g/l agar ve pH:5,7) petrilere aktararak büyütme odası koşullarında (6000 lux ışıklandırma, 16 saat gün uzunluğu, $23\pm 2^{\circ}\text{C}$) kültüre alınmışlardır. 10 farklı ortam denemesinde her petriye 5 adet eksplant yerleştirilmiş ve çalışma her petri bir tekerrür olacak şekilde 4 tekerrürlü olarak yürütülmüştür.

Boğum arası eksplantlarının kültüre alınması

Boğum arası eksplantları (Şekil 3.6) 5 mm uzunluğunda parçalara ayrılarak P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9 ve P10 (kontrol) numaralı ortamlarca desteklenmiş MS bazal besin ortamının bulunduğu (30 g/l sakkaroz ve 7 g/l agar ve pH:5,7) petrilere yatay olarak aktarılarak büyütme odası koşullarında (6000 lux ışıklandırma, 16 saat gün uzunluğu, $23\pm 2^{\circ}\text{C}$) kültüre alınmışlardır. 10 farklı ortam denemesinde her petriye 5 adet eksplant yerleştirilmiş ve çalışma her petri bir tekerrür olacak şekilde 4 tekerrürlü olarak yürütülmüştür.



Şekil 3.6. Kasımpatı bitkisinde boğum ve boğum arası eksplantlarının alındığı bölgeler

3.3.2 Rejenerasyon denemelerinde incelenen özellikler

Sürgün ve kök oluşturma oranları her bir eksplant için ayrı ayrı yüzde (%) olarak hesaplanmıştır. Ayrıca eksplant başına düşen sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu gibi değerlerin de analizi yapılmıştır. Yapılan gözlemler ile ilgili açıklamalar aşağıda verilmiştir.

Sürgün Oluşturan Eksplant Oranı (%): Sürgün oluşturan eksplant sayısının toplam eksplant sayısına bölünmesinin ardından 100 ile çarpılması ile yüzde olarak hesaplanmıştır. Kültür başlangıcından itibaren 8. haftada gözlem ve ölçümler alınmıştır.

Kök Oluşturan Eksplant Oranı (%): Kök oluşturan eksplant sayısının toplam eksplant sayısına bölünmesinin ardından 100 ile çarpılması ile yüzde olarak hesaplanmıştır. Kültür başlangıcından itibaren 8. haftada gözlem ve ölçümler alınmıştır.

Eksplant Başına Düşen Sürgün Sayısı (adet): Sürgün oluşturan eksplantlardaki sürgünlerin tek tek sayılmasıyla elde edilen veridir. Kültür başlangıcından itibaren 8. haftada gözlem ve ölçümler alınmıştır.

Sürgün Uzunluğu (cm): Eksplantlarda oluşan tüm sürgünlerin boylarının cetvel yardımıyla *in vitro* koşullarda ölçülmesiyle elde edilen verilerdir. Kültür başlangıcından itibaren 8. haftada gözlem ve ölçümler alınmıştır.

3.4 *In Vitro* Gama (Co^{60}) Işınlamaları

Çalışmadaki tüm ışınlamalar Türkiye Enerji, Nükleer ve Maden Araştırmaları Kurumu, Nükleer Enerji Araştırma Enstitüsü'nde bulunan Gama (Co^{60}) kaynağında yapılmıştır (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. İzotop, Ob-servo Sanguis B/01 model 360° döner tablalı klimatize Gama (Co^{60}) kaynağı

3.4.1 EMD₅₀ ışınlamaları

In vitro ışınlamalarda öncelikle her bir eksplant (yaprak, dils çiçek, boğum ve boğum arası) için ayrı ayrı EMD₅₀ belirleme çalışması yapılmıştır. Bunun için BBD bulunmayan MS bazal besi yerinin bulunduğu magenta kaplarındaki bitkilere 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 Gy dozlarında gama ışını (Co^{60}) uygulaması yapılmıştır (Şekil 3.8) ve ilk olarak BBD bulunmayan MS besin ortamına dikilmiştir. 2 gün sonra boğum, boğum arası ve yaprak eksplantları BBD bulunan petri kaplarına ayrı ayrı konularak deneme kurulmuştur. Her bir doz uygulaması 3 tekerrürlü ve 10'ar adet eksplant bulunduracak şekilde planlanmıştır (Çizelge 3.3). Petrilerde besi yeri olarak rejenerasyon çalışmalarında belirlenen en etkili ortam kullanılmıştır (2.0 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA içeren MS bazal besi yeri).



Şekil 3.8. Yaprak, boğum ve boğum arası eksplantları için etkili doz belirleme ışınlamaları
a) magenta içinde ışınlanan *in vitro* bitkicikler b) ışınlama kaynağı

Çizelge 3.3. EMD₅₀ Işınlamaları deneme planı (yaprak, boğum, boğum arası)

ÇEŞİTLER							
Mutasyon Dozu(Gy)	MW			Pusan			TOPLAM
	Yaprak	Boğum	Boğum arası	Yaprak	Boğum	Boğum arası	
0 (Kontrol)	3 petri* 10 eksplant	3 petri* 10 eksplant	3 petri* 10 eksplant	3 petri* 10 eksplant	3 petri* 10 eksplant	3 petri* 10 eksplant	180
10	3 petri* 10 eksplant	3 petri* 10 eksplant	3 petri* 10 eksplant	3 petri* 10 eksplant	3 petri* 10 eksplant	3 petri* 10 eksplant	180
20	3 petri* 10 eksplant	3 petri* 10 eksplant	3 petri* 10 eksplant	3 petri* 10 eksplant	3 petri* 10 eksplant	3 petri* 10 eksplant	180
30	3 petri* 10 eksplant	3 petri* 10 eksplant	3 petri* 10 eksplant	3 petri* 10 eksplant	3 petri* 10 eksplant	3 petri* 10 eksplant	180
40	3 petri* 10 eksplant	3 petri* 10 eksplant	3 petri* 10 eksplant	3 petri* 10 eksplant	3 petri* 10 eksplant	3 petri* 10 eksplant	180
50	3 petri* 10 eksplant	3 petri* 10 eksplant	3 petri* 10 eksplant	3 petri* 10 eksplant	3 petri* 10 eksplant	3 petri* 10 eksplant	180
60	3 petri* 10 eksplant	3 petri* 10 eksplant	3 petri* 10 eksplant	3 petri* 10 eksplant	3 petri* 10 eksplant	3 petri* 10 eksplant	180
70	3 petri* 10 eksplant	3 petri* 10 eksplant	3 petri* 10 eksplant	3 petri* 10 eksplant	3 petri* 10 eksplant	3 petri* 10 eksplant	180
80	3 petri* 10 eksplant	3 petri* 10 eksplant	3 petri* 10 eksplant	3 petri* 10 eksplant	3 petri* 10 eksplant	3 petri* 10 eksplant	180
90	3 petri* 10 eksplant	3 petri* 10 eksplant	3 petri* 10 eksplant	3 petri* 10 eksplant	3 petri* 10 eksplant	3 petri* 10 eksplant	180
100	3 petri* 10 eksplant	3 petri* 10 eksplant	3 petri* 10 eksplant	3 petri* 10 eksplant	3 petri* 10 eksplant	3 petri* 10 eksplant	180
Işınlanan Toplam Eksplant Sayısı				1980			

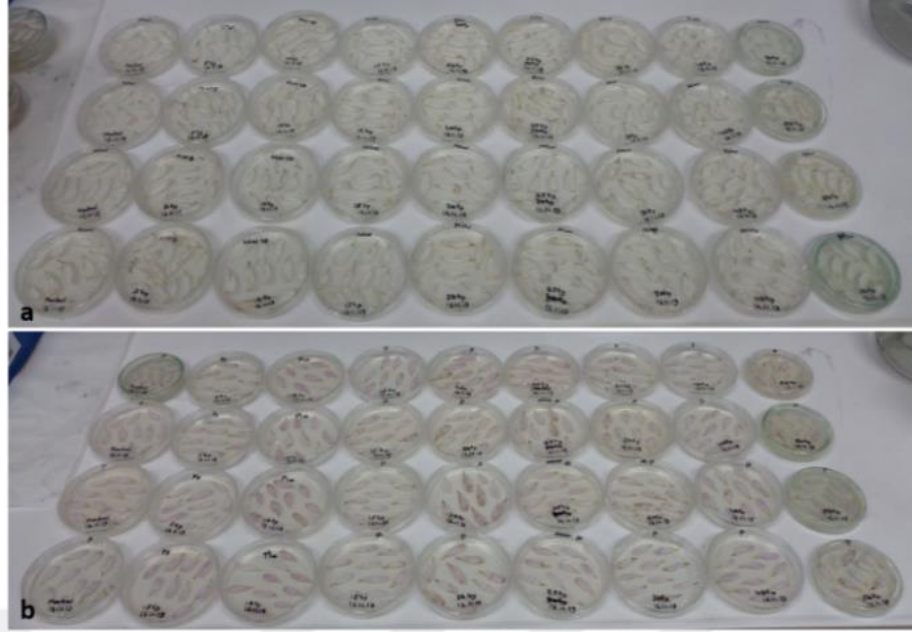
Dilsi çiçek eksplantları ise kapitulum çiçek şeklinde toplu olarak 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50 Gy dozlarında gama ışını (Co⁶⁰) ile muamele edilmiştir (Şekil 3.9, Şekil 3.10). Muameleden sonra dilsi çiçekler kapitulum çiçeklerinden tek tek ayrılarak sterilizasyonları sağlanmış ve ilk olarak BBD bulunmayan MS besin ortamına dikilmiştir. Ardından rejenerasyon çalışmalarında belirlenen en etkili besin ortamının (4 numaralı ortam) bulunduğu petri kaplarına, her bir doz uygulaması için 4 tekerrürlü ve her tekerrürde 10'ar adet eksplant bulunduracak şekilde yerleştirilmiştir (Şekil 3.11, Çizelge 3.4).



Şekil 3.9. Işınlama için hazırlanan dilsî çiçek eksplantları a) MW b) Pusan



Şekil 3.10. Dilsî çiçek eksplantlarının gama kaynağında ısınlanması (a, b, c)



Şekil 3.11. Işınlama sonrası petrilerde kültüre alınan dilsî çiçekler a) MW b) Pusan

Çizelge 3.4. EMD₅₀ Işınlamaları deneme planı (dilsî çiçek)

ÇEŞİTLER

Mutasyon Dozu(Gy)	MW	Pusan	TOPLAM
	<u>Dilsî Çiçek</u>	<u>Dilsî Çiçek</u>	
0 (Kontrol)	4 petri*10 eksplant	4 petri*10 eksplant	80
5	4 petri*10 eksplant	4 petri*10 eksplant	80
10	4 petri*10 eksplant	4 petri*10 eksplant	80
15	4 petri*10 eksplant	4 petri*10 eksplant	80
20	4 petri*10 eksplant	4 petri*10 eksplant	80
25	4 petri*10 eksplant	4 petri*10 eksplant	80
30	4 petri*10 eksplant	4 petri*10 eksplant	80
40	4 petri*10 eksplant	4 petri*10 eksplant	80
50	4 petri*10 eksplant	4 petri*10 eksplant	80
Işınlanan Toplam Eksplant Sayısı		720	

EMD₅₀ hesaplamaları için, rejenerasyon gösteren tüm ışınlama gruplarında, ışınlamadan sonraki 60. günde sürgün uzunlukları ölçülmüştür. Kontrol grubuna göre sürgün uzunluğunda %50 kısalma sağlayan doz (RD₅₀), lineer regresyon analizi ile hesaplanmıştır. Işınlanan *in vitro* bitkiciklerde yapılan diğer gözlem ve ölçümler ile ilgili açıklamalar aşağıda verilmiştir.

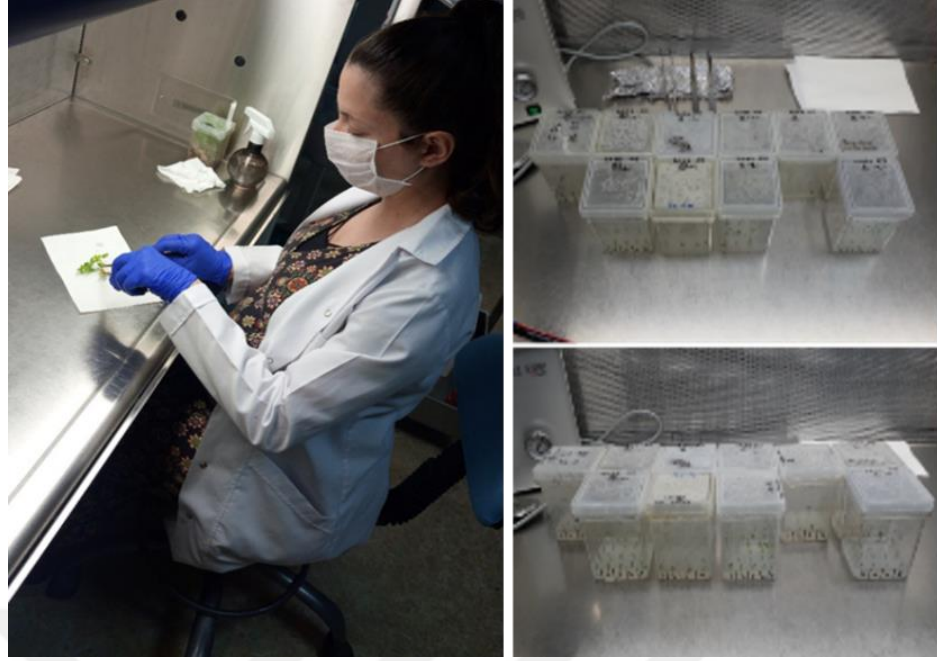
Işınlama sonrası canlı eksplant oranı (%): Işınlama sonrası canlı eksplant sayısının toplam eksplant sayısına bölünmesinin ardından 100 ile çarpılması ile hesaplanmıştır. Işınlamadan sonra 8. haftada gözlemler alınmıştır.

Gelişen eksplant oranı (%): Canlı eksplantlarda büyüme ve gelişme gösteren sürgünlerin yüzde olarak hesaplanması ile elde edilmiştir. Işınlamadan sonra 11. haftada gözlemler alınmıştır.

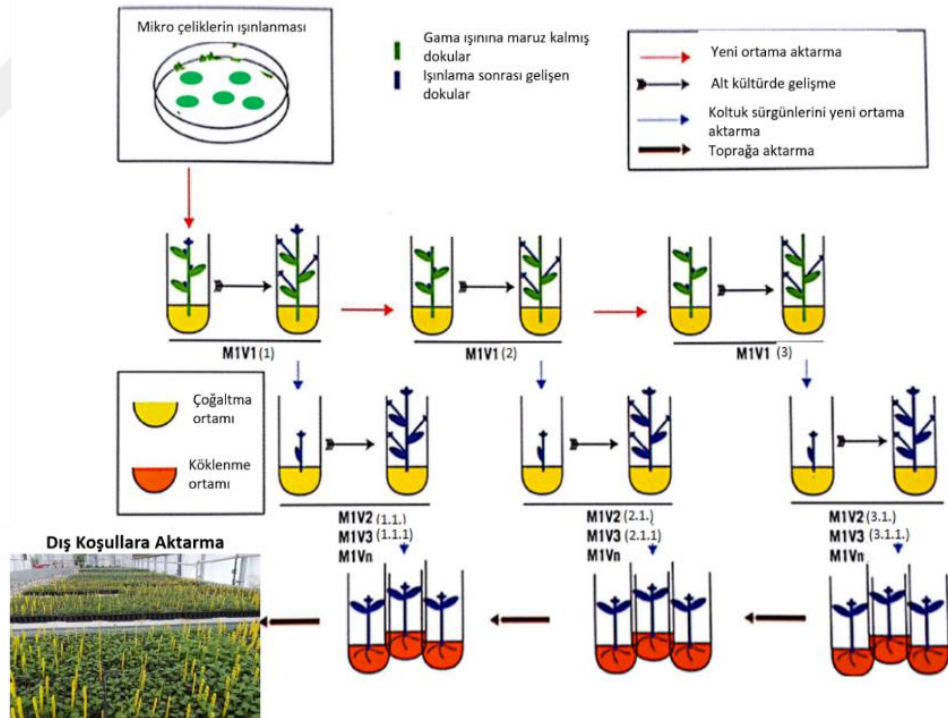
Eksplant başına düşen sürgün sayısı: Işınlanan eksplantlarda meydana gelen sürgünlerin tek tek sayılmasıyla eksplant başına sürgün sayısı adet olarak belirlenmiştir. Işınlamadan sonra 8. haftada gözlemler alınmıştır.

3.4.2 EMD₅₀ ile yapılan ışınlamalar ve mutant bireylerin eldesi

EMD₅₀ ışınlamalarından sonra ana mutant populasyonu oluşturmak üzere rejenerasyon kapasitesine göre etkili doz değeri hesaplanan boğum eksplantlarında belirlenen doza göre 1000'er adet yeni eksplant ışınlaması gerçekleştirilmiştir. Işınlanmış materyaller rejenerasyon çalışmaları sonucunda belirlenen etkili protokole göre (2.0 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA içeren MS bazal besi ortamı) hazırlanan kültür ortamlarına dikilmiştir (Şekil 3.12). Rejenerasyon sağlanan eksplantlarda M₁V₁-M₁V₄ dönemi boyunca, her bir bitki tek tek kimliklendirilerek alt kültüre alma çalışmaları yapılmıştır. (Şekil 3.12, Şekil 3.13). Çalışmadaki tüm *in vitro* eksplantlar 6000 lux ışıklandırma, 23±2 °C'de ve 16 saat gün uzunluğuna sahip iklim odasında tutulmuştur.



Şekil 3.12. Işınlamalardan sonra yapılan alt kültüre alma çalışmaları



Şekil 3.13. Işınlanmış *in vitro* eksplantlarda ardışık alt kültüre alma şeması (M_1V_1 , M_1V_2 , M_1V_3)
Her döngüde ışınlanmış meristemlerden (mavi) oluşan aksiller sürgünlerin kesilmesi ve yeni besi yerine aktarılması (Suprasanna et al, 2012' den modifiye edilmiştir).

Alt kültüre alma çalışması tamamlanan eksplantlar BBD bulunmayan MS besisi yerinde (30g/l sakkaroz ve 7 g/l agar ve pH:5,7) köklendirilmiştir.

3.5 Dış Koşullara Alıştırma ve Araziye Dikim

Dış ortama aktarılmaya hazır hale gelen bitkicikler içerisinde 2:1 oranında steril torf ve perlit karışımı bulunan 104'lük viyollere aktarılmıştır. Dış koşullara adaptasyonunu kolaylaştırmak amacıyla üzerleri şeffaf bir plastik örtüyle kapatılan bitkiler ışık ve sıcaklık kontrollü iklim odalarında 1 hafta süreyle tutulmuştur ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$). Bitkilerin üzerindeki örtü yavaş yavaş kaldırılarak nem miktarı kademeli olarak azaltılmış ve bitkiler dış koşullardaki neme alıştırmıştır (Şekil 3.14).



Şekil 3.14. Bitkilerde aktarma çalışmaları (etiketleme, yıkama, dikim, üzerini naylon ile örtme, seraya aktarım)

Aklimatizasyonu tamamlanan bitkiler 1 ay süre ile sera koşullarında dikim gününe kadar bekletilmiştir (Şekil 3.15).



Şekil 3.15. Aklimatizasyonu tamamlanan seradaki bitkiler

Bitkilerin toprağa dikimi ETAE arazilerinde (9000 bitki) ve İzmir Menderes'te bulunan üretici serasında (9300 bitki) olmak üzere iki farklı alanda yapılmıştır. Enstitü arazisindeki dikimler için öncelikle toprak işleme, yastık yapımı (1 m x 50 m), sulama borularının yerleştirilmesi, malç serilmesi gibi işlemler sırasıyla tamamlanmıştır. Viyollerdeki bitkiler numaralarının yazdığı etiketler ile birlikte dikilmiştir (Şekil 3.16).

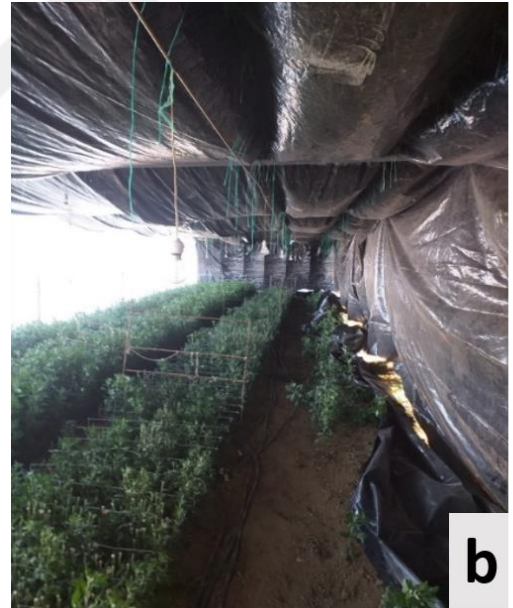


Şekil 3.16. Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü arazisinde bitkilerin dikimi

Mutant bitkilerin üretici koşullarındaki performanslarını gözlemleyebilmek adına Enstitü arazisindeki bitkilerden alınıp (Şekil 3.17) köklendirilen çelikler ve aklimatizasyonu tamamlanan bitkiler, Kemal Kuşkovan' a ait seraya 27 Mart 2020 tarihinde (6'lı dikim) 12.5 cm x 12.5 cm aralıklarla dikilmiştir (Şekil 3.18a). Bitkiler 30 cm boya ulaştığında karartma işlemi başlatılmıştır (Şekil 3.18b). Karartma işlemindeki gecikme ve sıcaklığın da etkisiyle yeterli miktarda çiçek elde edilememiştir ve ağustos sonunda bitkiler yeni sezonda yetiştirilmek üzere budanmıştır.



Şekil 3.17. Enstitü arazisindeki mutant bitkilerden alınan çelikler



Şekil 3.18. Üretici serasında a) bitki dikimi ve b) karartma uygulaması

Budama işleminin hemen ardından kesintisiz aydınlatma şeklinde 1 Eylül 2020 tarihinde 22.00-02.00 saatleri arasında ışıklandırma uygulaması başlatılmış ve 1 ay kadar devam etmiştir. Işıklıdırma 100 Watt'lık sarı ışık (warm white) kullanılmış olup, toprak seviyesinden 150 cm yukarıda, sıra üzeri 3 m mesafe de 1

lamba olacak şekilde her sıraya yerleştirilmiştir. 450 lümenlik lambalar kullanılmış olup 70 lux'lük ışık intensitesi sağlanmıştır. (Şekil 3.19).



Şekil 3.19. Üretici serasında ek aydınlatma işlemi

Çalışmanın yürütüldüğü süre boyunca (eylül-ocak) sera içi sıcaklığı geceleri ortalama 7-9 °C, gündüzleri ise 18-20 °C olurken; nem ise %70-75 olarak ölçülmüştür. Bitkilerde gübreleme uygulaması dikim ile birlikte başlamış ve gonca oluşumuna kadar devam etmiştir. Dikim ile birlikte sıvı hümik asit (1 litre/da) uygulamasının ilki yapılmıştır. İkinci ve üçüncü uygulamalar ise 15 gün arayla olmak üzere toplamda 3 kez hümik asit (3 litre/da) uygulaması yapılmıştır. Dikimden 1 hafta sonra, 2 litre/da sıvı amonyum nitrat (%33 N) ve sıvı fosfor (2 litre/da) uygulaması yapılmıştır. Sürgünler 15-20 cm olduğunda 16-8-24 NPK (3 kg/da) uygulamasının ilki ve 40-50 cm olduğunda ise 16-8-24 NPK (3 kg/da) uygulamasının ikincisi yapılmıştır. Goncalar oluşmaya başladığında ise 2 litre/dekar kalsiyum (%16) ve magnezyum (%5) ile son gübreleme yapılmıştır.

Çiçeklenen bitkilerde anormallikler (boy kısalığı, yaprak ve çiçeklerde yapısal ve renk değişiklikleri vb.) sayılarak aşağıdaki formül ile mutasyon frekansları belirlenmiştir (Kantoğlu ve Kunter, 2021; Nagatomi, 2001).

$$\text{Mutasyon Frekansı (\%/Gy)} = \frac{\text{Mutant Bitki Sayısı} \times 100}{\text{Gözlem Yapılan Bitki Sayısı} \times \text{EMD (Gy)}}$$

Ayrıca çiçeklenen bitkilerde yapılan gözlem ve ölçümler ile ilgili açıklamalar aşağıda verilmiştir.

Bitki Boyu (cm): Toprak seviyesinden itibaren bitkinin en üst noktasına kadar olan mesafesinin metre ile ölçülmesiyle elde edilen değerdir.

Çiçek Sapı Uzunluğu (cm): Hasat edilen çiçeklerde, kesim yerinden itibaren bitkinin en üst noktasına kadar olan mesafe ölçülerek elde edilen değerdir.

Çiçek sapı kalınlığı (cm): Bitkide toprak hizasının 10 cm yukarısındaki gövde çapının ve en üst noktasının 10 cm altındaki gövde çapının kumpas ile ölçümünden elde edilen değerlerin ortalamasıyla elde edilen veridir.

Sürgün Sayısı (adet/bitki): Bir bitkide bulunan sürgünlerin adet olarak sayısını ifade etmektedir.

Dal ağırlığı (g): Toprak hizasından hasat edilen bitkilerin (dal+yaprak+çiçek) 0.01 grama duyarlı dijital terazide tartılması ile elde edilen veridir.

Toplam çiçek sayısı (adet): Hasat edilen bitkilerde açan ve açmayan bütün çiçek tomurcuklarının toplam sayısını ifade etmektedir.

Yaprak sayısı (adet/bitki): Bir bitkide bulunan yaprak ve yaprakçıkların toplam sayısını ifade etmektedir.

Yaprak uzunluğu (cm): Bitkinin orta kısmında bulunan 5 adet yaprağın boyunun cetvel yardımıyla ölçülmesi ile elde edilen verinin ortalamasıdır (Şekil 3.21).

Yaprak genişliğı (cm): Bitkinin orta kısmında bulunan 5 adet yaprağın eninin cetvel yardımıyla ölçülmesi ile elde edilen verinin ortalamasıdır (Şekil 3.21).

Yaprak sapı uzunluğu (cm): Bitkinin orta kısmında bulunan yapraklarının sapının uzunluğunun cetvel ile ölçülmesi ile elde edilen veridir (Şekil 3.21).

Çiçek rengi: Renk varyasyonlarını belirlemek için “The Methuen Hand Book of Colour” kataloğı kullanılmıştır (Kornerup and Wanscher, 1978).

Çiçek çapı (cm): Tam açmış terminal çiçeğin en geniş mesafesinin cetvel yardımıyla ölçülmesi ile elde edilen veridir (Şekil 3.20).

Pedisel uzunluğu (cm): Terminal çiçeğin sapının uzunluğunun cetvel yardımıyla ölçülmesi ile elde edilen veridir.

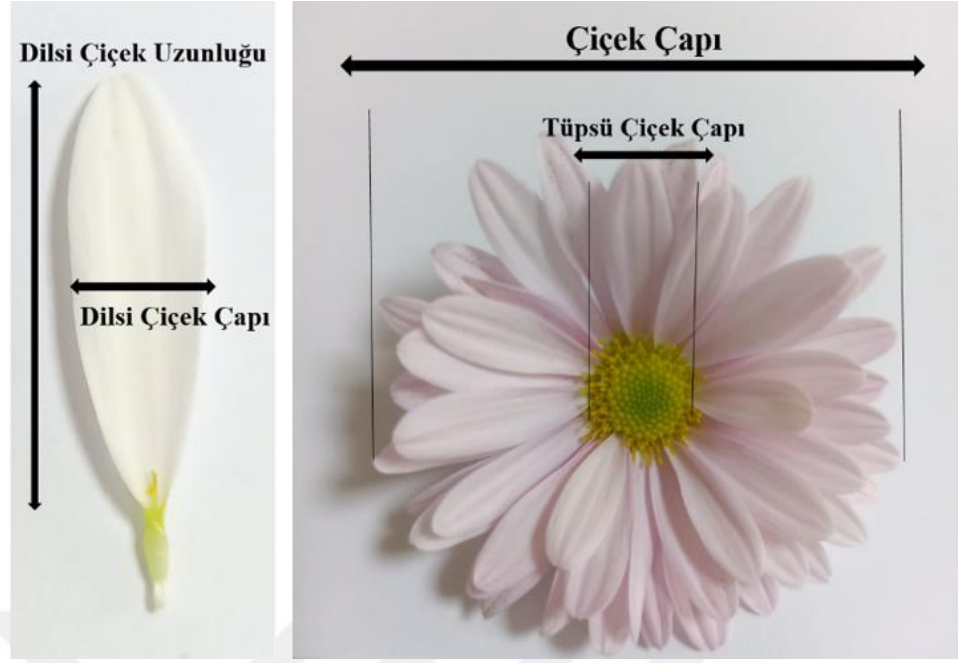
Tüpsü çiçek çapı (cm): Tüpsü çiçeklerin bulunduğu tablanın çapının cetvel yardımıyla ölçülmesi ile elde edilen veridir (Şekil 3.20).

Dilsi çiçek uzunluğu (cm): Terminal çiçekte en dıştaki 5 adet dilsi çiçeğin boyunun cetvel yardımıyla ölçülmesi ile elde edilen verinin ortalamasıdır (Şekil 3.20).

Dilsi çiçek çapı (cm): Terminal çiçekte en dıştaki 5 adet dilsi çiçeğin eninin cetvel yardımıyla ölçülmesi ile elde edilen verinin ortalamasıdır (Şekil 3.20).

Dilsi çiçek sayısı (adet): Terminal çiçekteki dilsi çiçeklerin sayısını ifade etmektedir.

Çiçeklenme süresi (gün): Çiçeklerin %50’sinin hasat edildiğı (çiçeklendiğı) döneme kadar geçen süre gün olarak ifade edilmiştir.



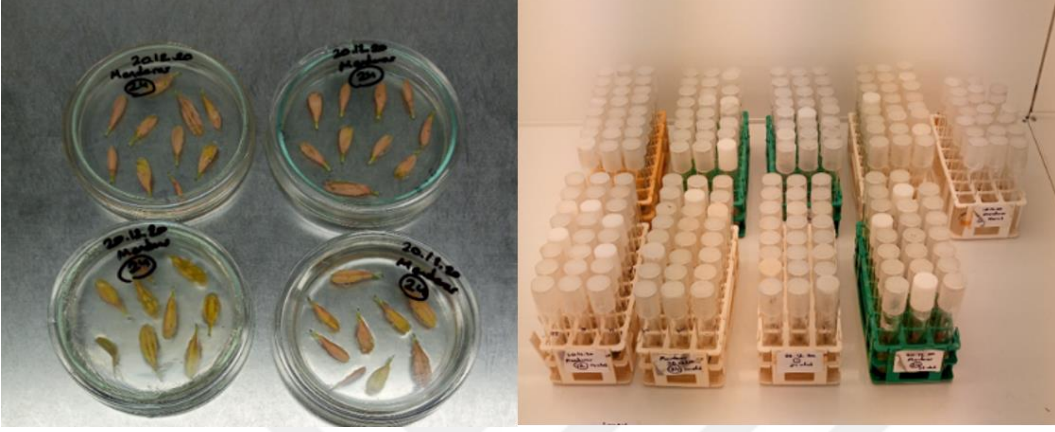
Şekil 3.20. Çiçek ile ilgili incelenen özelliklerin şematik olarak açıklaması



Şekil 3.21. Yaprak ile ilgili incelenen özelliklerin şematik olarak açıklaması

3.6 Seçilen Bitkilerin Muhafazası ve Çoğaltılması

Farklılık gösteren mutant bitkiler, çelik ile çoğaltılarak muhafaza edilmiştir. Ayrıca *in vitro* koşullarda da saklanması için kültüre alma çalışmaları yürütülmüştür (Şekil 3.22).



Şekil 3.22. Mutant bitkilerin/dokuların *in vitro* koşullarda kültüre alınması

3.7 İstatistiksel Analizler

Dilsî çiçek, yaprak, boğum ve boğum arası eksplantlarının rejenerasyon denemeleri her iki kasımpatı çeşidi için ayrı olarak, faktöriyel düzende tesadüf parselleri deneme desenine göre 4 tekerrürlü olarak kurulmuştur. Yüzde (%) değerlere istatistik analiz öncesi açı transformasyonu uygulanmıştır. JMP (versiyon 13.0) paket programı verilerin analizinde kullanılmış ve ortalamaların önem seviyeleri LSD ($P < 0.01$) testi ile karşılaştırılmıştır. Lineer regresyon analizi yardımıyla yapılan EMD_{50} hesaplamalarında; Microsoft Excel programı, elde edilen grup ortalamalarına göre lineer regresyon hesaplaması, eğim çizgisinin çizimi ve denklemin oluşturulmasında kullanılmıştır. PCA analizleri `ade4:pca` ve `stats::dist` (metot euclidean) ile oluşturulan uzaklık matrisi yardımı ile `stats::hclust` (metot complete) ile hiyerarşik kümeleme analizleri R V.4.2.2 programında gerçekleştirilmiştir.

4. BULGULAR

Tez çalışmasında, iki farklı kasımpatı çeşidinin (MW ve Pusan) dört farklı eksplantında (yaprak, dilsî çiçek, boğum ve boğumarası) rejenerasyon çalışmaları yürütülmüş ve *in vitro* gama ışınlamaları ile farklı tipteki mutant bireylerde yapılacak gözlem ve ölçümler ile ileriki çalışmalarda geliştirilebileceği düşünülen bireylerin belirlenmesi amaçlanmıştır. Tez çalışması kapsamında elde edilen bulgular aşağıda detaylı olarak sunulmuştur.

4.1 *In Vitro* Rejenerasyon Bulguları

Kasımpatı çeşitlerinde optimum rejenerasyon protokolünün geliştirilmesi amacıyla farklı BBD çeşitleri ve konsantrasyonlarının bulunduğu ortamlar denenmiş; 10 farklı ortamın sürgün ile kök oluşumu üzerine etkileri incelenmiştir. Rejenerasyon denemeleri kapsamında sürgün oluşumlarına ait istatistiki veriler Çizelge 4.1, 4.2 ve 4.3’ te sunulmuştur.

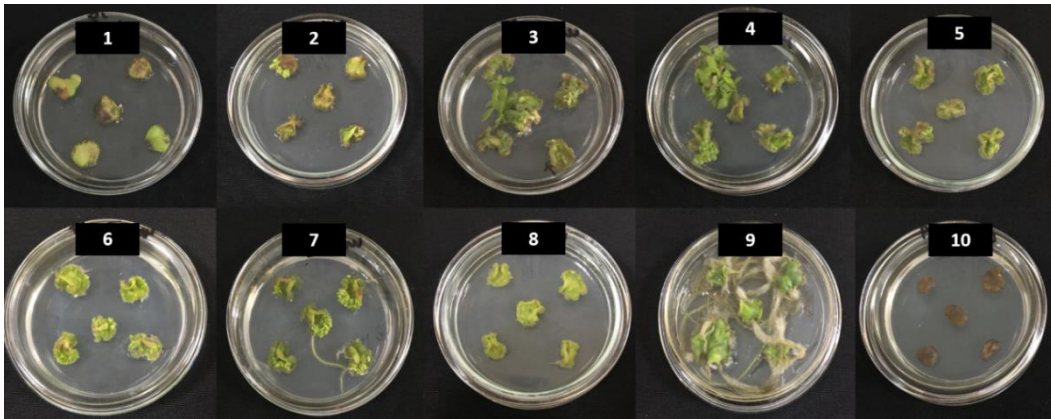
MW çeşidinde sürgün oluşum bulguları incelendiğinde; en iyi sürgün oluşumları; 2.0 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA içeren 4 numaralı besin ortamında %90.00 ile yaprak eksplantında, %100.00 ile boğum ve %100.00 boğum arası eksplantlarında; 1.0 mg/l kinetin+0.5 mg/l NAA içeren 1 numaralı besin ortamında %100.00 ile boğum ve %100.00 boğum arası eksplantlarında; 2.0 mg/l kinetin+0.5 mg/l NAA içeren 2 numaralı besin ortamında %100.00 ile boğum eksplantında; 1.0 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA içeren 3 numaralı besin ortamında %100.00 ile boğum eksplantında ve %95.00 ile boğum arası eksplantında; 1.0 mg/l kinetin+1.0 mg/l 2,4-D içeren 7 numaralı besin ortamında %90.00 ile yaprak eksplantında ve 1.0 mg/l 2,4-D içeren 9 numaralı besin ortamında %100.00 ile boğum eksplantında ve BBD içermeyen 10 numaralı (kontrol) besin ortamında %100.00 ile boğum eksplantında sağlanmıştır (Şekil 4.1). Dilsî çiçek eksplantında sürgün oluşum oranları diğer eksplantlara kıyasla düşük olmuştur (Şekil 4.2).

Farklı BBD’lerin bulunduğu 10 farklı besin ortamının ortalamasına bakıldığında ise 2.0 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA içeren 4 numaralı besin ortamının öne çıktığı görülmektedir. Dört farklı eksplantın ortalamalarına bakıldığında ise boğum eksplantının rejenerasyon oranındaki farklılık istatistiksel olarak önemli çıkmıştır ve en yüksek oluşum oranını vermiştir (Çizelge 4.1).

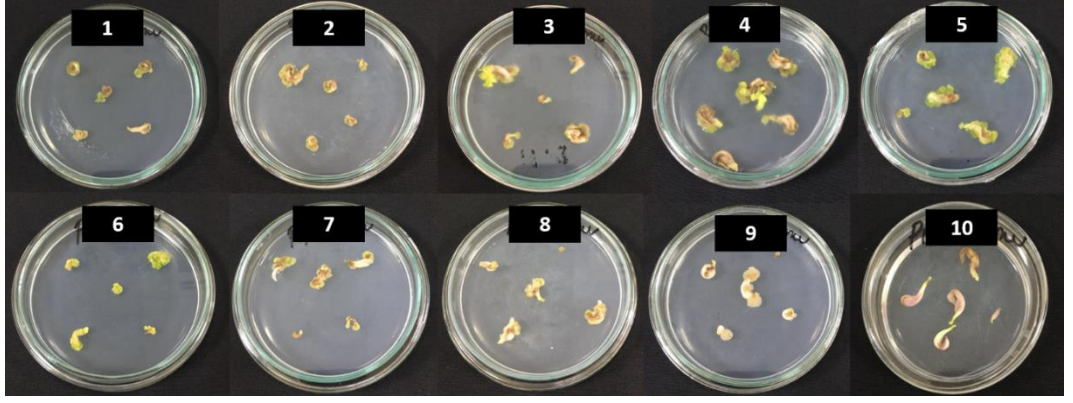
Çizelge 4.1. MW çeşidinde *in vitro* rejenerasyon denemeleri sonucunda sürgün oluşturan eksplant oranı (%)

Ortam		Eksplant				BBD Ortalaması
NO	BBD (mg/l)	Yaprak	Dilsi Çiçek	Boğum	Boğum arası	
1	Kinetin (1) + NAA (0.5)	20.00 i (19.86)	0.00 k (0.00)	100.00 a (88.13)	100.00 a (88.13)	55.02 C (49.06)
2	Kinetin (2) + NAA (0.5)	45.00 fh (43.47)	0.00 k (0.00)	100.00 a (88.13)	65.00 bd (60.22)	52.52 C (47.98)
3	BAP (1) + NAA (0.5)	70.00 bc (65.07)	40.00 gh (39.00)	100.00 a (88.13)	95.00 a (88.13)	76.25 B (69.15)
4	BAP (2) + NAA (0.5)	90.00 a (80.70)	55.00 df (52.41)	100.00 a (88.13)	100.00 a (88.13)	86.25 A (77.34)
5	BAP (1) + 2,4-D (1)	75.00 b (69.17)	55.00 df (52.41)	0.00 k (0.00)	0.00 k (0.00)	32.55 E (30.44)
6	BAP (1) + 2,4-D (2)	50.00 eg (47.94)	35.00 h (34.21)	5.00 jk (0.05)	0.00 k (0.00)	22.54 G (21.82)
7	Kinetin (1) + 2,4-D (1)	90.00 a (80.70)	0.00 k (0.00)	15.00 ij (14.92)	75.00 b (69.17)	45.03 D (41.22)
8	Kinetin (1) + 2,4-D (2)	60.00 ce (56.88)	0.00 k (0.00)	5.00 jk (0.05)	50.00 eg (47.94)	28.79 EF (27.49)
9	2,4-D (1)	20.00 i (19.86)	0.00 k (0.00)	100.00 a (88.13)	0.00 k (0.00)	30.05 EF (27.05)
10	Kontrol	0.00 k (0.00)	0.00 k (0.00)	100.00 a (88.13)	0.00 k (0.00)	25.07 FG (22.10)
Eksplant Ortalaması		52.01 B (48.37)	18.56 D (17.86)	62.52 A (55.39)	48.54 C (43.84)	

LSD_{Ortam}:5.25***, LSD_{Eksplant}: 3.33***, LSD_{Ortam x Eksplant}: 10.54***
Açı transformasyonu sonrası elde edilen değerler parantez içerisinde verilmiştir.
Grup ortalamaları arasındaki farklılıklar ayrı harfler ile gösterilmiştir.
Kontrol ortamı BBD içermeyen MS ortamıdır.
*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001



Şekil 4.1. MW çeşidinin yaprak eksplantında 5. haftadaki sürgün gelişimleri (No1= 1.0 mg/l Kinetin + 0.5 mg/l NAA, No2=2.0 mg/l Kinetin + 0.5 mg/l NAA, No3=1.0 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA, No4=2.0 mg/L BAP + 0.5 mg/l NAA, No5=1.0 mg/L 2,4-D + 1.0 mg/l BAP, No6=2.0 mg/L 2,4-D + 1.0 mg/l BAP, No7=1.0 mg/L 2,4-D + 1.0 mg/l Kin, No8=2.0 mg/L 2,4-D + 1.0 mg/l Kin, No9=1.0 mg/l 2,4-D, No10=Kontrol)



Şekil 4.2. MW çeşidinde dilsî çiçek eksplantında 5. haftadaki sürgün oluşumları (No1= 1.0 mg/l Kinetin + 0.5 mg/l NAA, No2=2.0 mg/l Kinetin + 0.5 mg/l NAA, No3=1.0 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA, No4=2.0 mg/L BAP + 0.5 mg/l NAA, No5=1.0 mg/L 2,4-D + 1.0 mg/l BAP, No6=2.0 mg/L 2,4-D + 1.0 mg/l BAP, No7=1.0 mg/L 2,4-D + 1.0 mg/l Kin, No8=2.0 mg/L 2,4-D + 1.0 mg/l Kin, No9=1.0 mg/l 2,4-D, No10=Kontrol)

Pusan çeşidinde sürgün oluşum bulguları incelendiğinde; en iyi sürgün oluşumu sırasıyla, 1.0 mg/l kinetin+0.5 mg/l NAA içeren 1 numaralı besin ortamında %100.00 ile boğum eksplantında; 2.0 mg/l kinetin+0.5 mg/l NAA içeren 2 numaralı besin ortamında %100.00 ile boğum eksplantında; 1.0 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA içeren 3 numaralı besin ortamında %100.00 ile boğum eksplantında; 2.0 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA içeren 4 numaralı besin ortamında %100.00 ile boğum eksplantında, %100.00 ile boğum ve boğum arası eksplantlarında; ve %95.00 ile boğum arası eksplantında; 1.0 mg/l kinetin+1.0 mg/l 2,4-D içeren 7 numaralı besin ortamında %90.00 ile yaprak eksplantında ve 1.0 mg/l 2,4-D içeren 9 numaralı besin ortamında %100.00 ile boğum eksplantında ve BBD içermeyen 10 numaralı (kontrol) besin ortamında %100.00 ile boğum eksplantında sağlanmıştır. Yaprak (Şekil 4.3), dilsî çiçek ve boğum arası eksplantlarında sürgün oluşum oranları, boğum eksplantına oranla düşük olmuştur. Farklı BBD'lerin bulunduğu 10 farklı besin ortamının ortalamasına bakıldığında ise 1.0 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA içeren 3 numaralı besin ortamı ve 2.0 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA içeren 4 numaralı besin ortamı öne çıkarken, boğum eksplantı en iyi sürgün geliştiren eksplant olmuştur (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. Pusan çeşidinde *in vitro* rejenerasyon denemeleri sonucunda sürgün oluşturan eksplant oranı (%)

Ortam		Eksplant				BBD Ortalaması
NO	BBD (mg/l)	Yaprak	Dilsi Çiçek	Boğum	Boğum arası	
1	Kinetin + NAA (1.0 + 0.5)	0.00 f (0.00)	0.00 f (0.00)	100.00 a (88.13)	20.00 de (19.86)	30.00 D (27.05)
2	Kinetin + NAA (2.0 + 0.5)	20.00 de (19.86)	0.00 f (0.00)	100.00 a (88.13)	25.00 d (24.65)	36.25 C (33.18)
3	BAP + NAA (1.0 + 0.5)	60.00 c (56.88)	0.00 f (0.00)	100.00 a (88.13)	85.00 b (76.60)	61.25 A (55.43)
4	BAP + NAA (2.0 + 0.5)	60.00 c (56.88)	0.00 f (0.00)	100.00 a (88.13)	65.00 c (60.97)	56.25 B (51.52)
5	BAP + 2,4-D (1.0 + 1.0)	0.00 f (0.00)	25.00 d (24.65)	20.00 de (19.86)	0.00 f (0.00)	11.25 F (11.18)
6	BAP + 2,4-D (1.0 + 2.0)	0.00 f (0.00)	0.00 f (0.00)	5.00 f (0.05)	0.00 f (0.00)	1.25 G (1.33)
7	Kinetin + 2,4-D (1.0 + 1.0)	20.00 de (19.86)	0.00 f (0.00)	15.00 e (14.92)	0.00 f (0.00)	8.75 F (8.74)
8	Kinetin + 2,4-D (1.0 + 2.0)	0.00 f (0.00)	0.00 f (0.00)	5.00 f (0.05)	0.00 f (0.00)	1.25 G (1.33)
9	2,4-D (1.0)	0.00 f (0.00)	0.00 f (0.00)	90.00 b (80.70)	0.00 f (0.00)	22.50 E (20.25)
10	Kontrol	0.00 f (0.00)	0.00 f (0.00)	100.00 a (88.13)	0.00 f (0.00)	25.00 E (22.10)
Eksplant Ortalaması		16.00 C (15.41)	2.50 D (2.55)	63.50 A (56.62)	19.50 B (18.27)	

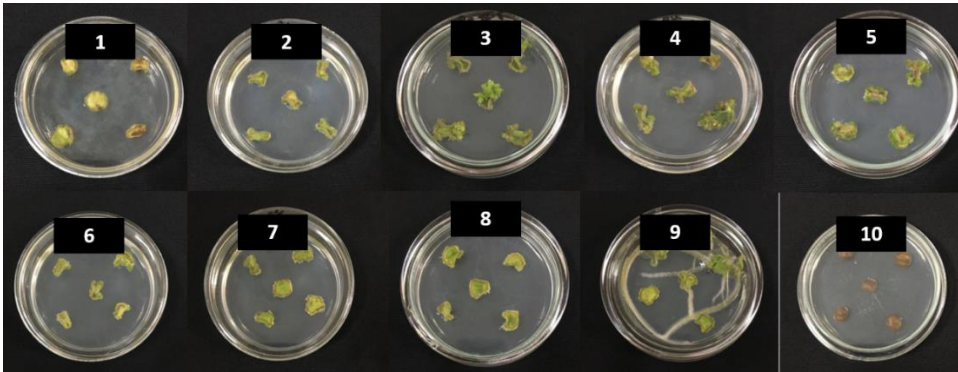
LSD_{Ortam}: 3.64***, LSD_{Eksplant}: 2.30***, LSD_{Ortam x Eksplant}: 7.28***

Açı transformasyonu sonrası elde edilen değerler parantez içerisinde verilmiştir.

Grup ortalamaları arasındaki farklılıklar ayrı harfler ile gösterilmiştir.

Kontrol ortamı BBD içermeyen MS ortamıdır.

*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001



Şekil 4.3. Pusan çeşidinde yaprak eksplantında 5. haftadaki sürgün oluşumları (No1= 1.0 mg/l Kinetin + 0.5 mg/l NAA, No2=2.0 mg/l Kinetin + 0.5 mg/l NAA, No3=1.0 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA, No4=2.0 mg/L BAP + 0.5 mg/l NAA, No5=1.0 mg/L 2,4-D + 1.0 mg/l BAP, No6=2.0 mg/L 2,4-D + 1.0 mg/l BAP, No7=1.0 mg/L 2,4-D + 1.0 mg/l Kin, No8=2.0 mg/L 2,4-D + 1.0 mg/l Kin, No9=1.0 mg/l 2,4-D, No10=Kontrol)

Farklı BBD'leri içeren 10 farklı besin ortamında sürgün oluşturan eksplant oranları ile çeşit, ortam ve eksplant arasındaki interaksiyonlar incelendiğinde (Çizelge 4.3), çeşit bazında MW' a ait veriler istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ve %45.40 ile en yüksek sürgün oluşumunu sağlamıştır. Çeşit*Ortam interaksiyonunda ise 2.0 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA içeren 4 numaralı besin ortamından %86.25 ile en yüksek sürgün oluşum oranı elde edilmiştir (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. *In vitro* rejenerasyon denemeleri sonucunda sürgün oluşturan eksplant oranı (%)

Ortam		Çeşit	Çeşit*Ortam*Eksplant				Çeşit*Ortam	Çeşit
NO	BBD (mg/l)		Yaprak	Dilsi Çiçek	Boğum	Boğum Arası		
1	Kinetin + NAA (1.0 + 0.5)	MW	20.00 lm (19.86)	0.00 n (0.00)	100.00 a (88.13)	100.00 a (88.13)	55.02 D (49.06)	45.40 A (41.37)
2	Kinetin + NAA (2.0 + 0.5)		45.00 ij (43.47)	0.00 n (0.00)	100.00 a (88.13)	65.00 ef (60.22)	52.52 D (47.98)	
3	BAP + NAA (1.0 + 0.5)		70.00 de (65.07)	40.00 jk (39.00)	100.00 a (88.13)	95.00 ab (84.41)	76.14 B (69.15)	
4	BAP + NAA (2.0 + 0.5)		90.00 bc (80.70)	55.00 gh (52.41)	100.00 a (88.13)	100.00 a (88.13)	86.25 A (77.34)	
5	BAP + 2,4-D (1.0 + 1.0)		75.00 d (69.17)	55.00 gh (52.41)	0.00 n (0.00)	0.00 n (0.00)	32.55 FG (30.44)	
6	BAP + 2,4-D (1.0 + 2.0)		50.00 hi (47.94)	35.00 k (34.21)	5.07 n (5.04)	0.00 n (0.00)	22.54 I (21.82)	
7	Kinetin + 2,4-D (1.0 + 1.0)		90.00 bc (80.70)	0.00 n (0.00)	15.02 m (14.92)	75.00 d (69.17)	45.03 E (41.22)	
8	Kinetin + 2,4-D (1.0 + 2.0)		60.00 fg (56.88)	0.00 n (0.00)	5.07 n (5.04)	50.00 hi (47.94)	28.79 GH (27.49)	
9	2,4-D (1.0)		20.00 lm (19.86)	0.00 n (0.00)	100.00 a (88.13)	100.00 a (88.13)	30.05 G (27.05)	
10	Kontrol		0.00 n (0.00)	0.00 n (0.00)	100.00 a (88.13)	0.00 n (0.00)	25.07 HI (22.10)	
1	Kinetin + NAA (1.0 + 0.5)	PUSAN	0.00 n (0.00)	0.00 n (0.00)	100.00 a (88.13)	20.00 lm (19.86)	30.05 G (27.05)	25.43 B (23.21)
2	Kinetin + NAA (2.0 + 0.5)		20.00 lm (19.86)	0.00 n (0.00)	100.00 a (88.13)	25.00 l (24.65)	36.27 F (33.18)	
3	BAP + NAA (1.0 + 0.5)		60.00 fg (56.88)	0.00 n (0.00)	100.00 a (88.13)	85.00 c (76.60)	61.27 C (55.43)	
4	BAP + NAA (2.0 + 0.5)		60.00 fg (56.88)	0.00 n (0.00)	100.00 a (88.13)	65.00 ef (60.22)	56.27 D (51.52)	
5	BAP + 2,4-D (1.0 + 1.0)		0.00 n (0.00)	25.00 l (24.65)	20.00 lm (19.86)	0.00 n (0.00)	11.30 J (11.18)	
6	BAP + 2,4-D (1.0 + 2.0)		0.00 n (0.00)	0.00 n (0.00)	5.07 n (5.04)	0.00 n (0.00)	1.34 K (01.33)	
7	Kinetin + 2,4-D (1.0 + 1.0)		20.00 lm (19.86)	0.00 n (0.00)	15.02 m (14.92)	0.00 n (0.00)	7.80 J (8.74)	
8	Kinetin + 2,4-D (1.0 + 2.0)		0.00 n (0.00)	0.00 n (0.00)	5.07 n (5.04)	0.00 n (0.00)	1.34 K (01.33)	
9	2,4-D (1.0)		0.00 n (0.00)	0.00 n (0.00)	90.00 bc (80.70)	0.00 n (0.00)	22.57 I (20.25)	
10	Kontrol		0.00 n (0.00)	0.00 n (0.00)	100.00 a (88.13)	0.00 n (0.00)	25.07 HI (22.10)	

LSD_{Ortam}:3.20***, LSD_{Eksplant}:2.02***, LSD_{Çeşit}:1.43***, LSD_{Ortam x Eksplant}: 6.41***, LSD_{Ortam x Çeşit}: 4.53***, LSD_{Eksplant x Çeşit}:2.86***, LSD_{Ortam x Eksplant x Çeşit}:9.07***

Açı transformasyonu sonrası elde edilen değerler parantez içerisinde verilmiştir.

Grup ortalamaları arasındaki farklılıklar ayrı harfler ile gösterilmiştir.

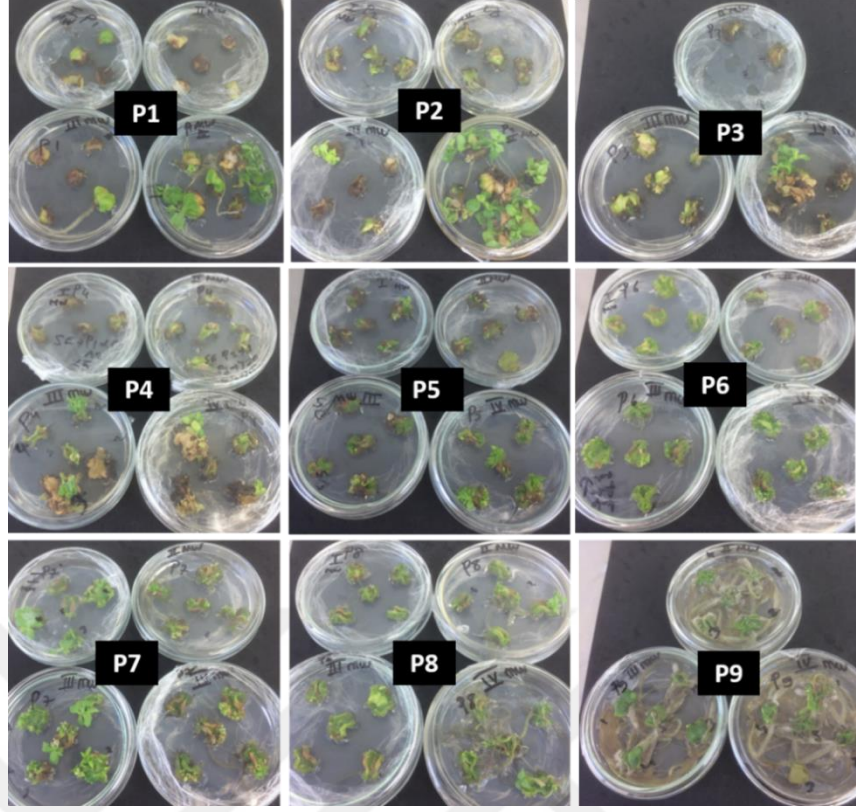
Kontrol ortamı BBD içermeyen MS ortamıdır.

*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001

Elde edilen bulgulara göre rejenerasyon çalışmalarında boğum eksplantının, yaprak, dilsî çiçek, boğum arası eksplantlarına göre daha iyi sonuç verdiği istatistiksel olarak ortaya konulmuştur. Yine farklı BBD'lerin bulunduğu 10 farklı besin ortamı arasından 2.0 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA içeren 4 numaralı besin ortamının en iyi rejenerasyonu sağladığı istatistiksel olarak belirlenmiştir. BBD içermeyen 10 numaralı (kontrol) besin ortamında ise yalnızca boğum eksplantında rejenerasyon sağlanmıştır.

MW çeşidinin boğum eksplantlarında en erken sürgün oluşumu BBD içermeyen 10 numaralı (kontrol) besin ortamında 7. günde gözlemlenirken, bunu 2.0 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA içeren 4 numaralı besin ortamı takip etmiştir (9. gün). 1.0 mg/l kinetin+0.5 mg/l NAA içeren 1 numaralı besin ortamı, 2.0 mg/l kinetin+0.5 mg/l NAA içeren 2 numaralı besin ortamı, 1.0 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA içeren 3 numaralı besin ortamında da ilk sürgün oluşumları 11 gün içinde gözlemlenmiştir. Diğer besin ortamlarında ise 14. günden itibaren rejenerasyonlar meydana gelmeye başlamıştır. MW çeşidinin boğum arası eksplantlarında en erken sürgün oluşumu 3. haftadan itibaren gözlemlenirken, dilsî çiçek eksplantlarında ise bu süre 4. haftayı bulmuştur.

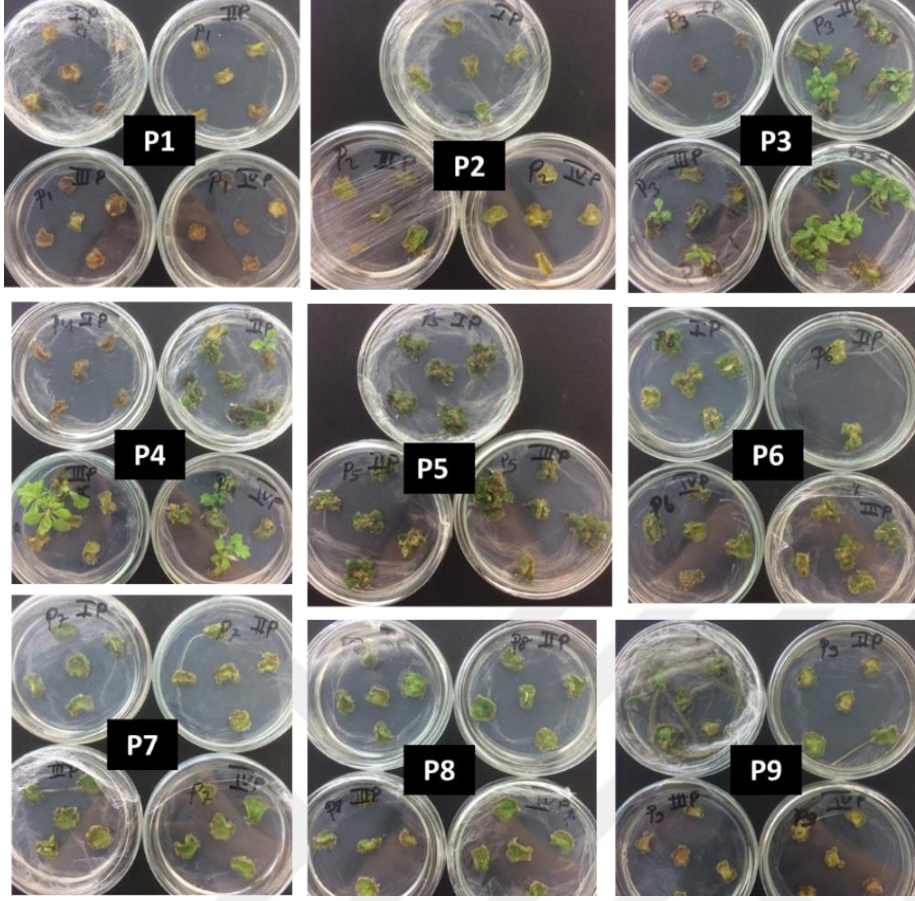
MW çeşidinde 1.0 mg/l kinetin+0.5 mg/l NAA içeren 1 numaralı besin ortamında, 2.0 mg/l kinetin+0.5 mg/l NAA içeren 2 numaralı besin ortamında, 1.0 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA içeren 3 numaralı besin ortamında ve 2.0 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA içeren 4 numaralı besin ortamında yaprak eksplantları 2. haftadan itibaren sürgün oluşturmaya başlarken diğer besin ortamlarında ise 4. haftadan itibaren rejenerasyonlar başlamıştır (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. On farklı ortamın MW çeşidinde yaprak eksplantları üzerine etkisi (8. hafta) (P1= 1.0 mg/l Kinetin + 0.5 mg/l NAA, P2=2.0 mg/l Kinetin + 0.5 mg/l NAA, P3=1.0 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA, P4=2.0 mg/L BAP + 0.5 mg/l NAA, P5=1.0 mg/L 2,4-D + 1.0 mg/l BAP, P6=2.0 mg/L 2,4-D + 1.0 mg/l BAP, P7=1.0 mg/L 2,4-D + 1.0 mg/l Kin, P8=2.0 mg/L 2,4-D + 1.0 mg/l Kin, P9=1.0 mg/l 2,4-D)

Pusan çeşidinin boğum eksplantlarında en erken sürgün oluşumu BBD içermeyen 10 numaralı (kontrol) besin ortamında 8. günde gözlemlenirken, bunu 10. günde 2.0 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA içeren 4 numaralı besin ortamı takip etmiştir. Diğer besin ortamlarında ise 11 ile 18. günler arasında rejenerasyonlar oluşmaya başlamıştır. Pusan çeşidinin boğum arası eksplantlarında en erken sürgün oluşumu 2. haftadan itibaren gözlemlenirken, dilsî çiçek eksplantlarında ise bu süre 6. haftayı bulmuştur.

Pusan çeşidinin yaprak eksplantlarında ise sürgün oluşumları 4. haftadan itibaren meydana gelmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. On farklı ortamın Pusan çeşidinde yaprak eksplantları üzerine etkisi (8. hafta) (P1= 1.0 mg/l Kinetin + 0.5 mg/l NAA, P2=2.0 mg/l Kinetin + 0.5 mg/l NAA, P3=1.0 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA, P4=2.0 mg/L BAP + 0.5 mg/l NAA, P5=1.0 mg/L 2,4-D + 1.0 mg/l BAP, P6=2.0 mg/L 2,4-D + 1.0 mg/l BAP, P7=1.0 mg/L 2,4-D + 1.0 mg/l Kin, P8=2.0 mg/L 2,4-D + 1.0 mg/l Kin, P9=1.0 mg/l 2,4-D)

MW çeşidinde eksplant başına düşen sürgün sayısı bulguları incelendiğinde; 2.0 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA içeren 4 numaralı besin ortamındaki boğum arası eksplantında en iyi sürgün sayısı elde edilmiştir (5.45 adet/eksplant). Eksplant ortalamaları incelendiğinde boğum arası eksplantını boğum eksplantı takip etmiştir. Besin ortamı ortalamalarında ise 2.0 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA içeren 4 numaralı besin ortamı değerleri istatistiksel olarak önemli çıkmıştır ve 3.80 adet/eksplant ile en iyi eksplant başına düşen sürgün sayısını vermiştir (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4. *In vitro* rejenerasyon denemeleri sonucunda MW çeşidinde eksplant başına düşen sürgün sayısı (adet)

Ortam		Eksplant				BBD Ortalaması
NO	BBD (mg/l)	Yaprak	Dilsi Çiçek	Boğum	Boğum arası	
1	Kinetin (1) + NAA (0.5)	0.55 n (0.52)	0.00 o (0.00)	1.40 ij (1.13)	3.00 d (1.81)	1.26 CD (0.89)
2	Kinetin (2) + NAA (0.5)	1.65 h (1.26)	0.00 o (0.00)	1.70 h (1.29)	1.50 hi (1.18)	1.23 C (0.96)
3	BAP (1) + NAA (0.5)	1.55 hi (1.20)	1.50 hi (1.19)	3.25 c (1.89)	5.25 a (2.35)	2.88 B (1.66)
4	BAP (2) + NAA (0.5)	2.55 e (1.66)	2.20 f (1.52)	5.00 b (2.31)	5.45 a (2.39)	3.80 A (1.97)
5	BAP (1) + 2,4-D (1)	1.95 g (1.40)	1.53 hi (1.20)	0.00 o (0.00)	0.00 o (0.00)	0.92 E (0.70)
6	BAP (1) + 2,4-D (2)	0.90 m (0.80)	0.55 n (0.52)	0.13 o (0.12)	0.00 o (0.00)	0.42 G (0.38)
7	Kinetin (1) + 2,4-D (1)	2.55 e (1.66)	0.00 o (0.00)	0.25 o (0.24)	2.15 fg (1.50)	1.26 D (0.87)
8	Kinetin (1) + 2,4-D (2)	0.90 m (0.80)	0.00 o (0.00)	0.00 o (0.00)	1.15 kl (0.98)	0.56 F (0.49)
9	2,4-D (1)	0.30 o (0.29)	0.00 o (0.00)	1.25 jk (1.04)	0.00 o (0.00)	0.44 G (0.38)
10	Kontrol	0.00 o (0.00)	0.00 o (0.00)	1.00 lm (0.88)	0.00 o (0.00)	0.33 H (0.29)
Eksplant Ortalaması		1.30 C (0.91)	0.63 D (0.50)	1.41 B (0.97)	1.89 A (1.06)	
LSD _{Ortam} :0.12***, LSD _{Eksplant} :0.06***, LSD _{Ortam x Eksplant} :0.24*** Açı transformasyonu sonrası elde edilen değerler parantez içerisinde verilmiştir. Grup ortalamaları arasındaki farklılıklar ayrı harfler ile gösterilmiştir. Kontrol ortamı BBD içermeyen MS ortamıdır. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001						

Pusan çeşidinde eksplant başına düşen sürgün sayısı değerleri incelendiğinde; boğum eksplantında, 2.0 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA içeren 4 numaralı besin ortamında 4.55 adet ile en iyi sürgün sayısı elde edilmiştir. Eksplant ortalamalarında en yüksek eksplant başına sürgün sayısını boğum eksplantı verirken (1.43 adet/eksplant), besin ortamı ortalamalarında ise 2.0 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA içeren 4 numaralı besin ortamı değerleri istatistiksel olarak önemli çıkmıştır ve 2.33 adet ile en iyi eksplant başına düşen sürgün sayısını vermiştir (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5. *In vitro* rejenerasyon denemeleri sonucunda Pusan çeşidinde eksplant başına düşen sürgün sayısı (adet)

Ortam		Eksplant				BBD Ortalaması
NO	BBD (mg/l)	Yaprak	Dilsi Çiçek	Boğum	Boğum arası	
1	Kinetin (1) + NAA (0.5)	0.00 g (0.00)	0.00 g (0.00)	1.45 df (1.16)	0.20 g (0.19)	0.41 CD (0.39)
2	Kinetin (2) + NAA (0.5)	0.20 g (0.19)	0.00 g (0.00)	1.80 cd (1.34)	0.30 g (0.29)	0.57 C (0.48)
3	BAP (1) + NAA (0.5)	1.55 de (1.21)	0.00 g (0.00)	4.05 a (2.10)	2.30 c (1.32)	1.97 B (1.18)
4	BAP (2) + NAA (0.5)	1.80 cd (1.34)	0.00 g (0.00)	4.55 a (2.21)	3.00 b (1.81)	2.33 A (1.37)
5	BAP (1) + 2,4-D (1)	0.00 g (0.00)	0.25 g (0.24)	0.20 g (0.19)	0.00 g (0.00)	0.11 E (0.16)
6	BAP (1) + 2,4-D (2)	0.00 g (0.00)	0.00 g (0.00)	0.05 g (0.12)	0.00 g (0.00)	0.01 E (0.10)
7	Kinetin (1) + 2,4-D (1)	0.20 g (0.19)	0.00 g (0.00)	0.15 g (0.17)	0.00 g (0.00)	0.08 E (0.14)
8	Kinetin (1) + 2,4-D (2)	0.00 g (0.00)	0.00 g (0.00)	0.05 g (0.12)	0.00 g (0.00)	0.01 E (0.10)
9	2,4-D (1)	0.00 g (0.00)	0.00 g (0.00)	1.05 ef (0.91)	0.00 g (0.00)	0.26 CE (0.30)
10	Kontrol	0.00 g (0.00)	0.00 g (0.00)	1.00 f (0.88)	0.00 g (0.00)	0.25 DE (0.29)
Eksplant Ortalaması		0.37 C (0.35)	0.02 D (0.11)	1.43 A (0.92)	0.58 B (0.42)	
LSD _{Ortam} :0.25***, LSD _{Eksplant} :0.15***, LSD _{Ortam x Eksplant} :0.51*** Açık transformasyonu sonrası elde edilen değerler parantez içerisinde verilmiştir. Grup ortalamaları arasındaki farklılıklar ayrı harfler ile gösterilmiştir. Kontrol ortamı BBD içermeyen MS ortamıdır. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001						

10 farklı ortamda eksplant başına düşen sürgün sayısı ile çeşit, ortam ve eksplant arasındaki etkileşimler incelendiğinde (Çizelge 4.6); çeşit bazında MW (1.31 adet) istatistiksel olarak önemli çıkmıştır. Çeşit*Ortam etkileşiminde ise 2.0 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA içeren 4 numaralı ortamdan ve MW çeşidinde en yüksek sürgün sayısı elde edilmiştir (3.80 adet/eksplant).

Çizelge 4.6. *In vitro* rejenerasyon denemeleri sonucunda eksplant başına düşen sürgün sayıları (adet)

Ortam		Çeşit	Çeşit*Ortam*Eksplant				Çeşit*Ortam	Çeşit
NO	BBD (mg/l)		Yaprak	Dilsi Çiçek	Boğum	Boğum Arası		
1	Kinetin + NAA (1.0 + 0.5)	MW	0.55 pq (0.52)	0.00 r (0.00)	1.40 jn (1.13)	3.00 e (1.81)	1.26 EF (0.89)	1.31 A (0.86)
2	Kinetin + NAA (2.0 + 0.5)		1.65 ik (1.26)	0.00 r (0.00)	1.70 ij (1.29)	1.50 jl (1.18)	1.23 E (0.96)	
3	BAP + NAA (1.0 + 0.5)		1.55 il (1.20)	1.50 jl (1.19)	3.25 e (1.89)	5.25 ab (2.35)	2.88 B (1.66)	
4	BAP + NAA (2.0 + 0.5)		2.55 f (1.66)	2.20 fh (1.52)	5.00 b (2.31)	5.45 a (2.39)	3.80 A (1.97)	
5	BAP + 2,4-D (1.0 + 1.0)		1.95 gi (1.40)	1.53 jl (1.20)	0.00 r (0.00)	0.00 r (0.00)	0.91 G (0.70)	
6	BAP + 2,4-D (1.0 + 2.0)		0.90 op (0.80)	0.55 pq (0.52)	0.13 r (0.12)	0.00 r (0.00)	0.41 GH (0.38)	
7	Kinetin + 2,4-D (1.0 + 1.0)		2.55 f (1.66)	0.00 r (0.00)	0.25 qr (0.24)	2.15 fh (1.50)	1.26 F (0.87)	
8	Kinetin + 2,4-D (1.0 + 2.0)		0.90 op (0.80)	0.00 r (0.00)	0.00 r (0.00)	1.15 lo (0.98)	0.56 G (0.49)	
9	2,4-D (1.0)		0.30 qr (0.29)	0.00 r (0.00)	1.25 ko (1.04)	0.00 r (0.00)	0.43 GH (0.37)	
10	Kontrol		0.00 r (0.00)	0.00 r (0.00)	1.00 no (0.88)	0.00 r (0.00)	0.32 HI (0.29)	
1	Kinetin + NAA (1.0 + 0.5)	PUSAN	0.00 r (0.00)	0.00 r (0.00)	1.45 jm (1.16)	0.20 qr (0.19)	0.46 GH (0.39)	0.66 B (0.45)
2	Kinetin + NAA (2.0 + 0.5)		0.20 qr (0.19)	0.00 r (0.00)	1.80 hj (1.34)	0.30 qr (0.29)	0.60 G (0.48)	
3	BAP + NAA (1.0 + 0.5)		1.55 il (1.21)	0.00 r (0.00)	4.05 d (2.10)	2.30 fg (1.32)	2.00 D (1.18)	
4	BAP + NAA (2.0 + 0.5)		1.80 hj (1.34)	0.00 r (0.00)	4.55 c (2.21)	3.00 e (1.81)	2.36 C (1.37)	
5	BAP + 2,4-D (1.0 + 1.0)		0.00 r (0.00)	0.25 qr (0.24)	0.20 qr (0.19)	0.00 r (0.00)	0.16 IJ (0.16)	
6	BAP + 2,4-D (1.0 + 2.0)		0.00 r (0.00)	0.00 r (0.00)	0.05 r (0.12)	0.00 r (0.00)	0.10 J (0.10)	
7	Kinetin + 2,4-D (1.0 + 1.0)		0.20 qr (0.19)	0.00 r (0.00)	0.17 qr (0.17)	0.00 r (0.00)	0.14 IJ (0.14)	
8	Kinetin + 2,4-D (1.0 + 2.0)		0.00 r (0.00)	0.00 r (0.00)	0.05 r (0.12)	0.00 r (0.00)	0.10 J 0.10)	
9	2,4-D (1.0)		0.00 r (0.00)	0.00 r (0.00)	1.05 mo (0.91)	0.00 r (0.00)	0.33 HI (0.30)	
10	Kontrol		0.00 r (0.00)	0.00 r (0.00)	1.00 no (0.88)	0.00 r (0.00)	0.32 HI (0.29)	
LSD _{Ortam} :0.14***, LSD _{Eksplant} :0.09***, LSD _{Çeşit} :0.06***, LSD _{OrtamxEksplant} :0.28***, LSD _{OrtamxÇeşit} :0.20***, LSD _{EksplantxÇeşit} :0.12***, LSD _{OrtamxEksplantxÇeşit} :0.40***								
Açı transformasyonu sonrası elde edilen değerler parantez içerisinde verilmiştir.								
Grup ortalamaları arasındaki farklılıklar ayrı harfler ile gösterilmiştir.								
Kontrol ortamı BBD içermeyen MS ortamıdır.								
*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001								

MW çeşidinde sürgün uzunluğu değerleri incelendiğinde en iyi sürgün uzunluğunun, 1.0 mg/l kinetin+0.5 mg/l NAA içeren 1 numaralı besin ortamında ve 2.0 mg/l kinetin+0.5 mg/l NAA içeren 2 numaralı besin ortamında, boğum eksplantlarında sırasıyla 3.50 cm ve 3.37 cm olduğu tespit edilmiştir. Eksplant ortalamalarında en yüksek sürgün uzunluğu 1.48 cm ile boğum eksplantından elde edilirken, besin ortamı ortalamalarında ise 1.0 mg/l kinetin+0.5 mg/l NAA içeren 1

numaralı besin ortamında ve 2.0 mg/l kinetin+0.5 mg/l NAA içeren 2 numaralı besin ortamında sırasıyla 1.26 cm ve 1.17 cm olarak saptanmış ve istatistiksel olarak fark önemli çıkmıştır (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.7. *In vitro* rejenerasyon denemeleri sonucunda MW çeşidinde sürgün uzunluğu (cm)

Ortam		Eksplant				BBD Ortalaması
NO	BBD (mg/l)	Yaprak	Dilsi Çiçek	Boğum	Boğum arası	
1	Kinetin (1) + NAA (0.5)	0.95 d (0.84)	0.00 l (0.00)	3.50 a (1.96)	0.52 fi (0.50)	1.26 A (0.82)
2	Kinetin (2) + NAA (0.5)	0.90 de (0.80)	0.00 l (0.00)	3.37 a (1.92)	0.32 ik (0.31)	1.17 A (0.78)
3	BAP (1) + NAA (0.5)	0.72 ef (0.67)	0.55 fh (0.52)	2.12 b (1.48)	0.50 gj (0.47)	0.97 B (0.78)
4	BAP (2) + NAA (0.5)	0.62 fg (0.58)	0.35 hk (0.34)	1.90 c (1.39)	0.47 gj (0.45)	0.83 C (0.69)
5	BAP (1) + 2,4-D (1)	0.55 fh (0.52)	0.30 jl (0.29)	0.00 l (0.00)	0.00 l (0.00)	0.26 G (0.25)
6	BAP (1) + 2,4-D (2)	0.50 gj (0.48)	0.30 jl (0.29)	0.20 kl (0.19)	0.00 l (0.00)	0.27 FG (0.26)
7	Kinetin (1) + 2,4-D (1)	0.65 fg (0.60)	0.00 l (0.00)	0.30 jl (0.28)	0.45 gj (0.43)	0.37 EF (0.35)
8	Kinetin (1) + 2,4-D (2)	0.57 fg (0.54)	0.00 l (0.00)	0.00 l (0.00)	0.35 hk (0.34)	0.28 FG (0.35)
9	2,4-D (1)	0.50 gj (0.48)	0.00 l (0.00)	1.05 d (0.91)	0.00 l (0.00)	0.43 E (0.39)
10	Kontrol	0.00 l (0.00)	0.00 l (0.00)	2.22 b (1.53)	0.00 l (0.00)	0.63 D (0.45)
Eksplant Ortalaması		0.60 B (0.56)	0.21 D (0.20)	1.48 A (0.98)	0.30 C (0.29)	
LSD _{Ortam} :0.10***, LSD _{Eksplant} :0.06***, LSD _{OrtamxEksplant} :0.21*** Açı transformasyonu sonrası elde edilen değerler parantez içerisinde verilmiştir. Grup ortalamaları arasındaki farklılıklar ayrı harfler ile gösterilmiştir. Kontrol ortamı BBD içermeyen MS ortamıdır. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001						

Pusan çeşidinde sürgün uzunluğu değerleri incelendiğinde en iyi sürgün uzunluğunun, 1.0 mg/l 2,4-D içeren 9 numaralı besin ortamında 1.80 cm ile boğum gerçekleşmiştir. Eksplant ortalamalarında en yüksek sürgün uzunluğu 0.83 cm ile boğum eksplantında belirlenerek aradaki fark istatistiksel olarak önemli çıkmıştır. Besin ortamı ortalamalarında ise 1.0 mg/l BAP+0.5 mg/l NAA içeren 3 numaralı besin ortamında bu değer 0.63 cm olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.8).

Çizelge 4.8. *In vitro* rejenerasyon denemeleri sonucunda Pusan çeşidinde sürgün uzunluğu (cm)

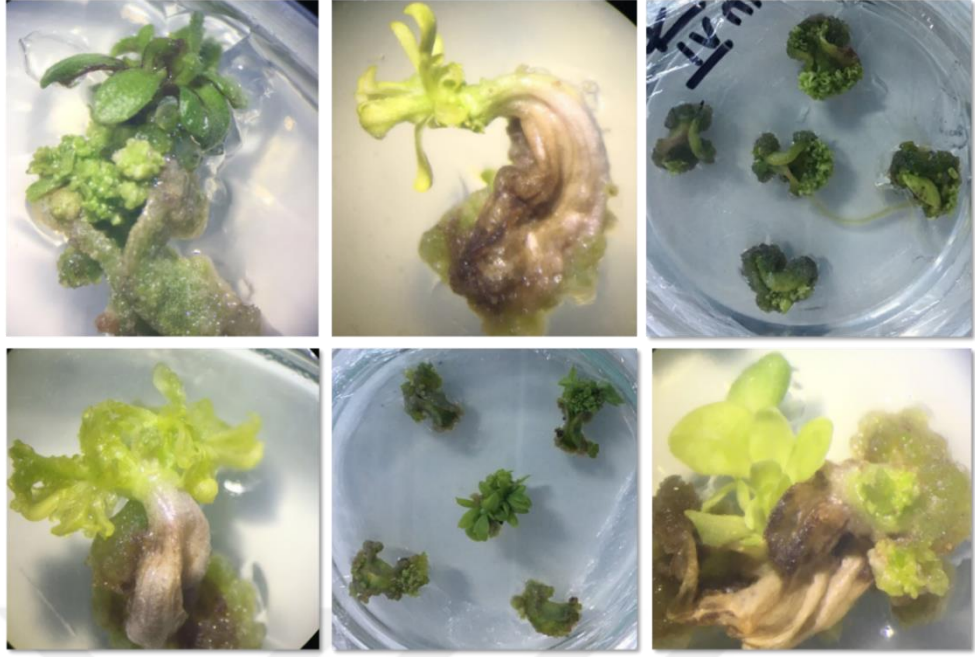
Ortam		Eksplant				BBD Ortalaması
NO	BBD (mg/l)	Yaprak	Dilsi Çiçek	Boğum	Boğum arası	
1	Kinetin (1) + NAA (0.5)	0.00 k (0.00)	0.00 k (0.00)	1.17 c (0.95)	0.25 ik (0.24)	0.40 C (0.35)
2	Kinetin (2) + NAA (0.5)	0.40 gj (0.38)	0.00 k (0.00)	1.40 b (1.13)	0.20 jk (0.19)	0.52 B (0.45)
3	BAP (1) + NAA (0.5)	0.87 de (0.78)	0.00 k (0.00)	0.95 d (0.84)	0.60 fg (0.56)	0.63 A (0.57)
4	BAP (2) + NAA (0.5)	0.67 ef (0.62)	0.00 k (0.00)	0.95 d (0.84)	0.45 gi (0.43)	0.54 AB (0.50)
5	BAP (1) + 2,4-D (1)	0.00 k (0.00)	0.35 hj (0.34)	0.47 fh (0.44)	0.00 k (0.00)	0.25 D (0.24)
6	BAP (1) + 2,4-D (2)	0.00 k (0.00)	0.00 k (0.00)	0.20 jk (0.19)	0.00 k (0.00)	0.12 E (0.12)
7	Kinetin (1) + 2,4-D (1)	0.45 gi (0.43)	0.00 k (0.00)	0.52 fh (0.48)	0.00 k (0.00)	0.29 D (0.28)
8	Kinetin (1) + 2,4-D (2)	0.00 k (0.00)	0.00 k (0.00)	0.20 jk (0.19)	0.00 k (0.00)	0.12 E (0.12)
9	2,4-D (1)	0.00 k (0.00)	0.00 k (0.00)	1.80 a (1.34)	0.00 k (0.00)	0.52 B (0.41)
10	Kontrol	0.00 k (0.00)	0.00 k (0.00)	0.67 ef (0.63)	0.00 k (0.00)	0.24 D (0.23)
Eksplant Ortalaması		0.30 B (0.28)	0.12 D (0.12)	0.83 A (0.70)	0.21 C (0.20)	
LSD _{Ortam} :0.10***, LSD _{Eksplant} :0.06***, LSD _{OrtamxEksplant} :0.20*** Açı transformasyonu sonrası elde edilen değerler parantez içerisinde verilmiştir. Grup ortalamaları arasındaki farklılıklar ayrı harfler ile gösterilmiştir. Kontrol ortamı BBD içermeyen MS ortamıdır. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001						

Farklı BBD'lerin bulunduğu 10 farklı besin ortamında sürgün uzunluğu ile çeşit, ortam ve eksplant arasındaki etkileşimler incelendiğinde (Çizelge 4.9), çeşit bazında MW' ye ait bulgular istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ve 0.65 cm ile en yüksek sürgün uzunluğunu vermiştir. Çeşit*Ortam etkileşiminde ise 1.0 mg/l kinetin+0.5 mg/l NAA içeren 1 numaralı besin ortamından ve 2.0 mg/l kinetin+0.5 mg/l NAA içeren 2 numaralı besin ortamından sırasıyla 1.26 cm ve 1.17 cm ile en yüksek sürgün uzunluğu elde edilmiştir (Çizelge 4.9).

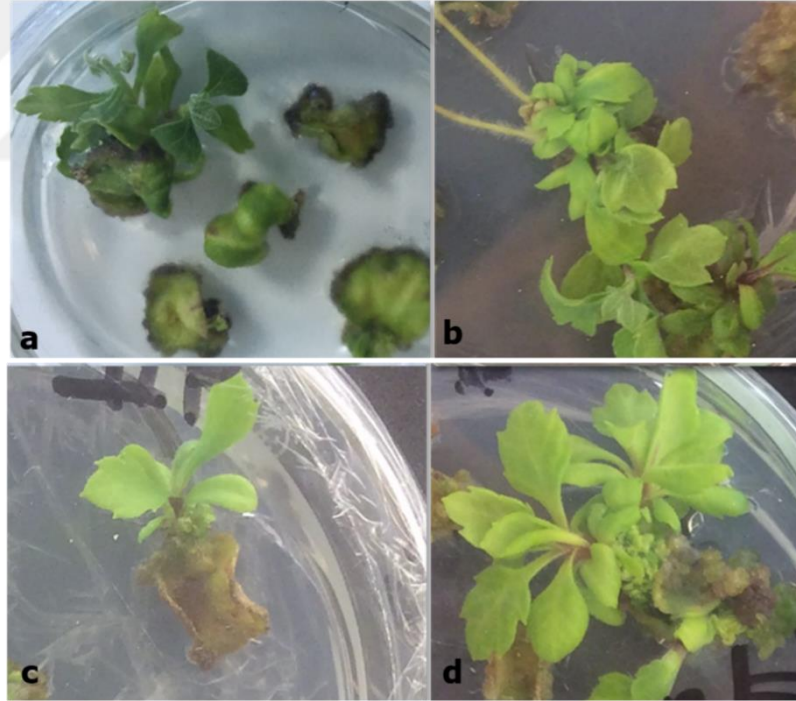
Çizelge 4.9. *In vitro* rejenerasyon denemeleri sonucunda sürgün uzunlukları (cm)

Ortam		Çeşit	Çeşit*Ortam*Eksplant				Çeşit*Ortam	Çeşit
NO	BBD (mg/l)		Yaprak	Dilsi Çiçek	Boğum	Boğum Arası		
1	Kinetin + NAA (1.0 + 0.5)	MW	0.95 f (0.84)	0.00 r (0.00)	3.50 a (1.96)	0.52 in (0.50)	1.26 A (0.85)	0.65 A (0.51)
2	Kinetin + NAA (2.0 + 0.5)		0.90 fg (0.80)	0.00 r (0.00)	3.37 a (1.92)	0.32 nq (0.31)	1.17 A (0.78)	
3	BAP + NAA (1.0 + 0.5)		0.72 gi (0.67)	0.55 im (0.52)	2.12 b (1.48)	0.50 jo (0.47)	0.97 B (0.78)	
4	BAP + NAA (2.0 + 0.5)		0.62 ik (0.58)	0.35 mq (0.34)	1.90 c (1.39)	0.47 jo (0.45)	0.83 C (0.69)	
5	BAP + 2,4-D (1.0 + 1.0)		0.55 im (0.52)	0.30 or (0.29)	0.00 r (0.00)	0.00 r (0.00)	0.26 I (0.25)	
6	BAP + 2,4-D (1.0 + 2.0)		0.50 jo (0.48)	0.30 or (0.29)	0.20 qr (0.19)	0.00 r (0.00)	0.27 HI (0.26)	
7	Kinetin + 2,4-D (1.0 + 1.0)		0.65 ik (0.60)	0.00 r (0.00)	0.30 or (0.28)	0.45 kp (0.43)	0.37 GH (0.35)	
8	Kinetin + 2,4-D (1.0 + 2.0)		0.57 il (0.54)	0.00 r (0.00)	0.00 r (0.00)	0.35 mq (0.34)	0.28 HI (0.27)	
9	2,4-D (1.0)		0.50 jo (0.48)	0.00 r (0.00)	1.05 ef (0.91)	0.00 r (0.00)	0.43 FG (0.39)	
10	Kontrol		0.00 r (0.00)	0.00 r (0.00)	2.22 b (1.53)	0.00 r (0.00)	0.63 D (0.45)	
1	Kinetin + NAA (1.0 + 0.5)	PUSAN	0.00 r (0.00)	0.00 r (0.00)	1.17 e (0.95)	0.25 pr (0.24)	0.40 G (0.35)	0.36 B (0.33)
2	Kinetin + NAA (2.0 + 0.5)		0.40 lq (0.38)	0.00 r (0.00)	1.40 d (1.13)	0.20 qr (0.19)	0.52 F (0.45)	
3	BAP + NAA (1.0 + 0.5)		0.87 fh (0.78)	0.00 r (0.00)	0.95 f (0.84)	0.60 il (0.56)	0.63 D (0.57)	
4	BAP + NAA (2.0 + 0.5)		0.67 hj (0.62)	0.00 r (0.00)	0.95 f (0.84)	0.45 kp (0.43)	0.54 DE (0.50)	
5	BAP + 2,4-D (1.0 + 1.0)		0.00 r (0.00)	0.35 mq (0.34)	0.47 jo (0.44)	0.00 r (0.00)	0.25 I (0.24)	
6	BAP + 2,4-D (1.0 + 2.0)		0.00 r (0.00)	0.00 r (0.00)	0.12 qr (0.19)	0.00 r (0.00)	0.12 J (0.12)	
7	Kinetin + 2,4-D (1.0 + 1.0)		0.45 kp (0.43)	0.00 r (0.00)	0.50 in (0.48)	0.00 r (0.00)	0.29 HI (0.28)	
8	Kinetin + 2,4-D (1.0 + 2.0)		0.00 r (0.00)	0.00 r (0.00)	0.12 qr (0.19)	0.00 r (0.00)	0.12 J (0.12)	
9	2,4-D (1.0)		0.00 r (0.00)	0.00 r (0.00)	1.80 c (1.34)	0.00 r (0.00)	0.52 EF (0.41)	
10	Kontrol		0.00 r (0.00)	0.00 r (0.00)	0.67 hj (0.63)	0.00 r (0.00)	0.24 I (0.23)	
LSDOrtam:0.07***, LSDEksplant:0.04***, LSDÇeşit:0.03***, LSDOrtamxEksplant:0.4***, LSDOrtamxÇeşit:0.10***, LSD EksplantxÇeşit:0.06***, LSDOrtamxEksplantxÇeşit:0.20*** Açı transformasyonu sonrası elde edilen değerler parantez içerisinde verilmiştir. Grup ortalamaları arasındaki farklılıklar ayrı harfler ile gösterilmiştir. Kontrol ortamı BBD içermeyen MS ortamıdır. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001								

Yaprak ve dilsî çiçek eksplantlarına ait rejenerasyon görselleri Şekil 4.6 ve Şekil 4.7’de sunulmuştur.



Şekil 4.6. Yaprak ve dils çiçek eksplantlarından sürgün yapılarının gelişimi (6. hafta)



Şekil 4.7. Yaprak eksplantlarından sürgün yapılarının gelişimi a) MW yaprak eksplantının 1 numaralı besin ortamında gelişimi, b) Pusan yaprak eksplantının 3 numaralı besin ortamında gelişimi, c-d) Pusan yaprak eksplantlarının 4 numaralı besin ortamında gelişimi

Farklı BBD'lerin bulunduğu 10 farklı besin ortamında kasımpatı çeşitlerine ait farklı eksplantlarda kök oluşumları gözlenmiştir (Şekil 4.8 ve şekil 4.9). MW çeşidinde kök oluşum oranları incelendiğinde, kontrol grubunun boğum eksplantlarının tamamının köklendiği dikkat çekmektedir. Eksplant ortalamalarında en yüksek kök oluşumu %34.55 ile yine boğum eksplantında gerçekleşmiştir. Besin ortamı ortalamalarında ise 1.0 mg/l kinetin+2.0 mg/l 2,4-D içeren 8 numaralı besin ortamında %63.75 oranıyla en yüksek değer elde edilmiştir (Çizelge 4.10).

Çizelge 4.10. *In vitro* rejenerasyon denemeleri sonucunda MW çeşidinde kök oluşturan eksplant oranları (%)

Ortam		Eksplant				BBD Ortalaması
NO	BBD (mg/l)	Yaprak	Petal	Boğum	Boğum arası	
1	Kinetin (1) + NAA (0.5)	25.05 hk (24.65)	15.05 ıl (14.76)	15.05 ıl (14.76)	45.02 eh (42.31)	25.03 C (24.12)
2	Kinetin (2) + NAA (0.5)	22.52 ık (22.13)	0.00 l (0.00)	15.07 ıl (14.29)	45.00 eh (43.47)	20.67 C (20.00)
3	BAP (1) + NAA (0.5)	0.00 l (0.00)	0.00 l (0.00)	0.00 l (0.00)	0.00 l (0.00)	0.00 D (0.00)
4	BAP (2) + NAA (0.5)	0.00 l (0.00)	0.00 l (0.00)	0.00 l (0.00)	0.00 l (0.00)	0.00 D (0.00)
5	BAP (1) + 2,4-D (1)	0.00 l (0.00)	0.00 l (0.00)	0.00 l (0.00)	0.00 l (0.00)	0.00 D (0.00)
6	BAP (1) + 2,4-D (2)	5.07 kl (5.00)	0.00 l (0.00)	0.00 l (0.00)	0.00 l (0.00)	1.34 D (1.33)
7	Kinetin (1) + 2,4-D (1)	25.05 hk (23.33)	35.02 fi (31.99)	80.00 ac (72.50)	75.00 bd (69.17)	53.76 AB (49.25)
8	Kinetin (1) + 2,4-D (2)	60.00 ce (55.75)	55.00 df (51.35)	85.00 ab (76.60)	55.00 df (51.35)	63.75 A (58.76)
9	2,4-D (1)	75.00 bd(68.41)	45.00 eh (43.47)	50.00 eg (46.78)	12.57 jl (12.10)	45.65 B (42.69)
10	Kontrol	0.00 l (0.00)	0.00 l (0.00)	100.00 a (88.13)	0.00 l (0.00)	25.07 C (22.10)
Eksplant Ortalaması		21.30 BC (19.97)	15.06 C (14.21)	34.55 A (31.35)	23.31 B (21.89)	

LSD_{Ortam}:12.58***, LSD_{Eksplant}:7.95***, LSD_{OrtamxEksplant}:25.16***
Açı transformasyonu sonrası elde edilen değerler parantez içerisinde verilmiştir.
Grup ortalamaları arasındaki farklılıklar ayrı harfler ile gösterilmiştir.
Kontrol ortamı BBD içermeyen MS ortamıdır.
*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001

Pusan çeşidinde kök oluşum oranları incelendiğinde, yine kontrol grubunun boğum eksplantlarının tamamının köklendiği görülmektedir. Eksplant ortalamalarında en yüksek kök oluşumu boğum ve boğum arası eksplantlarında sırasıyla %48.54 ve %49.03 ile olmuştur. Besin ortamı ortalamalarında ise 1.0 mg/l 2,4-D içeren 9 numaralı besin ortamında %51.28 ile en yüksek oranda köklenme sağlanmıştır (Çizelge 4.11).

Çizelge 4.11. *In vitro* rejenerasyon deneyleri sonucunda Pusan çeşidinde kök oluşturan eksplant oranları (%)

Ortam		Eksplant				BBD Ortalaması
NO	BBD (mg/l)	Yaprak	Petal	Boğum	Boğum arası	
1	Kinetin (1) + NAA (0.5)	0.00 l (0.00)	0.00 l (0.00)	75.00 bd (68.79)	90.00 ab (80.70)	41.30 BC (37.42)
2	Kinetin (2) + NAA (0.5)	0.00 l (0.00)	0.00 l (0.00)	80.00 ac (71.07)	90.00 ab (80.70)	42.55 AC (37.99)
3	BAP (1) + NAA (0.5)	5.07 kl (5.04)	0.00 l (0.00)	0.00 l (0.00)	0.00 l (0.00)	1.34 E (1.33)
4	BAP (2) + NAA (0.5)	5.07 kl (5.04)	0.00 l (0.00)	0.00 l (0.00)	0.00 l (0.00)	1.34 E (1.33)
5	BAP (1) + 2,4-D (1)	0.00 l (0.00)	0.00 l (0.00)	0.00 l (0.00)	30.02 gj (28.96)	7.58 E (7.31)
6	BAP (1) + 2,4-D (2)	0.00 l (0.00)	0.00 l (0.00)	0.00 l (0.00)	25.05 hk (24.02)	6.33 E (6.08)
7	Kinetin (1) + 2,4-D (1)	10.05 jl (9.98)	0.00 l (0.00)	80.00 ac (72.88)	95.00 ab (84.41)	46.28 AB (41.84)
8	Kinetin (1) + 2,4-D (2)	0.00 l (0.00)	0.00 l (0.00)	60.00 ce (56.50)	75.00 bd (69.17)	33.80 CD (31.46)
9	2,4-D (1)	30.05 gj (27.05)	0.00 l (0.00)	90.00 ab (80.70)	85.00 ab (76.98)	51.28 A (46.20)
10	Kontrol	0.00 l (0.00)	0.00 l (0.00)	100.00 a (88.13)	0.00 l (0.00)	25.07 D (22.10)
Eksplant Ortalaması		5.08 B (4.77)	0.00 B (0.00)	48.54 A (43.84)	49.03 A (44.52)	

LSD_{Ortam}:9.49***, LSD_{Eksplant}:6.00***, LSD_{OrtamxEksplant}:18.98***
Açı transformasyonu sonrası elde edilen değerler parantez içerisinde verilmiştir.
Grup ortalamaları arasındaki farklılıklar ayrı harfler ile gösterilmiştir.
Kontrol ortamı BBD içermeyen MS ortamıdır.
*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001

Farklı BBD'lerin bulunduğu 10 farklı besin ortamında bitkilerin köklenme oranları ile çeşit, ortam ve eksplant arasındaki interaksiyonlar incelendiğinde (Çizelge 4.9), çeşit bazında istatistiksel olarak önemli bir farklılık çıkmamıştır. Çeşit*Ortam interaksiyonunda ise 1.0 mg/l kinetin+2.0 mg/l 2,4-D içeren 8 numaralı besin ortamından %63.75 ile en yüksek köklenme elde edilmiştir (Çizelge 4.12).

Çizelge 4.12. *In vitro* rejenerasyon denemeleri sonucunda kök oluşturan eksplant oranları (%)

Ortan		Çeşit	Çeşit*Ortam*Eksplant				Çeşit*Ortam	Çeşit
NO	BBD (mg/l)		Yaprak	Dilsi Çiçek	Boğum	Boğum Arası		
1	Kinetin + NAA (1.0 + 0.5)	MW	25.05 hk (24.65)	15.05 ıl (14.76)	15.05 ıl (14.76)	45.02 eh (42.31)	25.03 EF (24.12)	23.55 A (21.85)
2	Kinetin + NAA (2.0 + 0.5)		22.52 ık (22.13)	0.00 l (0.00)	15.07 ıl (14.29)	45.00 eh (43.47)	20.67 F (20.00)	
3	BAP + NAA (1.0 + 0.5)		0.00 l (0.00)	0.00 l (0.00)	0.00 l (0.00)	0.00 l (0.00)	0.00 G (0.00)	
4	BAP + NAA (2.0 + 0.5)		0.00 l (0.00)	0.00 l (0.00)	0.00 l (0.00)	0.00 l (0.00)	0.00 G (0.00)	
5	BAP + 2,4-D (1.0 + 1.0)		0.00 l (0.00)	0.00 l (0.00)	0.00 l (0.00)	0.00 l (0.00)	0.00 G (0.00)	
6	BAP + 2,4-D (1.0 + 2.0)		5.07 kl (5.00)	0.00 l (0.00)	0.00 l (0.00)	0.00 l (0.00)	1.34 G (1.33)	
7	Kinetin + 2,4-D (1.0 + 1.0)		25.05 hk (23.33)	35.02 fi (31.99)	80.00 ac (72.50)	75.00 bd (69.17)	53.76 AB (49.25)	
8	Kinetin + 2,4-D (1.0 + 2.0)		60.00 ce (55.75)	55.00 df (51.35)	85.00 ab (76.60)	55.00 df (51.35)	63.75 A (58.76)	
9	2,4-D (1.0)		75.00 bd (68.41)	45.00 eh (43.47)	50.00 eg (46.78)	12.57 jl (12.10)	45.65 BC (42.69)	
10	Kontrol		0.00 l (0.00)	0.00 l (0.00)	100.00 a (88.13)	0.00 l (0.00)	25.07 EF (22.10)	
1	Kinetin + NAA (1.0 + 0.5)	PUSAN	0.00 l (0.00)	0.00 l (0.00)	75.00 bd (68.79)	90.00 ab (80.70)	41.30 CD (37.42)	25.69 A (23.31)
2	Kinetin + NAA (2.0 + 0.5)		0.00 l (0.00)	0.00 l (0.00)	80.00 ac (71.07)	90.00 ab (80.70)	42.55 CD (37.99)	
3	BAP + NAA (1.0 + 0.5)		5.07 kl (5.04)	0.00 l (0.00)	0.00 l (0.00)	0.00 l (0.00)	0.00 G (0.00)	
4	BAP + NAA (2.0 + 0.5)		5.07 kl (5.04)	0.00 l (0.00)	0.00 l (0.00)	0.00 l (0.00)	1.34 G (1.33)	
5	BAP + 2,4-D (1.0 + 1.0)		0.00 l (0.00)	0.00 l (0.00)	0.00 l (0.00)	30.02 gj (28.96)	7.58 G (7.31)	
6	BAP + 2,4-D (1.0 + 2.0)		0.00 l (0.00)	0.00 l (0.00)	0.00 l (0.00)	25.05 hk (24.02)	6.33 G (6.08)	
7	Kinetin + 2,4-D (1.0 + 1.0)		10.05 jl (9.98)	0.00 l (0.00)	80.00 ac (72.88)	95.00 ab (84.41)	46.28 BC (41.84)	
8	Kinetin + 2,4-D (1.0 + 2.0)		0.00 l (0.00)	0.00 l (0.00)	60.00 ce (56.50)	75.00 bd (69.17)	33.80 DE (31.46)	
9	2,4-D (1.0)		30.05 gj (27.05)	0.00 l (0.00)	90.00 ab (80.70)	85.00 ab (76.98)	51.28 BC(46.20)	
10	Kontrol		0.00 L (0.00)	0.00 L (0.00)	100.00 A (88.13)	0.00 L (0.00)	25.07 EF (22.10)	

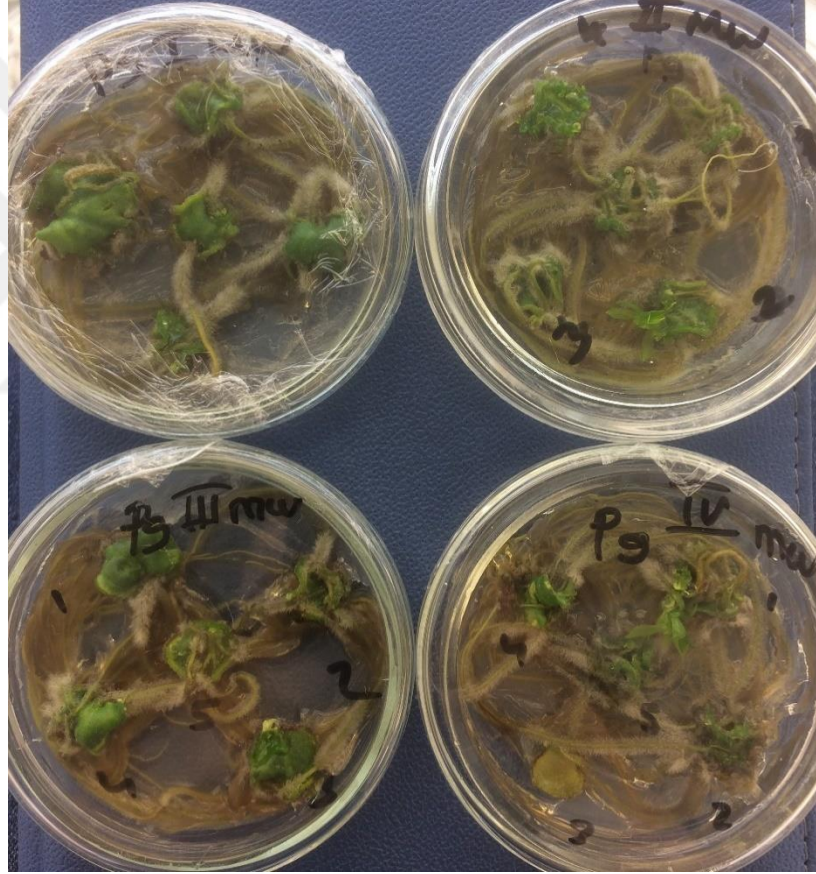
LSD_{Ortam}:7.84***, LSD_{Eksplant}:4.95***, LSD_{Çeşit}:Ö.D., LSD_{Ortamx_{Eksplant}}:15.68***, LSD_{Ortamx_{Çeşit}}:11.08***, LSD_{Eksplantx_{Çeşit}}:7.01***, LSD_{Ortamx_{Eksplant}x_{Çeşit}}:22.17***

Açı transformasyonu sonrası elde edilen değerler parantez içerisinde verilmiştir.
Grup ortalamaları arasındaki farklılıklar ayrı harfler ile gösterilmiştir.
Kontrol ortamı BBD içermeyen MS ortamıdır.

*P<0.05. **P<0.01. ***P<0.001



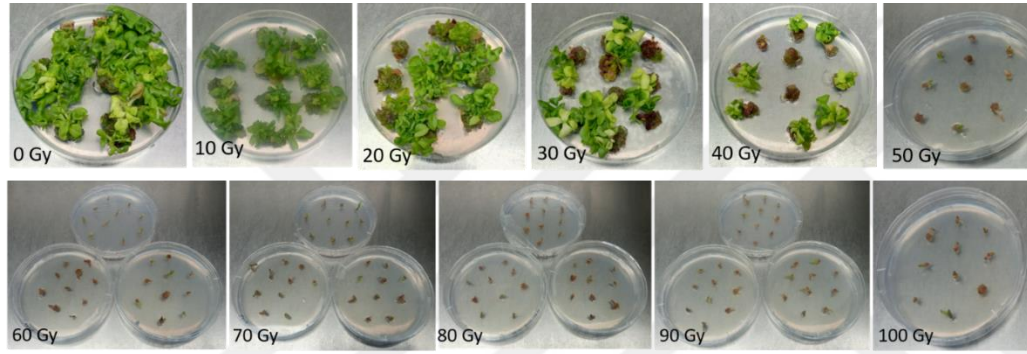
Şekil 4.8. Boğum (solda) ve yaprak (sağda) eksplantlarında rhizogenesis



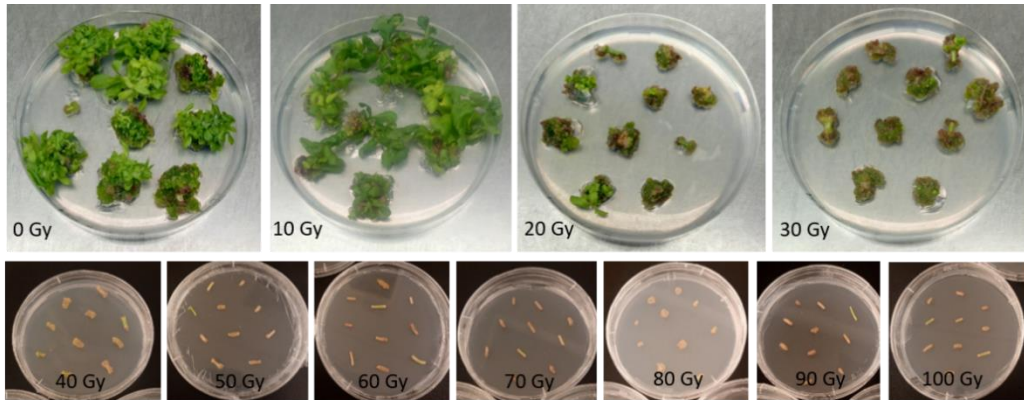
Şekil 4.9. MW çeşidi yaprak eksplantında 1.0 mg/l 2,4-D içeren 9 numaralı besin ortamında köklenme (8 hafta sonra)

4.2 In Vitro Fiziksel Mutagen Uygulamasına Ait Bulgular

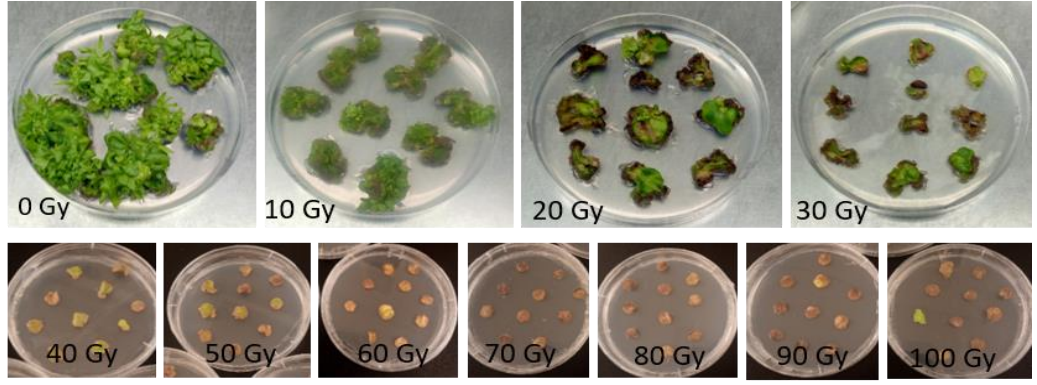
Kasımpatı çeşitlerinin dört farklı eksplantında farklı gama ışını dozları uygulanmıştır. Dilsî çiçek eksplantlarında ışınlamaların ardından meydana gelen enfeksiyonlar nedeniyle rejenerasyon sağlanamamıştır. 10 farklı dozda gama ışını uygulanan yaprak, boğum ve boğum arası eksplantlarında ise ışınlama sonrası canlı eksplant oranı (%), gelişen eksplant oranı (%) ve eksplant başına düşen sürgün sayısı gibi parametreler değerlendirilmiştir. Gama ışınlamaları kapsamında canlı eksplant oranlarına ait görseller Şekil 4.10, 4.11 ve 4.12’de ve istatistiki veriler Çizelge 4.13, 4.14 ve 4.15’ de sunulmuştur.



Şekil 4.10. MW çeşidinin boğum eksplantlarında farklı gama ışını dozlarının rejenerasyon üzerine etkisi



Şekil 4.11. MW çeşidinin boğum arası eksplantlarında farklı gama ışını dozlarının rejenerasyon üzerine etkisi



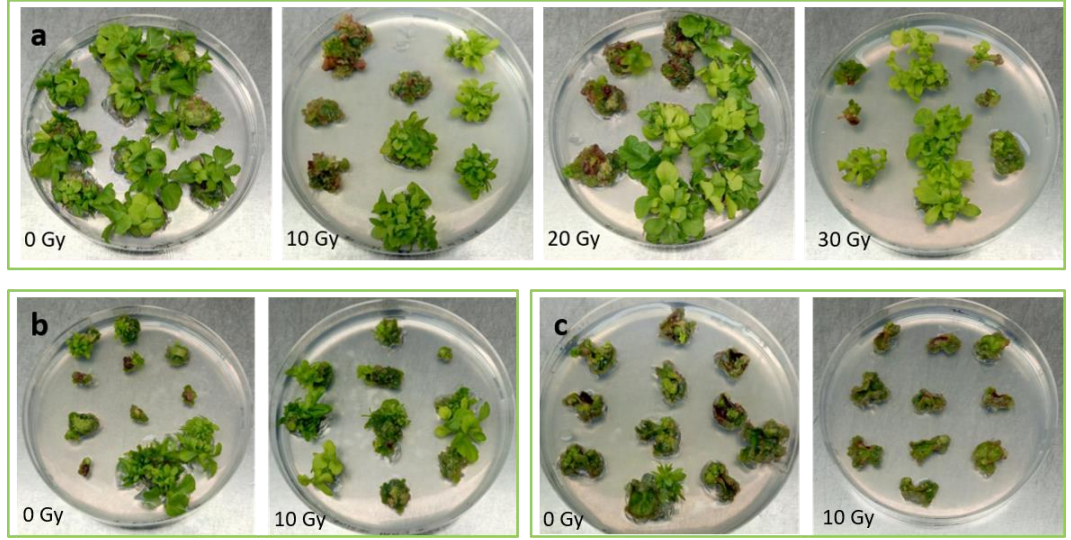
Şekil 4.12. MW çeşidinin yaprak eksplantlarında farklı gama ışını dozlarının rejenerasyon üzerine etkisi

Çizelge 4.13'e bakıldığında MW kasımpatı çeşidinde gama ışınlamaları ardından en yüksek canlılık, ışın uygulanmayan kontrol grubunda boğum ve boğum arası eksplantlarında sırasıyla %100.00 ve %93.33 olarak ve 10 Gy ile ışınlanan boğum ve boğum arası eksplantlarında ise %100.00 olarak tespit edilmiştir. Gama ışını dozu ortalamalarında yine kontrol ve 10 Gy'de en yüksek canlı eksplant oranları elde edilmiştir (sırasıyla %88.88 ve % 84.44). Eksplant ortalamalarında ise %41.21 ile boğum eksplantı öne çıkmıştır. Yaprak eksplantlarında 30 Gy ve üzerinde, boğum eksplantlarında 60 Gy ve 90 Gy dozlarında, boğum arası eksplantlarında ise 40 Gy ve üzerinde canlı eksplant elde edilememiştir. (Çizelge 4.13).

Çizelge 4.13. Gama ışınlamaları sonrası MW çeşidinde canlı eksplant oranı (%)

Gama Işını Dozu (Gy)	Eksplant			Gy Ortalama
	Yaprak	Boğum	Boğum arası	
0 (Kontrol)	73.33 b (67.80)	100.00 a (88.13)	93.33 a (83.30)	88.88 A (79.74)
10	53.33 c (50.92)	100.00 a (88.13)	100.00 a (88.13)	84.44 A (75.73)
20	13.33 ef (13.27)	76.66 b (70.60)	33.33 d (32.71)	41.11 B (38.86)
30	0.00 k (0.00)	73.33 bc (67.93)	10.00 eg (9.99)	27.77 C (26.00)
40	0.00 k (0.00)	73.33 bc (67.93)	0.00 k (0.00)	24.44 C (22.71)
50	0.00 k (0.00)	3.33 jk (3.39)	0.00 k (0.00)	1.11 DE (1.19)
60	0.00 k (0.00)	0.00 k (0.00)	0.00 k (0.00)	0.00 E (0.00)
70	0.00 k (0.00)	16.66 gı (16.51)	0.00 k (0.00)	5.55 D (5.57)
80	0.00 k (0.00)	3.33 jk (3.39)	0.00 k (0.00)	1.11 DE (1.19)
90	0.00 k (0.00)	0.00 k (0.00)	0.00 k (0.00)	0.00 E (0.00)
100	0.00 k (0.00)	6.66 ık (6.68)	0.00 k (0.00)	2.22 DE (2.29)
Eksplant Ortalaması	12.72 C (12.07)	41.21 A (37.53)	21.51 B (19.53)	
LSD _{Uygulama} :5.18***, LSD _{Eksplant} :2.70***, LSD _{UygulamaxEksplant} :8.97*** Açı transformasyonu sonrası elde edilen değerler parantez içerisinde verilmiştir. Grup ortalamaları arasındaki farklılıklar ayrı harfler ile gösterilmiştir. Kontrol ortamı BBD içermeyen MS ortamıdır. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001				

Gama ışınlamaları kapsamında Pusan kasımpatı çeşidinin farklı eksplantlarında canlı eksplant oranlarına ait görseller Şekil 4.13’de sunulmuştur.



Şekil 4.13. Pusan çeşidinde a) boğum, b) boğum arası ve c) yaprak eksplantlarında farklı gama ışını dozlarında rejenerasyon durumları

Pusan kasımpatı çeşidinde gama ışınlamaları ardından en yüksek canlılık, ışın uygulanmayan kontrol grubunun boğum eksplantında %100.00 olarak elde edilmiştir. Gama ışını dozu ortalamalarında en yüksek canlı eksplant oranı %63.33 ile kontrol grubunda gözlenmiştir ve 10 Gy ve 20 Gy dozları bunu takip etmiştir. Eksplant ortalamalarında ise %29.39 ile boğum eksplantı en iyi canlı eksplant oranın veren eksplant olmuştur. Pusan kasımpatı çeşidinin yaprak eksplantında 20 Gy ve üzerinde, boğum arası eksplantında 30 Gy ve üzerinde, boğum eksplantında ise 40 Gy ve üzerinde canlı eksplant gözlenmemiştir (Çizelge 4.14).

Çizelge 4.14. Gama ışınlamaları sonrası Pusan çeşidinde canlı eksplant oranı (%)

Gama Işını Dozu (Gy)	Eksplant			Gy Ortalama
	Yaprak	Boğum	Boğum arası	
0 (Kontrol)	26.66 fg (26.33)	100.00 a (88.13)	63.33 cd (59.04)	63.33 A (57.83)
10	13.33 ef (13.27)	50.00 e (47.33)	63.33 cd (59.55)	42.22 B (40.05)
20	0.00 k (0.00)	96.66 a (85.72)	20.00 gh (19.65)	38.8 B (35.15)
30	0.00 k (0.00)	76.66 b (70.34)	0.00 k (0.00)	25.5 C (23.51)
40	0.00 k (0.00)	0.00 k (0.00)	0.00 k (0.00)	0.00 D (0.00)
50	0.00 k (0.00)	0.00 k (0.00)	0.00 k (0.00)	0.00 D (0.00)
60	0.00 k (0.00)	0.00 k (0.00)	0.00 k (0.00)	0.00 D (0.00)
70	0.00 k (0.00)	0.00 k (0.00)	0.00 k (0.00)	0.00 D (0.00)
80	0.00 k (0.00)	0.00 k (0.00)	0.00 k (0.00)	0.00 D (0.00)
90	0.00 k (0.00)	0.00 k (0.00)	0.00 k (0.00)	0.00 D (0.00)
100	0.00 k (0.00)	0.00 k (0.00)	0.00 k (0.00)	0.00 D (0.00)
Eksplant Ortalaması	3.63 C (3.68)	29.39 A (26.56)	13.33 B (12.64)	
LSD _{Uygulama} :7.50***, LSD _{Eksplant} :3.92***, LSD _{UygulamaEksplant} :13.00*** Açı transformasyonu sonrası elde edilen değerler parantez içerisinde verilmiştir. Grup ortalamaları arasındaki farklılıklar ayrı harfler ile gösterilmiştir. Kontrol ortamı BBD içermeyen MS ortamıdır. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001				

Farklı gama ışını dozları ile ışınlanan eksplantların canlılık oranları (%) ile çeşit, uygulama ve eksplant arasındaki interaksyonlar incelendiğinde (Çizelge 4.15), çeşit bazında MW'ye ait değerler arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ve %25.15 ile en yüksek canlılık oranı saptanmıştır. Çeşit*Uygulama interaksyonunda ise 0 ve 10 Gy ışınlamalarında en yüksek canlılık oranları tespit edilmiştir.

Çizelge 4.15. Gama ışınlamaları sonrası canlı eksplant oranları (%)

Gama Işını Dozu (Gy)	Çeşit	Çeşit*Uygulama*Eksplant			Çeşit*Uygulama	Çeşit
		Yaprak	Boğum	Boğum Arası		
0 (Kontrol)	MW	73.33 b (67.80)	100.00 a (88.13)	93.33 a (83.30)	88.88 A (79.74)	25.15 A (23.04)
10		53.33 c (50.92)	100.00 a (88.13)	100.00 a (88.13)	84.44 A (75.73)	
20		13.33 ef (13.27)	76,66 b (70.60)	33.33 d (32.71)	41.11 C (38.86)	
30		0.00 k (0.00)	73.33 bc (67.93)	10.00 eg (9.99)	27.77 D (26.00)	
40		0.00 k (0.00)	73.33 bc (67.93)	0.00 k (0.00)	24.44 D (22.71)	
50		0.00 k (0.00)	3.33 jk (3.39)	0.00 k (0.00)	1.11 E (1.19)	
60		0.00 k (0.00)	0.00 k (0.00)	0.00 k (0.00)	0.00 E (0.00)	
70		0.00 k (0.00)	16.66 gı (16.51)	0.00 k (0.00)	5.55 E (5.57)	
80		0.00 k (0.00)	3.33 jk (3.39)	0.00 k (0.00)	1.11 E (1.19)	
90		0.00 k (0.00)	0.00 k (0.00)	0.00 k (0.00)	0.00 E (0.00)	
100		0.00 k (0.00)	6.66 ık (6.68)	0.00 k (0.00)	2.22 E (7.43)	
0		PUSAN	26.66 fg (26.33)	100.00 a (88.13)	63.33 cd (59.04)	
10	13.33 ef (13.27)		50.00 e (47.33)	63.33 cd (59.55)	42.22 C (40.05)	
20	0.00 k (0.00)		96.66 a (85.72)	20.00 gh (19.65)	38.88 C (35.15)	
30	0.00 k (0.00)		76.66 b (70.34)	0.00 k (0.00)	25.55 D (23.51)	
40	0.00 k (0.00)		0.00 k (0.00)	0.00 k (0.00)	0.00 E (0.00)	
50	0.00 k (0.00)		0.00 k (0.00)	0.00 k (0.00)	0.00 E (0.00)	
60	0.00 k (0.00)		0.00 k (0.00)	0.00 k (0.00)	0.00 E (0.00)	
70	0.00 k (0.00)		0.00 k (0.00)	0.00 k (0.00)	0.00 E (0.00)	
80	0.00 k (0.00)		0.00 k (0.00)	0.00 k (0.00)	0.00 E (0.00)	
90	0.00 k (0.00)		0.00 k (0.00)	0.00 k (0.00)	0.00 E (0.00)	
100	0.00 k (0.00)		0.00 k (0.00)	0.00 k (0.00)	0.00 E (0.00)	

LSD_{Uygulama}:4.51***, LSD_{Eksplant}:2.35***, LSD_{Çeşit}:1.92***, LSD_{UygulamaEksplant}:7.82***, LSD_{UygulamaÇeşit}:6.39***, LSD_{EksplantÇeşit}:Ö.D., LSD_{UygulamaEksplantÇeşit}:11.06***

Açı transformasyonu sonrası elde edilen değerler parantez içerisinde verilmiştir.

Grup ortalamaları arasındaki farklılıklar ayrı harfler ile gösterilmiştir.

Kontrol ortamı BBD içermeyen MS ortamıdır.

Ö.D.:Önemli değil

*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001

Gama ışınlamaları ardından canlı kalan bazı eksplantlar büyümelerine devam ederken, bazıları gelişme göstermemişlerdir. Çizelge 4.16, 4.17 ve 4.18’de gama ışınlamaları ardından gelişen eksplant oranları sunulmuştur. MW çeşidine bakıldığında 10 Gy ile ışınlanan ve canlılık gösteren boğum ve boğum arası eksplantları sırasıyla %100.00 ve %93.33 oranlarında gelişim göstererek en yüksek gelişim gösteren eksplantlar olmuştur. Gama ışını dozu uygulamalarında ise gelişim gösteren eksplantların ortalamaları en yüksek 10 Gy ile ışınlananlarda tespit edilmiştir. Eksplant ortalamalarında ise boğum eksplantı ışınlamaların ardından en fazla gelişen eksplant türü olmuştur (Çizelge 4.16).

Çizelge 4.16. Gama ışınlamaları sonrası MW çeşidinde gelişen eksplant oranı (%)

Gama Işını Dozu (Gy)	Eksplant			Gy ortalama
	Yaprak	Boğum	Boğum arası	
0 (Kontrol)	73.33 c (67.80)	83.33 b (75.68)	60.00 d (56.38)	72.22 B (66.62)
10	40.00 e (39.00)	100.00 a (88.13)	93.33 a (83.30)	77.77 A (70.14)
20	6,70 f (6.68)	76.66 bc (70.60)	6,70 f (6.68)	30.02 C (27.99)
30	0.00 f (0.00)	63.33 d (59.55)	6,70 f (6.68)	23.37 D (22.11)
40	0.00 f (0.00)	73.33 c (67.93)	0.00 f (0.00)	24.51 D (22.71)
50	0.00 f (0.00)	0.00 f (0.00)	0.00 f (0.00)	0.00 E (0.00)
60	0.00 f (0.00)	0.00 f (0.00)	0.00 f (0.00)	0.00 E (0.00)
70	0.00 f (0.00)	0.00 f (0.00)	0.00 f (0.00)	0.00 E (0.00)
80	0.00 f (0.00)	0.00 f (0.00)	0.00 f (0.00)	0.00 E (0.00)
90	0.00 f (0.00)	0.00 f (0.00)	0.00 f (0.00)	0.00 E (0.00)
100	0.00 f (0.00)	0.00 f (0.00)	0.00 f (0.00)	0.00 E (0.00)
Eksplant Ortalaması	10.98 C (10.39)	36.11 A (32.95)	15.22 (13.97)	0.00 E (0.00)
LSD _{Uygulama} :5.17***, LSD _{Eksplant} :2.70***, LSD _{UygulamaxEksplant} :8.96*** Açık transformasyonu sonrası elde edilen değerler parantez içerisinde verilmiştir. Grup ortalamaları arasındaki farklılıklar ayrı harfler ile gösterilmiştir. Kontrol ortamı BBD içermeyen MS ortamıdır. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001				

Pusan çeşidine ait veriler incelendiğinde, ışınlama yapılmayan kontrol grubundaki boğum eksplantları %96.66 oranında gelişme ile en yüksek gelişen eksplant oranını vermiştir. Gama ışını dozu uygulamalarında ise gelişim gösteren eksplantların ortalamaları en yüksek ışınlanmayan kontrol grubunda tespit edilmiştir. Eksplant ortalamalarına göre ise boğum eksplantı ışınlamaların ardından en fazla gelişen eksplant türü olmuştur (Çizelge 4.17).

Çizelge 4.17. Gama ışınlamaları sonrası Pusan çeşidinde gelişen eksplant oranı (%)

Gama Işını Dozu (Gy)	Eksplant			Gy ortalama
	Yaprak	Boğum	Boğum arası	
0 (Kontrol)	10.03 ef (9.98)	96.66 a (85.72)	30.00 d (29.56)	45.56 A (41.75)
10	0.00 f (0.00)	40.00 cd (38.58)	50.00 c (48.00)	30.03 B (28.89)
20	0.00 f (0.00)	83.33 b (75.30)	16.70 e (16.51)	33.37 B (30.63)
30	0.00 f (0.00)	46.66 c (44.54)	0.00 f (0.00)	15.62 C (14.91)
40	0.00 f (0.00)	0.00 f (0.00)	0.00 f (0.00)	0.00 D (0.00)
50	0.00 f (0.00)	0.00 f (0.00)	0.00 f (0.00)	0.00 D (0.00)
60	0.00 f (0.00)	0.00 f (0.00)	0.00 f (0.00)	0.00 D (0.00)
70	0.00 f (0.00)	0.00 f (0.00)	0.00 f (0.00)	0.00 D (0.00)
80	0.00 f (0.00)	0.00 f (0.00)	0.00 f (0.00)	0.00 D (0.00)
90	0.00 f (0.00)	0.00 f (0.00)	0.00 f (0.00)	0.00 D (0.00)
100	0.00 f (0.00)	0.00 f (0.00)	0.00 f (0.00)	0.00 D (0.00)
Eksplant Ortalaması	1.00 C (0.99)	24.30 A (22.25)	8.86 B (8.62)	
LSD _{Uygulama} :7.00***, LSD _{Eksplant} :3.66***, LSD _{UygulamaxEksplant} :12.14*** Açı transformasyonu sonrası elde edilen değerler parantez içerisinde verilmiştir. Grup ortalamaları arasındaki farklılıklar ayrı harfler ile gösterilmiştir. Kontrol ortamı BBD içermeyen MS ortamıdır. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001				

Farklı gama ışını dozları ile ışınlanan eksplantların gelişme oranları (%) ile çeşit, uygulama ve eksplant arasındaki etkileşimler incelendiğinde (Çizelge 4.18), çeşit bazında MW istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ve %20.77 ile en yüksek canlılık oranını vermiştir. Çeşit*Uygulama etkileşiminde ise 0 ve 10 Gy ışınlamalarında en yüksek gelişen eksplant oranları sırasıyla %72.22 ve %77.77 olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 4.18. Gama ışınlamaları sonrası gelişen eksplant oranları (%)

Gama Işını Dozu (Gy)	Çeşit	Çeşit*Uygulama*Eksplant			Çeşit*Uygulama	Çeşit
		Yaprak	Boğum	Boğum Arası		
0 (Kontrol)	MW	73.33 cd (67.80)	83.33 bc (75.68)	60.00 ef (56.38)	72.22 A (66.62)	20.77 A (19.10)
10		40.00 gh (39.00)	100.00 a (88.13)	93.33 ab (83.30)	77.77 A (70.14)	
20		6,70 ij (6.68)	76.66 c (70.60)	6,70 ij (6.68)	30.02 CD (27.99)	
30		0.00 j (0.00)	63.33 de (59.55)	6,70 ij (6.68)	23.37 E (22.11)	
40		0.00 j (0.00)	73.33 cd (67.93)	0.00 j (0.00)	24.51 DE (22.71)	
50		0.00 j (0.00)	0.00 j (0.00)	0.00 j (0.00)	0.00 G (0.00)	
60		0.00 j (0.00)	0.00 j (0.00)	0.00 j (0.00)	0.00 G (0.00)	
70		0.00 j (0.00)	0.00 j (0.00)	0.00 j (0.00)	0.00 G (0.00)	
80		0.00 j (0.00)	0.00 j (0.00)	0.00 j (0.00)	0.00 G (0.00)	
90		0.00 j (0.00)	0.00 j (0.00)	0.00 j (0.00)	0.00 G (0.00)	
100		0.00 j (0.00)	0.00 j (0.00)	0.00 j (0.00)	0.00 G (0.00)	
0		PUSAN	10.03 ij (9.98)	96.66 a (85.72)	30.00 h (29.56)	
10	0.00 j (0.00)		40.00 gh (38.58)	50.00 fg (48.00)	30.03 CD (28.89)	
20	0.00 j (0.00)		83.33 bc (75.30)	16.70 ı (16.51)	33.37 C (30.63)	
30	0.00 j (0.00)		46.66 g (44.54)	0.00 j (0.00)	15.62 F (14.91)	
40	0.00 j (0.00)		0.00 j (0.00)	0.00 j (0.00)	0.00 G (0.00)	
50	0.00 j (0.00)		0.00 j (0.00)	0.00 j (0.00)	0.00 G (0.00)	
60	0.00 j (0.00)		0.00 j (0.00)	0.00 j (0.00)	0.00 G (0.00)	
70	0.00 j (0.00)		0.00 j (0.00)	0.00 j (0.00)	0.00 G (0.00)	
80	0.00 j (0.00)		0.00 j (0.00)	0.00 j (0.00)	0.00 G (0.00)	
90	0.00 j (0.00)		0.00 j (0.00)	0.00 j (0.00)	0.00 G (0.00)	
100	0.00 j (0.00)		0.00 j (0.00)	0.00 j (0.00)	0.00 G (0.00)	

LSD_{Uygulama}:4.31***, LSD_{Eksplant}:2.25***, LSD_{Çeşit}:1.84***, LSD_{Uygulama*Eksplant}:7.47***, LSD_{Uygulama*Çeşit}:6.10 ***,LSD_{Eksplant*Çeşit}:
Ö.D.: LSD_{Uygulama*Eksplant*Çeşit}:10.57***
Açı transformasyonu sonrası elde edilen değerler parantez içerisinde verilmiştir.
Grup ortalamaları arasındaki farklılıklar ayrı harfler ile gösterilmiştir.
Kontrol ortamı BBD içermeyen MS ortamıdır.
Ö.D.:Önemli değil
*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001

MW çeşidinde gama ışınlamaları ardından eksplant başına düşen sürgün sayısı, ışın uygulanmayan kontrol grubunun yaprak eksplantında 10.53 adet olarak tespit edilmiştir. Gama ışını dozu ortalamalarında en yüksek eksplant başına düşen sürgün sayısı 6.54 adet ile yine kontrol grubundan elde edilmiştir. 10 Gy ve 20 Gy dozları bunu takip etmiştir. Eksplant ortalamalarındaki fark ise istatistiksel olarak önemsiz çıkmıştır (Çizelge 4.19).

Çizelge 4.19. Gama ışınlamaları sonrası MW çeşidinde eksplant başına düşen sürgün sayısı (adet)

Gama Işını Dozu (Gy)	Eksplant			Gy ortalama
	Yaprak	Boğum	Boğum arası	
0 (Kontrol)	10.53 a (3.03)	2.86 ef (1.75)	6.23 b (2.52)	6.54 A (2.44)
10	4.26 cd (2.13)	3.36 de (1.92)	4.90 c (2.26)	4.17 B (2.10)
20	2.86 ef (1.44)	2.90 ef (1.75)	2.66 ef (1.69)	2.81 C (1.62)
30	0.00 h (0.00)	2.16 ef (1.50)	1.70 fg (1.12)	1.32 D (0.90)
40	0.00 h (0.00)	2.96 df (1.79)	0.00 h (0.00)	1.05 D (0.66)
50	0.00 h (0.00)	0.40 gh (0.36)	0.00 h (0.00)	0.20 E (18.66)
60	0.00 h (0.00)	0.00 h (0.00)	0.00 h (0.00)	0.00 E (0.00)
70	0.00 h (0.00)	0.70 gh (0.62)	0.00 h (0.00)	0.30 E (27.35)
80	0.00 h (0.00)	0.40 gh (0.36)	0.00 h (0.00)	0.20 E (18.66)
90	0.00 h (0.00)	0.00 h (0.00)	0.00 h (0.00)	0.00 E (0.00)
100	0.00 h (0.00)	0.70 gh (0.62)	0.00 h (0.00)	0.30 E (27.35)
Eksplant Ortalaması	1.67 A (0.67)	1.51 A (0.99)	1.47 A (0.75)	
LSD _{Uygulama} :0.75***, LSD _{Eksplant} :Ö.D., LSD _{Uygulama×Eksplant} :1.30*** Açı transformasyonu sonrası elde edilen değerler parantez içerisinde verilmiştir. Grup ortalamaları arasındaki farklılıklar ayrı harfler ile gösterilmiştir. Kontrol ortamı BBD içermeyen MS ortamıdır. Ö.D.:Önemli değil *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001				

Pusan çeşidinde gama ışınlamaları ardından eksplant başına düşen sürgün sayısı, ışın uygulanmayan kontrol grubunun boğum eksplantında 6.13 adet olarak tespit edilmiştir. Gama ışını dozu ortalamalarında en yüksek eksplant başına düşen sürgün sayısı 4.31 adet ile yine kontrol grubundan elde edilmiştir. Eksplant ortalamalarında ise sürgün sayıları boğum ve boğum arası eksplantlarında sırasıyla 1.52 ve 1.14 adet olarak tespit edilmiş ve farklar istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (Çizelge 4.20).

Çizelge 4.20. Gama ışınlamaları sonrası Pusan çeşidinde eksplant başına düşen sürgün sayısı (adet)

Gama Işını Dozu (Gy)	Eksplant			Gy ortalama
	Yaprak	Boğum	Boğum arası	
0 (Kontrol)	2.70 de (1.70)	6.13 a (2.51)	4.10 bc (1.89)	4.31 A (2.03)
10	1.83 e (1.32)	3.86 bd (2.02)	4.93 ab (2.29)	3.54 B (1.88)
20	0.00 f (0.00)	3.23 cd (1.88)	2.80 de (1.44)	2.04 C (1.14)
30	0.09 f (0.00)	2.83 de (1.73)	0.00 f (0.00)	1.01 D (0.64)
40	0.00 f (0.00)	0.00 f (0.00)	0.09 f (0.00)	0.00 E (0.00)
50	0.09 f (0.00)	0.09 f (0.00)	0.00 f (0.00)	0.00 E (0.00)
60	0.00 f (0.00)	0.00 f (0.00)	0.09 f (0.00)	0.00 E (0.00)
70	0.00 f (0.00)	0.09 f (0.00)	0.00 f (0.00)	0.00 E (0.00)
80	0.09 f (0.00)	0.00 f (0.00)	0.09 f (0.00)	0.00 E (0.00)
90	0.00 f (0.00)	0.09 f (0.00)	0.00 f (0.00)	0.00 E (0.00)
100	0.09 f (0.00)	0.00 f (0.00)	0.00 f (0.00)	0.00 E (0.00)
Eksplant Ortalaması	0.49 B (0.35)	1.52 A (0.80)	1.14 A (0.58)	
LSD _{Uygulama} :0.73***, LSD _{Eksplant} :0.38***, LSD _{UygulamaEksplant} :1.26*** Açılı transformasyonu sonrası elde edilen değerler parantez içerisinde verilmiştir. Grup ortalamaları arasındaki farklılıklar ayrı harfler ile gösterilmiştir. Kontrol ortamı BBD içermeyen MS ortamıdır. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001				

Farklı gama ışını dozları ile ışınlanan eksplantların eksplant başına düşen sürgün sayıları (adet) ile çeşit, uygulama ve eksplant arasındaki etkileşimler

incelendiğinde çeşit bazında MW istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ve 1.55 adet ile en yüksek sürgün sayısını vermiştir. Çeşit*Uygulama interaksyonunda ise kontrol grubu 6.54 adet ile en yüksek sürgün sayısını vermiştir (Çizelge 4.21).

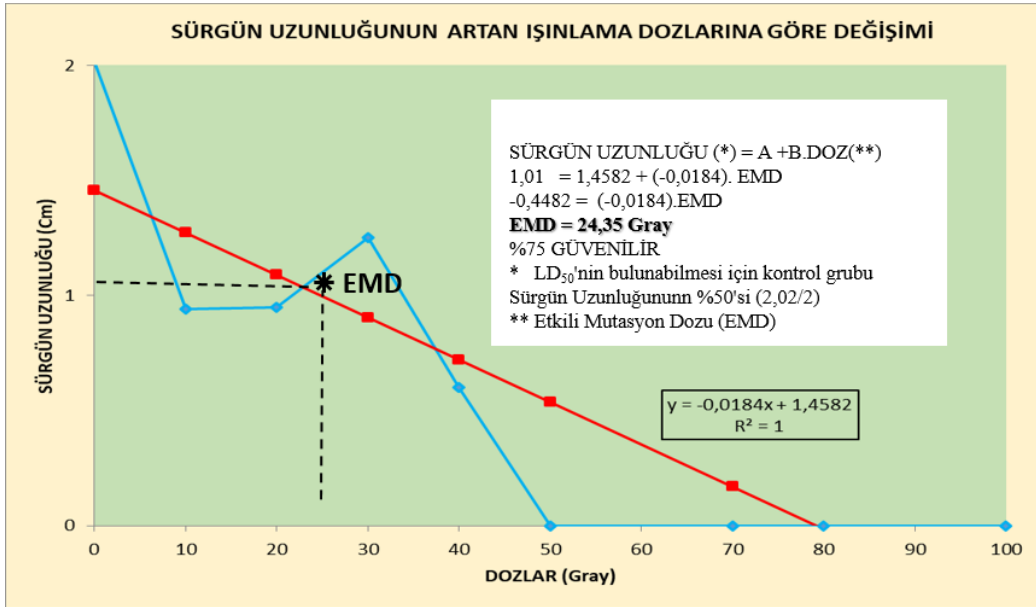
Çizelge 4.21. Gama ışınlamaları sonrası eksplant başına düşen sürgün sayıları (adet)

Gama Işını Dozu (Gy)	Çeşit	Çeşit*Uygulama*Eksplant			Çeşit*Uygulama	Çeşit
		Yaprak	Boğum	Boğum Arası		
0 (Kontrol)	MW	10.53 a (3.03)	2.86 fi (1.75)	6.23 b (2.52)	6.54 A (2.44)	1.55 A (0.80)
10		4.26 de (2.13)	3.36 eh (1.92)	4.90 cd (2.26)	4.17 BC (2.10)	
20		2.86 fi (1.44)	2.90 fi (1.75)	2.66 gı (1.69)	2.81 D (1.62)	
30		0.00 k (0.00)	2.16 hı (1.50)	1.70 ij (1.12)	1.32 EF (0.90)	
40		0.00 k (0.00)	2.96 fi (1.79)	0.00 k (0.00)	1.05 F (0.66)	
50		0.00 k (0.00)	0.40 k (0.36)	0.00 k (0.00)	0.20 H (0.18)	
60		0.00 k (0.00)	0.00 k (0.00)	0.00 k (0.00)	0.00 H (0.00)	
70		0.00 k (0.00)	0.70 jk (0.62)	0.00 k (0.00)	0.30 GH (0.27)	
80		0.00 k (0.00)	0.40 k (0.36)	0.00 k (0.00)	0.20 H (0.18)	
90		0.00 k (0.00)	0.00 k (0.00)	0.00 k (0.00)	0.00 H (0.00)	
100		0.00 k (0.00)	0.70 jk (0.62)	0.00 k (0.00)	0.30 GH (0.27)	
0	PUSAN	2.70 gı (1.70)	6.13 bc (2.51)	4.10 df (1.89)	4.31 B (2.03)	1.05 B (0.58)
10		1.83 ij (1.32)	3.86 dg (2.02)	4.93 cd (2.29)	3.54 CD (1.88)	
20		0.00 k (0.00)	3.23 eh (1.88)	2.80 gı (1.44)	2.04 E (1.14)	
30		0.00 k (0.00)	2.83 fi (1.73)	0.00 k (0.00)	1.01 FG (0.64)	
40		0.00 k (0.00)	0.00 k (0.00)	0.00 k (0.00)	0.00 H (0.00)	
50		0.00 k (0.00)	0.00 k (0.00)	0.00 k (0.00)	0.00 H (0.00)	
60		0.00 k (0.00)	0.00 k (0.00)	0.00 k (0.00)	0.00 H (0.00)	
70		0.00 k (0.00)	0.00 k (0.00)	0.00 k (0.00)	0.00 H (0.00)	
80		0.00 k (0.00)	0.00 k (0.00)	0.00 k (0.00)	0.00 H (0.00)	
90		0.00 k (0.00)	0.00 k (0.00)	0.00 k (0.00)	0.00 H (0.00)	
100		0.00 k (0.00)	0.00 k (0.00)	0.00 k (0.00)	0.00 H (0.00)	

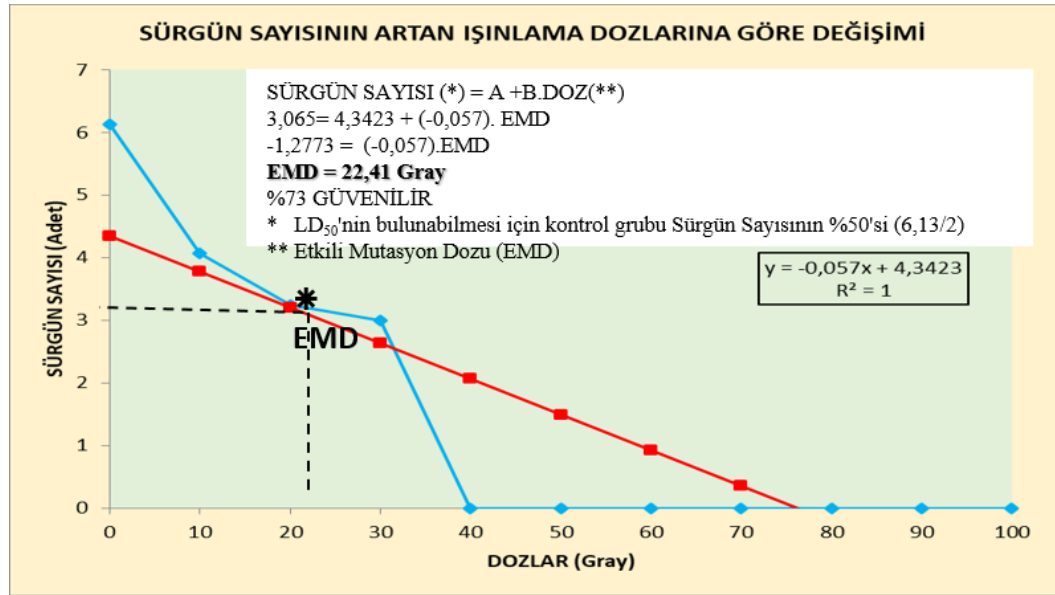
LSD_{Uygulama}:0.52***, LSD_{Eksplant}:0.27**, LSD_{Çeşit}:0.22***, LSD_{Uygulama*Eksplant}:0.90***, LSD_{Uygulama*Çeşit}:0.73**, LSD_{Eksplant*Çeşit}:0.38***, LSD_{Uygulama*Eksplant*Çeşit}:1.27***
Açı transformasyonu sonrası elde edilen değerler parantez içerisinde verilmiştir.
Grup ortalamaları arasındaki farklılıklar ayrı harfler ile gösterilmiştir.
Kontrol ortamı BBD içermeyen MS ortamıdır.
*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001

4.2.1 EMD₅₀ belirleme çalışmasına ait bulgular

In vitro ışınlamalarda rejenerasyon gösteren yaprak, boğum ve boğum arası eksplantlarının ışınlamadan sonraki 60. günlerinde sürgün uzunlukları ve sürgün sayıları ölçülmüştür. Elde edilen verilerden kontrol grubuna göre %50 kısılma sağlayan doz (RD₅₀) lineer regresyon analizi ile hesaplanarak her iki çeşit için de EMD₅₀ belirlenmiştir. MW çeşidinin boğum eksplantlarında etkili doz, sürgün uzunluğu verileri ile belirlenmiş olup 24 Gy çıkmıştır (Şekil 4.14). Pusan çeşidinin ise boğum eksplantlarında etkili dozu, sürgün sayısı verileri ile belirlenmiş olup 22 Gy olarak belirlenmiştir (Şekil 4.15).



Şekil 4.14. MW çeşidinde sürgün uzunluğunun artan ışınlama dozlarına göre değişimi



Şekil 4.15. Pusan çeşidinde sürgün sayısının artan ışınlama dozlarına göre değişimi

4.3 EMD₅₀ ile Yapılan Işınlamalar ve Mutant Bireylerin Eldesine Ait Bulgular

MW ve Pusan çeşitlerinin boğum eksplantları 1000'er eksplant olacak şekilde sırasıyla 24 Gy ve 22 Gy dozlarında gama kaynağı (Co⁶⁰) ile ışınlanmıştır. Işınlanmış materyaller rejenerasyon çalışmalarında belirlenen etkili protokole (2.0 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA ile güçlendirilmiş) göre hazırlanan MS bazal besi yerinin bulunduğu kültür kaplarına dikilmiştir. Rejenerasyon sağlanan eksplantlarda M₁V₁-M₁V₄ dönemi boyunca alt kültüre alma çalışmaları yürütülmüş olup toplamda 18.000 bitki kimliklendirilerek çoğaltılmıştır (Şekil 4.16, Şekil 4.17 ve Şekil 4.18). *In vitro* koşullarda köklenen mutant bitkilerin tamamının aklimatizasyonu sağlanarak dış koşullarda çiçeklenmek üzere dikimleri yapılmıştır.



Şekil 4.16. *In vitro* koşullardaki mutant kasımpatı bitkileri (farklı boylardaki ve/veya albino mutant *in vitro* bitkicikler)



Şekil 4.17. *In vitro* koşullardaki mutant bitkiler ve yapraklarda meydana gelen şekil ve renk değişimleri



Şekil 4.18. Alt kültür çalışmaları yapılan ve iklim odasında tutulan mutant bitkiler

Tepki süresi 8 hafta olan Pusan kasımpatı çeşidinde ilk çiçeklenme 7. haftada başlamış olup, %50 çiçeklenme 8 ile 9. haftalar arasında gerçekleşirken, tüm bitkilerin çiçeklenmesi 11. haftada tamamlanmıştır (Şekil 4.19). Tepki süresi 10 hafta olan MW kasımpatı çeşidinde ise ilk çiçeklenme 9. haftada başlamış olup, %50 çiçeklenme 11. haftada gerçekleşmiş ve 13. haftada tüm bitkilerin çiçeklenmesi tamamlanmıştır (Şekil 4.20).



Şekil 4.19. Pusan mutan  kasımpatı bitkilerinin   eklenmesi ( retici serası)



 ekil 4.20. MW mutan  kasımpatı bitkilerinin   eklenmesi ( retici serası)

Mutant bitki popülasyonu arasında gözle görülür farklılık meydana gelen bitkiler, seradan sökülerek gözlemleri yapılmış ve saksılara aktarılmıştır. Pusan ve MW mutantlarında yapılan tek bitki gözlemi verileri Çizelge 4.22 ve Çizelge 4.23’de sunulmuştur. Çizelge 4.22’de izlendiği gibi mutant bitkiler arasında geniş bir varyasyon olduğu dikkat çekmektedir. 36 adet MW mutantının bitki boyları incelendiğinde; minimum 65 cm, maksimum 124 cm arasında boy uzunluğunun değiştiği belirlenmiş ve CV değeri %14.7 bulunmuştur. Dal ağırlıkları 66 g ile 571 g arasında değişirken, toplam çiçek sayısı 2 adet ile 46 adet arasında farklılık göstermiştir. Çiçek çapı değeri ise 9 ile 16 cm arasında değişirken, dils çiçek sayısının da 180 ile 700 adet arasında değiştiği tespit edilmiştir.

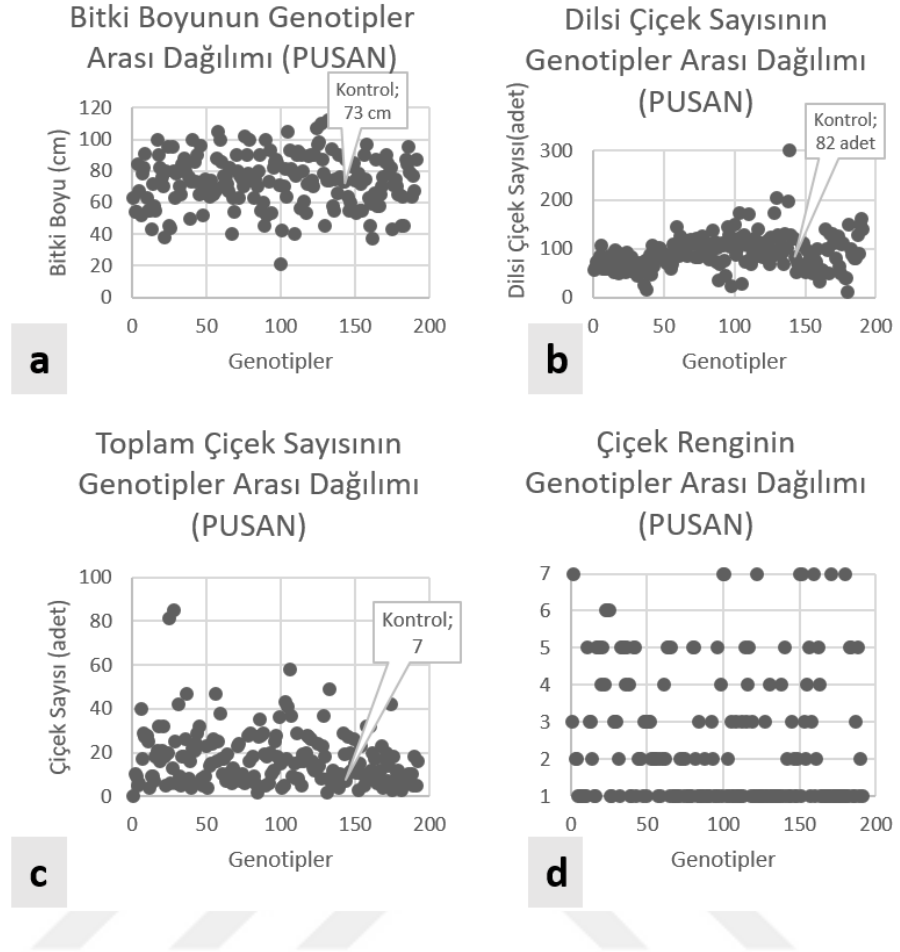
Çizelge 4.22. MW mutantı kasımpatı bitkilerine ait bazı veriler

Özellikler	Minimum	Maksimum	Ortalama	Std. Sapma	CV (%)
Bitki boyu (cm)	65.0	124.0	86.9	12.8	14.7
Çiçek sapı kalınlığı (mm)	4.8	9.1	6.8	1.1	16.2
Sürgün sayısı/ bitki (adet)	1.0	9.0	4.2	1.9	45.2
Dal ağırlığı (g)	66.0	571.0	228.5	121.7	53.3
Toplam çiçek sayısı (adet)	2.0	46.0	18.1	10.4	57.5
Yaprak sayısı/bitki (adet)	20.0	204.0	77.2	39.1	50.6
Yaprak uzunluğu (cm)	6.5	14.0	9.7	1.6	16.5
Yaprak genişliği (cm)	4.0	10.0	6.2	1.3	21.0
Yaprak sapı uzunluğu (cm)	1.5	3.5	2.3	0.5	2.7
Çiçek çapı (cm)	9.0	16.0	12.2	1.7	13.9
Pedisel uzunluğu (cm)	6.0	106.0	0.6	235	39.2
Tüpsü çiçek çapı (cm)	0.4	1.5	1.6	0.2	12.5
Dils çiçek boyu (cm)	3.5	7.2	4.9	0.9	18.4
Dils çiçek çapı (cm)	1.0	2.0	1.6	0.2	12.5
Dils çiçek sayısı (adet)	180.0	700.0	351.1	1160	33.0

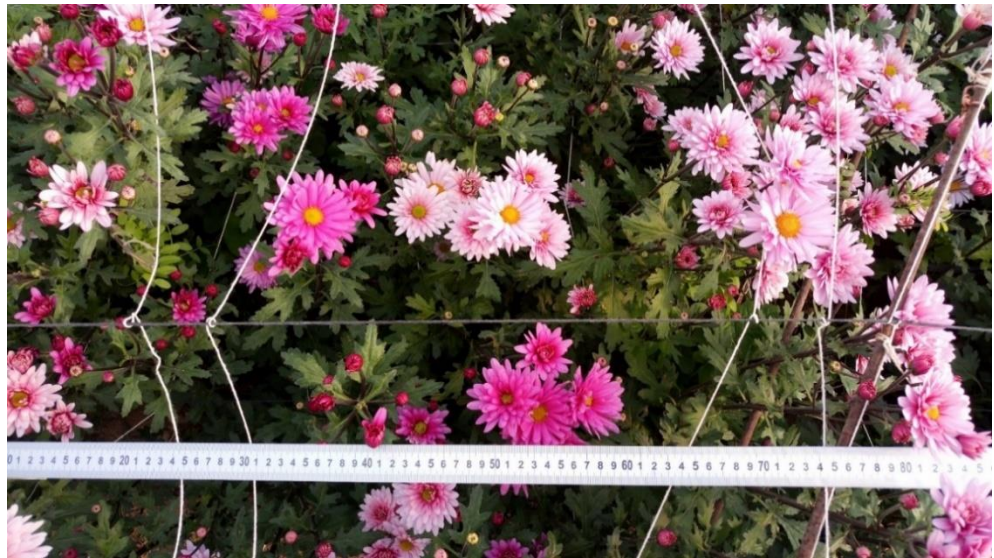
191 adet Pusan mutantının bitki boyları incelendiğinde ise (Çizelge 4.23) minimum 21 cm, maksimum 112 cm boy uzunluğu tespit edilmiş ve CV değeri %22.3 bulunmuştur. Dal ağırlıkları 8.0 g ile 550.0 g arasında, toplam çiçek sayısı 1 adet ile 85 adet arasında, çiçek çapı 0.5 cm ile 9.5 cm arasında, dilsî çiçek sayısı 10 adet ile 300 adet arasında değiştiği tespit edilmiştir.

Çizelge 4.23. Pusan mutantı kasımpatı bitkilerine ait bazı veriler

Özellikler	Minimum	Maksimum	Ortalama	Std. Sapma	CV (%)
Bitki boyu (cm)	21.0	112.0	73.4	16.4	22.3
Çiçek sapı kalınlığı (mm)	2.2	9.3	5.7	1.2	21.1
Sürgün sayısı/bitki (adet)	1.0	8.0	2.3	1.5	65.2
Dal ağırlığı (g)	8.0	550.0	102.0	80.2	78.6
Toplam çiçek sayısı (adet)	1,0	85.0	17.1	13.0	76.0
Yaprak sayısı/bitki (adet)	4.0	244.0	57.8	38.6	66.8
Yaprak uzunluğu (cm)	1.5	11.0	7.3	1.5	20.5
Yaprak genişliği (cm)	2.3	8.0	4.8	1.1	22.9
Yaprak sapı uzunluğu(cm)	1.0	22.0	2.1	1.6	76.2
Çiçek çapı(cm)	0.5	9.5	6.7	1.2	17.9
Pedisel uzunluğu (cm)	0.5	28.0	8.3	3.8	45.8
Tüpsü çiçek çapı(cm)	0.6	2.0	1.4	0.3	21.4
Dilsî çiçek boyu (cm)	1.3	4.5	2.8	0.6	20.0
Dilsî çiçek çapı(cm)	0.4	1.5	0.9	0.2	21.4
Dilsî çiçek sayısı (adet)	10.0	300.0	91.2	36.1	39.6



Şekil 4.21. Pusan mutantlarının bazı bitkisel özelliklere göre dağılımı, a)bitki boyunun genotipler arası dağılımı b)dilsî çiçek sayısının genotipler arası dağılımı, c)toplam çiçek sayısının genotipler arası dağılımı, d)çiçek renginin genotipler arası dağılımı (1-pembe, 2-açık pembe, 3-koyu pembe, 4-beyaz, 5-bej, 6-somon, 7-çizgili)



Şekil 4.22. Farklı renk ve şekillerdeki Pusan mutantı çiçekler



Şekil 4.23. Farklı renk, şekil ve boyutlardaki Pusan mutan çiçekler

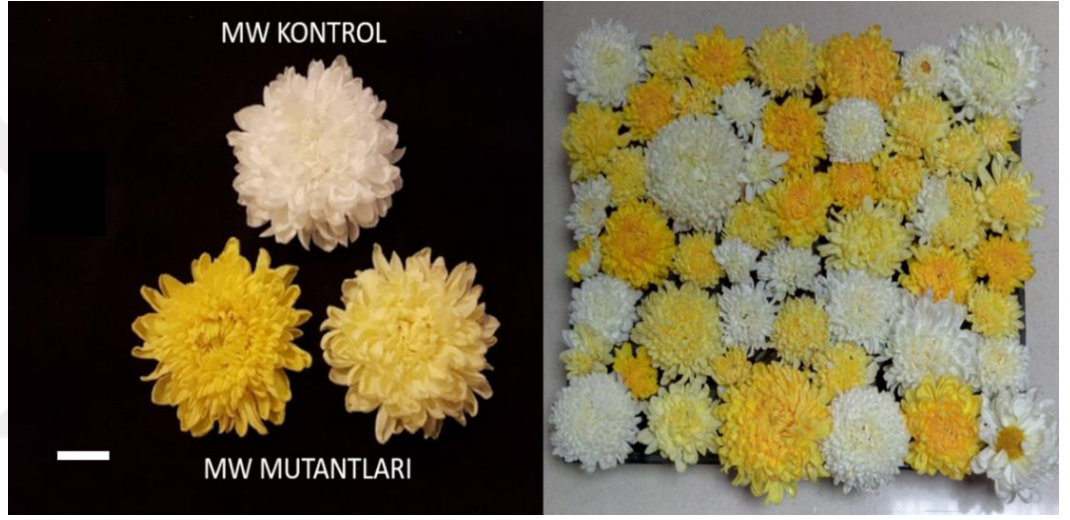


Şekil 4.24. Pusan mutan bitkilerden görünüm



Şekil 4.25. Pusan mutan kasımpatı çiçeklerinde meydana gelen renk ve şekil değişiklikleri (bar=2cm)

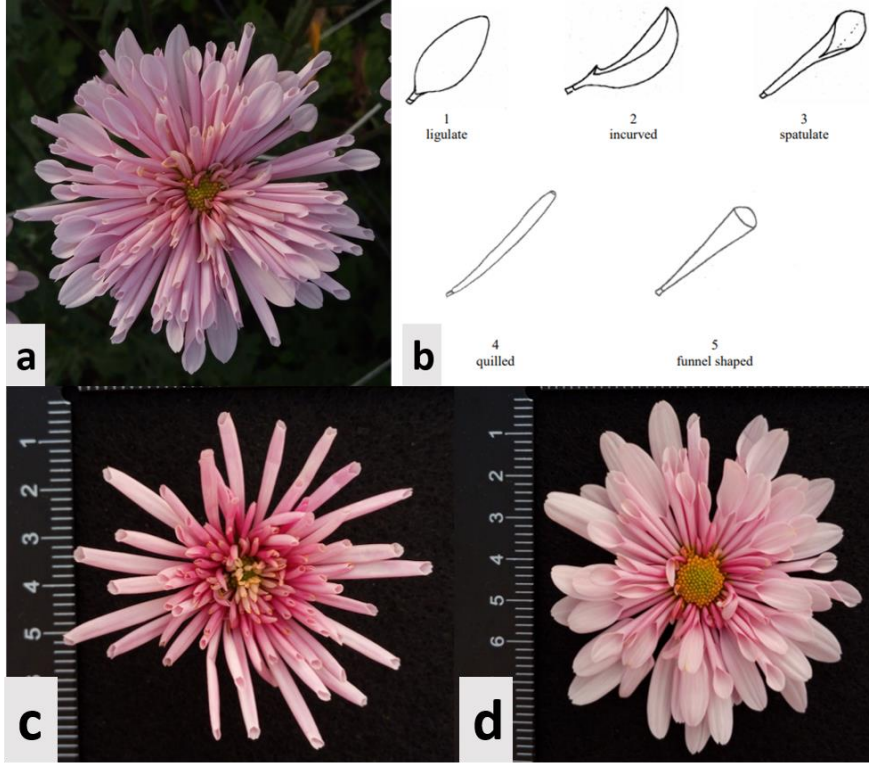
Beyaz dilsli çiçeklere sahip MW kasımpatı çeşidinin mutantlarında M₁V₄ generasyonunda %0.7 mutasyon frekansı ile sarı dilsli çiçek rengi, %0.1 mutasyon frekansı ile açık sarı dilsli çiçek rengi tespit edilmiştir (Şekil 4.26). M₁V₅ generasyonunda ise %0.6 oranında mutasyon frekansı ile sarı dilsli çiçek rengi tespit edilmiş olup, bu generasyonda açık sarı dilsli çiçek oluşumu gözlenmemiştir. Ayrıca %1,5 oranında dilsli çiçek deformasyonu, %5.3 oranında dilsli çiçekte kimera tespit edilmiştir. Mutant bitkilerde %2.0 oranında kısa boy (<40cm), %6.5 oranında uzun boy (>80cm) tespit edilmiştir. Ayrıca %0.4 mutasyon frekansı ile büyük çiçeklerin (>14 cm), %1.5 ile de küçük çiçeklerin meydana geldiği (<7 cm) belirlenmiştir.



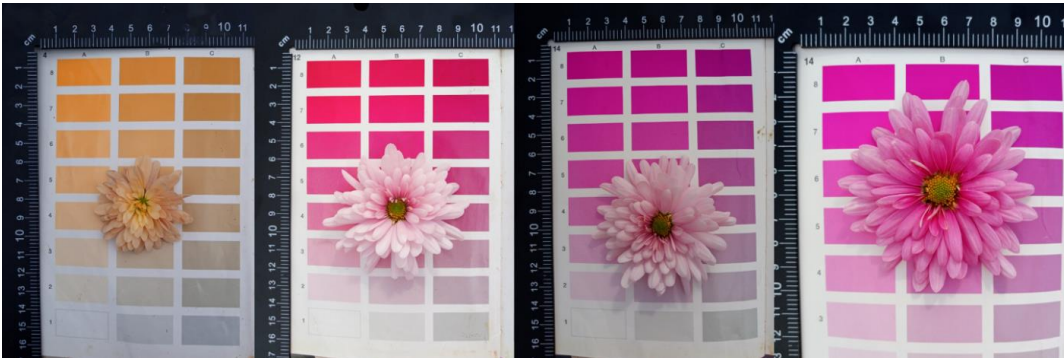
Şekil 4.26. MW mutantı kasımpatı çiçeklerinde meydana gelen renk ve şekil değişiklikleri (bar=2cm)

Pembe dilsli çiçeklere sahip Pusan kasımpatı çeşidinin mutantlarında M₁V₄ generasyonunda altı farklı dilsli çiçek rengi tespit edilmiştir. Mutasyon frekansları açısından incelendiğinde; %1 açık pembe (12-2B), %1 koyu pembe (14-6B), %0.3 beyaz (13-1A), %0.2 bej (2-2A), %0.06 somon (5-5A) ve %0.3 oranında çizgili dilsli çiçek değişimleri tespit edilmiştir. “Methuen Hand Book of Colour” a göre kod numaraları belirlenmiş ve fotoğraflanmıştır (Şekil 4.28). Ayrıca %0.9 ince uzun dilsli çiçek, %0.7 dilsli çiçeklerin kenarları dışa bükülmüş (moderately convex) (UPOV, 2023) mutant bitki not edilmiştir. %3.0 oranında eksik dilsli çiçek, ve dilsli çiçek uçlarında çatallaşma gibi deformasyonlar da kaydedilmiştir (Şekil 4.30). Ayrıca %0.03 mutasyon frekansı ile spatulate ve quilled (Şekil 7.27) dilsli çiçek oluşumları da aynı çiçekte bir arada ya da farklı çiçeklerde ayrı ayrı olmak üzere

tespit edilmiştir (Şekil 4.27). Dilsî çiçeklerde %0.6 oranında kimera gözlenirken, bazı çiçek çaplarının kontrole göre çok küçük (<4 cm) olduğu dikkat çekmiştir (%4.4). Ayrıca %2.5 mutasyon frekansı ile 40 cm'den kısa bitkiler, %15 mutasyon frekansı ile 80 cm'den uzun mutant bitkiler tespit edilmiştir.



Şekil 4.27. Pusan mutantı kasımpatı çiçeklerinde oluşan farklı dilsî çiçek şekilleri a) spatulate ve quilled dilsî çiçekler aynı çiçek üzerinde b) UPOV' a göre dilsî çiçek şekilleri c) quilled dilsî çiçekler d) ligulate, spatulate ve quilled dilsî çiçekler aynı çiçek üzerinde



Şekil 4.28. Pusan mutantı kasımpatı çiçeklerinde oluşan farklı çiçek renkleri



Şekil 4.29. Pusan mutantı kasımpatı çiçeklerinde meydana gelen değişimler

MW ve Pusan çeşidine ait seçilen mutant bitkilerde koruma ve çoğaltma çalışmaları yapılmıştır. Çoğaltma çalışmaları bitkilerden çeliklerin alınıp köklendirilmesinin ardından araziye dikimi şeklinde yürütülmüştür. Ayrıca önemli mutant dokuların muhafazası ve çoğaltımı için *in vitro* koşullarda kültüre alma çalışmaları da yürütülmüştür. Ticari kasımpatı yetiştiriciliğinde önem arz eden çiçek sapı uzunluğu, dal ağırlığı, bitki başına düşen çiçek sayısı, çiçek çapı, tepki süresi gibi özellikler incelenerek yapılan ölçümler sonucunda Pusan kasımpatı çeşidine ait 5 mutant bireyin ve MW kasımpatı çeşidine ait ise 2 mutant bireyin, ileriki çalışmalarda geliştirilebileceği düşünülerek seçilebilir potansiyelde olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.24).

Çizelge 4.24. Geliştirilebileceği düşünülen Pusan ve MW mutantlarına ait veriler

GN	Çiçek Sapı Uzunluğu (cm)	Dal Ağırlığı (g)	Bitki Başına Düşen Çiçek Sayısı (adet)	Çiçek Çapı (cm)	Tepki süresi	Çiçek Rengi
P 19	72	75	11	7.2	8 hafta	Bej
P 23	70	74	14	7.0	8 hafta	Somon
P 28	70	72	15	7.5	8 hafta	Koyu Pembe
P 63	76	70	12	7.5	9 hafta	Beyaz
P 97	77	72	11	7.0	10 hafta	Pembe
MW 4	70	85	8	13.0	9 hafta	Beyaz
MW 31	75	80	8	12.0	10 hafta	Sarı

In vitro gama ışınlamaları sonucunda MW ve Pusan kasımpatı çeşitlerinde yararlı mutasyonlar kadar yararlı olmayan pek çok mutant bitki eldesi de sağlanmıştır (Şekil 4.30 ve Şekil 4.31).



Şekil 4.30. Pusan mutant çiçeklerde meydana gelen negatif mutasyonlar (bar=2cm)

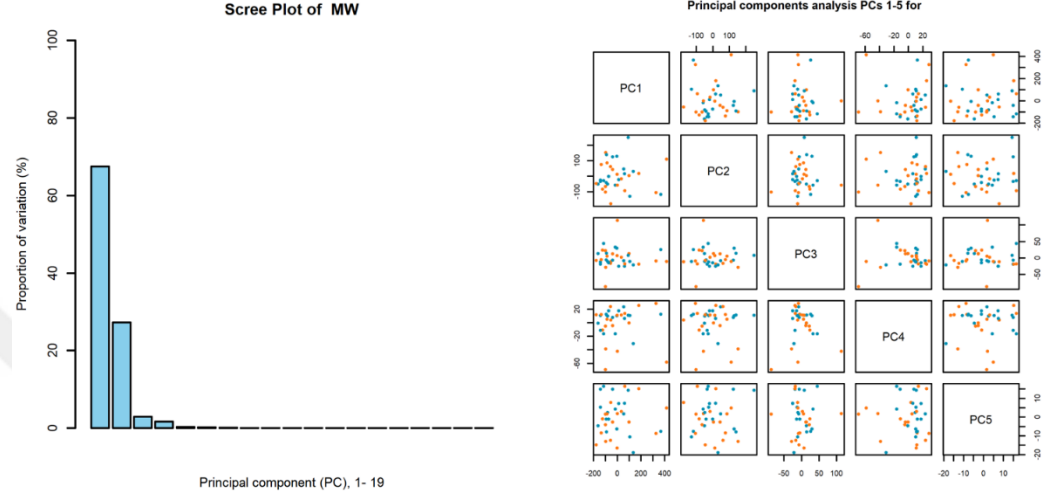


Şekil 4.31. MW mutantı çiçeklerde meydana gelen negatif mutasyonlar (bar=2cm)

4.4 Temel Koordinat Analizleri

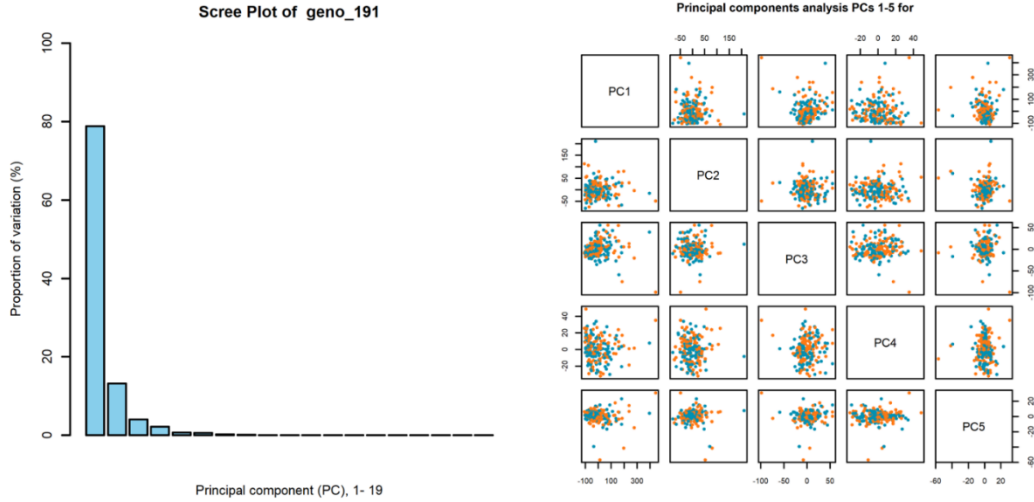
MW mutantlarında yapılan temel koordinat analizi sonuçlarına göre ilk dört faktör grubu varyasyonun %99.29' unu temsil etmektedir. Birinci grupta etkili karakterlerin sayısı 11, ikinci grupta 2, üçüncü grupta 4 ve dördüncü grupta ise 1 adettir. Birinci grup toplam varyasyonun %67.44'ini temsil etmektedir. Bu grubu oluşturan özellikler ise; bitki boyu (cm), çiçek sapı kalınlığı (mm), dal ağırlığı (g), yaprak uzunluğu (cm), yaprak genişliği (cm), yaprak sapı uzunluğu (cm), çiçek çapı (cm), pedisel uzunluğu (cm), tüpsü çiçek çapı (cm), dils çiçek boyu (cm)'dur. İkinci grup toplam varyasyonun %27.25'ini temsil etmektedir. Bu grubu oluşturan

özellikler ise; dilsî çiçek sayısı (adet) ve dilsî çiçek rengidir. Üçüncü grup toplam varyasyonun %2.93'sini temsil etmektedir. Bu grubu oluşturan özellikler ise; sürgün sayısı (adet)/ bitki, toplam çiçek sayısı (adet), yaprak sayısı (adet) ve dilsî çiçek çapı (cm)'dir. Dördüncü grup ise toplam varyasyonun %1.67'sini temsil etmektedir (Şekil 4.32).



Şekil 4.32. MW Çeşidi mutantlarının morfolojik özellikleri üzerinde yapılan Temel Bileşenler Analizi Grafikleri

Pusan mutantlarında yapılan temel koordinat analizi sonuçlarına göre ilk dört faktör grubu varyasyonun % 98.18'ini temsil etmektedir. Birinci grup toplam varyasyonun %78.81'ini temsil etmektedir. Bu grubu oluşturan özellikler ise; bitki boyu (cm), çiçek sapı kalınlığı (mm), dal ağırlığı (gr), toplam çiçek sayısı (adet), yaprak uzunluğu (cm), yaprak genişliği (cm) ve dilsî çiçek çapı (cm)'dir. İkinci grup toplam varyasyonun %13.18'ini temsil etmektedir. Bu grubu oluşturan özellikler ise; çiçek çapı (cm), pedisel uzunluğu (cm), dilsî çiçek boyu (cm) ve dilsî çiçek sayısı (adet)'dir. Üçüncü grup toplam varyasyonun %4.02'sini temsil etmektedir. Bu grubu oluşturan özellikler ise; yaprak sayısı (adet) ve tüpsü çiçek çapı (cm)'dir. Dördüncü grup toplam varyasyonun %2.17'sini temsil etmekteyken bu grubu ise sürgün sayısı/bitki (adet) ve dilsî çiçek rengi temsil etmektedir (Şekil 4.33).

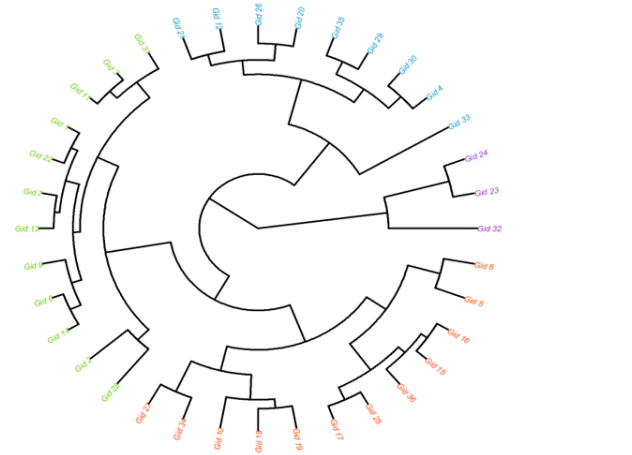
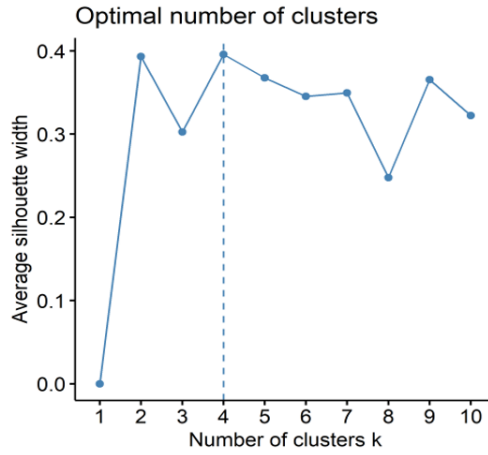


Şekil 4.33. Pusan Çeşidi mutantlarının morfolojik özellikleri üzerinde yapılan Temel Bileşenler Analizi Grafikleri

4.5 Kümeleme Analizleri

MW ve Pusan kasımpatı çeşitlerinin mutant bitkilerinde gözlemi yapılan bitki boyu, çiçek sapı kalınlığı, sürgün sayısı, dal ağırlığı, toplam çiçek sayısı, yaprak sayısı, yaprak uzunluğu, yaprak genişliği, yaprak sapı uzunluğu, çiçek çapı, pedisel uzunluğu, tüpsü çiçek çapı, dils çiçek boyu, dils çiçek çap, dils çiçek sayısı gibi özellikler açısından genotipler arasındaki ilişkinin morfolojik olarak belirlenmesi amacıyla kümeleme analizleri yapılmış ve ilgili grafikler aşağıda sunulmuştur.

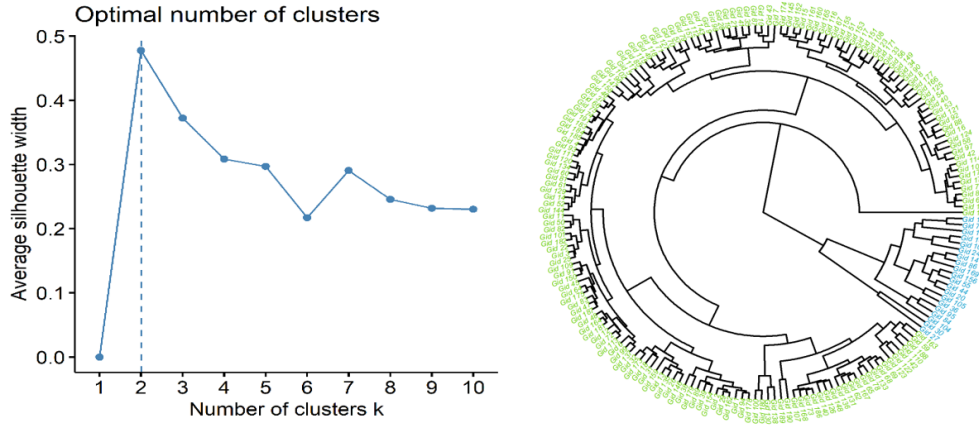
36 farklı MW mutantının yer aldığı dendogramın dört ana gruba ayrıldığı görülmektedir (kırmızı, yeşil, mavi ve mor). Dendogram incelendiğinde, mor grupta yalnızca 23, 24 ve 32 numaralı genotipler yer alırken, mavi grupta 21, 12, 26, 20, 35, 29, 30, 4 ve 33 numaralı genotipler yer almaktadır. Kırmızı ve yeşil gruplarda ise 12'şer genotip yer almıştır. Bu genotiplerden 33 numaralı olan genotip ayrı bir alt grup oluşturmuştur (Şekil 4.34).



Şekil 4.34. MW çeşidi mutantlarının morfolojik özellikleri üzerinde yapılan kümeleme analizi sonuçlarını gösteren grafik (solda) ve fan dendrogram (sağda)

MW ve Pusan kasımpatı çeşitlerinin mutant bitkilerinde gözlemi yapılan bitki boyu (cm), çiçek sapı kalınlığı (mm), sürgün sayısı (adet)/bitki, dal ağırlığı (g), çiçek sayısı (toplam), yaprak sayısı (adet)/ bitki, yaprak uzunluğu (cm), yaprak genişliği (cm), yaprak sapı uzunluğu (cm), çiçek çapı (cm), pedisel uzunluğu (cm), tüpsü çiçek çapı (cm), dilsî çiçek boyu (cm), dilsî çiçek çapı (cm), dilsî çiçek sayısı (adet) gibi özellikler açısından genotipler arasındaki ilişkinin morfolojik olarak belirlenmesi amacıyla kümeleme analizleri yapılmış ve ilgili grafikler aşağıda sunulmuştur.

191 Pusan mutantının yer aldığı dendrogram incelendiğinde ise morfolojik özelliklere göre iki ana grup oluştuğu görülmektedir (yeşil ve mavi). İki ana grubun da yine kendi aralarında iki ayrı alt gruba ayrıldığı görülmektedir. Dendrogram incelendiğinde mavi grupta 172, 77, 128, 132, 106, 24, 141, 86, 169, 156, 55, 44, 20, 105, 36, 95, 84, 104, 30 ve 27 numaralı genotipler yer almaktadır. Bu genotiplerden birbirine yakın olan 30 ve 27; diğerlerinden ayrı bir alt grupta yer almaktadır. Dendrogramdaki yeşil grupta ise 171 genotip ile birlikte kontrol grubu da yer almaktadır (Şekil 4.35).



Şekil 4.35. Pusan çeşidi mutantlarının morfolojik özellikleri üzerinde yapılan kümeleme analizi sonuçlarını gösteren grafik (solda) ve fan dendrogram (sağda)

5. TARTIŞMA

Çalışmada MW ve Pusan kasımpatı çeşitlerinde fiziksel mutagen uygulaması ile mutant bitkilerin eldesi sağlanmıştır. Mutasyon ıslahı çalışmalarından önce MW ve Pusan kasımpatı çeşitlerinin dört farklı eksplantında rejenerasyon denemeleri kurulmuş ve optimum rejenerasyon protokolü geliştirilmiştir. Optimize edilen rejenerasyon protokolü mutasyon ıslahı çalışmalarında kullanılmıştır. Geliştirilen mutant kasımpatı bitkilerinin mikro çoğaltımları yapılmıştır. Çiçeklendirilen mutant bitkilerde, farklılıkları ortaya koymak için bitki gözlemleri yapılmıştır.

5.1 *In Vitro* Rejenerasyon Denemeleri

Bitki doku kültürü teknikleri üstün nitelikli genotiplerin ıslahı ve hızlı çoğaltımında kullanılan etkili bir yöntemdir (Nasri et al., 2018). *In vitro* rejenerasyon başarısı üzerinde eksplant tipi ve BBD gibi pek çok faktör etkilidir (Park et al., 2007; Murgayanti et al., 2010; Song et al., 2011; Lim et al., 2012; Xu et al., 2012; Telem et al., 2016; Kazeroonian et al., 2018; Din et al., 2022). Ayrıca farklı kasımpatı çeşitlerinin *in vitro* rejenerasyon tepkileri de farklı olabilmektedir (Kaul et al., 1990; Shinoyama et al., 2004; Song et al., 2011; Lee et al., 2013; Chhetri et al., 2013; Kazeroonian et al., 2014). Bu nedenle çalışmanın ilk stratejisinde, mutasyon ıslahı tekniklerinde de faydalanmak üzere, MW ve Pusan kasımpatı çeşitlerinin dört farklı eksplantında *in vitro* rejenerasyon protokol ortamı geliştirilmiştir.

MW çeşidinde en iyi sürgün gelişimi 10 farklı ortam arasında, tüm eksplantların ortalamasında 2.0 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA içeren 4 numaralı besin ortamında (%86.25) ve dört farklı eksplant arasında boğum eksplantında (%62.52) tespit edilmiştir (Bkz. Çizelge 4.1). Pusan çeşidinde en iyi sürgün gelişimi ise 10 farklı ortam arasında tüm eksplantların ortalamasında 1.0 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA içeren 3 numaralı besin ortamında (%61.25) ve 2.0 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA içeren 4 numaralı besin ortamında (%56.25) tespit edilirken, eksplantlar arasında boğum eksplantında en yüksek sürgün oluşumu (%63.50) gözlenmiştir (Bkz. Çizelge 4.2). Benzer sonuçları Nalini et al. (2016), boğum eksplantında en iyi sürgün gelişimini 2.0 mg/l BA + 0.5 mg/l NAA ile güçlendirilmiş MS ortamında

(%86.6) elde ederlerken, Yesmin et al. (2017), boğum eksplantında 1.0 mg/l BAP ve 0.1 mg/l IAA ile desteklenmiş MS ortamında (%93.33) elde etmişlerdir.

Dilsi çiçeklerdeki en yüksek sürgün oluşumları 4 ve 5 numaralı ortamda MW çeşidinde %55.00, Pusan çeşidinde ise 5 numaralı ortamda %25.00 olarak tespit edilmiştir (Bkz. Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2). Yapılan pek çok çalışmada, tez çalışmasına da paralel olarak dilsi çiçeklerdeki en yüksek rejenerasyon oranları, 1.0 mg/l veya 2.0 mg/l BAP ve 0.5 mg/l veya 1.0 mg/l NAA içeren MS ortamlarında tespit edilmiştir (Datta et al., 2001; Datta et al., 2005; Kulpa, 2011; Imtiaz et al., 2014; Tymoszek and Zalewska, 2014a). Yapılan bir çalışmada, mutasyon oluşturmak için ışın uygulanan dilsi çiçekler 2.0 mg/l BA + 0.5 mg/l NAA ile güçlendirilmiş MS ortamında rejenere olarak sürgünler oluşturmuştur (Misra and Datta, 2007). Çalışmamızda her iki çeşitte de dilsi çiçek eksplantları, en düşük sürgün rejenerasyonu saptanan eksplant olmuştur. Park et al. (2007) petal, gövde ve yaprak eksplantları arasından petal eksplantlarında, adventif sürgün oluşturma başarısının BBD, sukroz ve karanlık periyod uygulamasından çok büyük oranda etkilendiğini ortaya koymuşlardır. Kulpa (2011), aksi bir görüş savunarak karanlık periyodun rejenerasyon üzerinde önemli bir etkisi bulunmadığını bildirmiştir. Çalışmamızda karanlık periyod uygulaması yapılmamıştır. Dilsi çiçeklerdeki sürgün rejenerasyonu oranının düşük olmasının nedeni bundan kaynaklanabileceği gibi tamamen genotip etkili de olabileceği düşünülmektedir. Dilsi çiçek eksplantlarında bitki rejenerasyon kapasitesini belirlemek için yapılan başka bir çalışmada sürgün oluşumları *Chrysanthemum morifolium* “Ping Pong” çeşidinde %73.83, “Palisade White” çeşidinde %25.67 aralığında değişmekle birlikte ortalama %48.28 olmuştur (Barakat et al., 2010a).

Tez çalışmasında kontrol (BBD bulunmayan MS besi yeri) grubunda sadece boğum eksplantında sürgün rejenerasyonu (%100.00) sağlanırken yaprak, dilsi çiçek ve boğum arası eksplantlarında BBD bulunmayan MS ortamında rejenerasyon tespit edilmemiştir (Bkz. Çizelge 4.3). Pant et al.’ a göre (2015), kasımpatıda boğum eksplantlarının *in vitro* rejenerasyon kapasitesi yüksektir. Aksiller tomurcukları içeren boğumların kültüre alınmasıyla, ana bitkide zaten var olan tomurcuklar kullanılmış olur. Böylece genetik olarak kararlı ve birebir ana bitkinin aynısı olan klonun üretilmesiyle, etkili ve hızlı bir klonal çoğalma yöntemi

sağlanır. Tez çalışmasında boğum eksplantlarında BBD'siz MS ortamında rejenerasyon tespit edilmesinin de bu durumla ilgili olabileceği düşünülmektedir. Yine Lim et al.'a göre (2012) yaprak, çiçek sapı ve gövde eksplantları arasında gövde eksplantlarının diğer eksplantlara kıyasla, çeşit ve jelleyici ajan fark etmeksizin sürgün organogenezinin ve ortalama sürgün sayısı açısından en yüksek değerlerin elde edildiği eksplant olduğu bildirilmiştir. Tüm paralel görüşlere karşın Waseem et al. (2011a), *Chrysanthemum morifolium* L.'nin boğum eksplantlarından kontrol grubunda %33.3 oranında sürgün oluşumu tespit ederken, 1.0 mg/l BAP içeren MS ortamında %100.00 oranında sürgün oluşumu saptanmıştır.

Dilsî çiçek eksplantlarında rejenerasyon başlangıcı, MW çeşidinde eksplant dikiminden itibaren 4. haftada, Pusan çeşidinde ise 6. haftada tespit edilmiştir. Tez çalışmasına paralel olarak Verma et al. (2012b) yaptıkları çalışmada 4.0 mg/l BAP ve 0.1 mg/l NAA içeren MS besin ortamında dilsî çiçek rejenerasyonunun 4. haftadan itibaren başladığını bildirmişlerdir.

Tez çalışmasında, eksplant başına düşen sürgün sayısı bulguları incelendiğinde her iki çeşit için de en fazla sürgün sayısının 2.0 mg/l BAP + 0.5 mg/l NAA içeren 4 numaralı besin ortamında tespit edildiği dikkat çekerken, MW çeşidinde boğum arası eksplantında 5.45 adet ile, Pusan çeşidinde ise boğum eksplantında 4.55 adet ile en iyi sürgün sayısı elde edilmiştir. Sürgün uzunluğu değerleri incelendiğinde ise en yüksek MW çeşidinde 1.0 mg/l kinetin + 0.5 mg/l NAA içeren 1 numaralı ortam ve 2.0 mg/l kinetin + 0.5 mg/l NAA içeren 2 numaralı ortamın boğum eksplantında sırasıyla 3.50 cm ve 3.37 cm olarak en yüksek sürgün uzunluğunu oluşturduğu görülmektedir (Bkz. Çizelge 4.7). Pusan çeşidinde ise en uzun 1.0 mg/l 2,4-D içeren 9 numaralı ortamda ve yine kinetin içeren 2 ve 1 numaralı ortamlarda olduğu dikkat çekmektedir (Bkz. Çizelge 4.8). Waseem et al. (2011a), boğum eksplantlarında 1.0 mg/l BAP içeren ortamda eksplant başına sürgün sayısını 4.9, sürgün uzunluğunu 5,8 cm olarak bildirmiştir. Yesmin et al. (2014) boğum eksplantlarında 1.0 mg/l BAP ve 0.1 mg/l IAA ile desteklenmiş MS ortamında eksplant başına en iyi sürgün sayısını 21.73 ve en yüksek sürgün uzunluğunu 6.43 cm olarak tespit etmiştir. Nalini et al. (2016) boğum eksplantlarında ortalama sürgün uzunluğunu 3.7 cm olarak bildirirken, yapılan başka bir çalışma 4.0 mg/l kinetin ve 0.6 mg/l IBA arasındaki etkileşimin, kasımpatı

bitkilerinin boğum eksplantlarından gelişen sürgün sayısı ve ortalama sürgün uzunluğu değerleri üzerinde önemli bir olumlu etkisi olduğunu göstermiştir (Alsoufi et al., 2021).

Yapılan bir çalışmada, sadece BAP içeren ortamlarda, yaprak eksplantlarından kallus oluşmadan doğrudan sürgünlerin oluştuğu ve 4.5 mg/l BAP ile 1.0 mg/l NAA kombinasyonu, yaprak eksplantlarından doğrudan organogenez için başarılı olduğu bildirilmiştir (Kazeroonian et al., 2018). Tez çalışmasında da Kazeroonian et al.'un 2018 yılında yaptıkları çalışmaya paralel olarak sitokinin konsantrasyonlarının oksin konsantrasyonlarından yüksek olduğu 1,2,3 ve 4 numaralı besin ortamlarında direkt sürgün rejenerasyonu tespit edilmiştir. Waseem, (2011b) tarafından BAP'ın farklı konsantrasyonlarıyla (1.0 ve 1.5 mg/l) birlikte kullanılan NAA'nın daha düşük konsantrasyonları (0.5 ve 1.0 mg/l) ile desteklenmiş MS ortamının, diğer konsantrasyonlar ve kombinasyonlara kıyasla daha iyi sonuçlar verdiği bildirilmiştir. Lim et al. (2012) tarafından 1 μ M NAA ve 10 μ M BA ile desteklenmiş MS ortamında farklı çeşitlerin yaprak ve gövde eksplantlarında doğrudan eksplant yüzeyinden sürgün oluştuğu belirtilmiştir.

Çalışmamızda kök oluşum oranları incelendiğinde hem MW hem de Pusan çeşidinin boğum eksplantlarının BBD bulunmayan kontrol grubunda tamamının köklendiği görülmektedir (Bkz. Çizelge 4.12). Diğer eksplant türlerinde ise kontrol grubunda köklenme olmamıştır. MW çeşidinde 2,4-D'nin kinetin ile olan kombinasyonlarında yüksek köklenme saptanırken (7 ve 8 numaralı ortamlar), bunu 2,4-D'nin tek başına bulunduğu 9 numaralı ortam takip etmiştir. Pusan çeşidinde ise 2,4-D'nin tek başına bulunduğu 9 numaralı ortamda, kontrol grubundan sonraki en yüksek köklenme tespit edilmiş, bunu 2,4-D'nin kinetin ile kombinasyonlarını içeren 7 ve 8 numaralı ortamlar takip etmiştir. Imtiaz et al. (2014) dilsî çiçek eksplantlarında köklenme oranını BBD bulunmayan ½ MS ortamında %100 olarak bildirmiştir. Başka bir çalışmada, rejenerasyon sürecinde elde edilen sürgünlerin %90-95'i sürgünlerin uzaması sırasında, 7-8 hafta içinde hormonsuz MS ortamında spontan olarak köklendiği bildirilmiştir (Chowdhury et al., 2021). BBD bulunmayan MS ortamında köklenmelerin tespit edildiği çalışmalara karşın Waseem et al. (2009) sürgün ucu eksplantında köklenmenin 0.2 mg/l IBA ile takviye edilmiş ½ MS ortamında sağlandığı bildirilmiştir. Ayrıca Waseem et al.

(2011a) boğum eksplantlarında köklenmenin sırasıyla 0.2 mg/l IBA, 0.2 mg/l NAA ve IAA ile desteklenmiş ½ MS ortamlarında iyi sonuçlar verdiği de belirtilmiştir. Alsoufi et al. (2021), ½ MS ortamına eklenen 1.0 mg/l IBA ile, köklenme yüzdesi (%90.0), ortalama kök sayısı (12.5 adet) ve ortalama kök uzunluğu (3.5 cm) açısından en yüksek ortalama değerleri verdiği bildirilmiştir. Buna karşılık, Fu-Yun (2010) 0.1 mg/L NAA ile desteklenmiş ½ MS ortamında *Chrysanthemum nankingense* için ortalama kök sayısının 15.8 adet, köklenme oranının ise %100 olduğunu gözlemlenmiştir. Benzer şekilde, Wang et al. (2013) Ivory çeşidi için optimum köklendirme ortamını (½ MS + 7.0 g/l agar + 0.1 mg/l of NAA + 30 g/l sukroz) bildirdikleri çalışmada kök sayısı 12.6 adet olarak tespit etmiştir.

5.2 *In Vitro* Fiziksel Mutagen Uygulaması Denemeleri

Doku kültürü, yeni kasımpatı çeşitlerinin oluşturulmasında vazgeçilmez araçlardan biridir (Teixeira da Silva, 2014). En yaygın kasımpatı ıslahı yöntemi mutasyon ıslahıdır. *In vitro* mutasyon, çiçek renklerinde ve bitki şekillerinde varyasyonlar yaratarak ve kimeralardan stabil mutant bitkilerin çoğaltılmasını sağlayarak, kasımpatı biyoteknolojisinde olumlu bir etkiye sahip olmuştur (Datta and Teixeira da Silva, 2006; Matsumura et al. 2010; Kong et al., 2013). Dilsî çiçek eksplantları, kasımpatıda yeni çeşitlerin oluşturulmasında adventif sürgünlerin veya somatik embriyogenesizin oluşumu için kullanışlı bir kaynaktır (Teixeira da Silva, 2014; Teixeira da Silva et al., 2013; Teixeira da Silva et al., 2015). Yaprak eksplantları, rejenere olan bitkilerde, somaklonal varyasyon veya kimera yapılarından kaynaklı varyasyonun bir kaynağı olabilir (Zalewska et al, 2007). Boğum, boğum araları ve dilsî çiçek eksplantları, rejenerasyon ile mutant bitkilerin eldesinde en sık kullanılan eksplantlardır (Datta and Chakrabarty, 2009; Mandal et al., 2000a; Zalewska et al., 2010). Bu nedenle bu tez çalışmasının ikinci stratejisinde iki farklı kasımpatı çeşidinin yaprak, dilsî çiçek, boğum ve boğum arası olmak üzere dört farklı eksplantında farklı gama ışını dozları uygulanmıştır ve rejenerasyon gösteren eksplantların mutagen uygulamasına verdiği tepkiler incelenmiştir. Ayrıca EMD₅₀ dozları belirlenmiş ve etkili doz ile yapılan ışınlamalar ardından farklılık gösteren mutant bitkiler değerlendirilmiştir.

Bu kapsamda 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 Gy dozlarında olmak üzere 10 farklı dozda gama ışını uygulanan yaprak, boğum ve boğum arası eksplantlarında, ışınlama sonrası canlı eksplant oranı (%), gelişen eksplant oranı (%) ve eksplant başına düşen sürgün sayısı gibi parametreler kaydedilmiştir. MW çeşidinde gama ışınlamaları ardından en yüksek canlılık, ışın uygulanmayan kontrol grubunda boğum ve boğum arası eksplantlarında sırasıyla %100.00 ve %93.33 olarak ve 10 Gy ile ışınlanan boğum ve boğum arası eksplantlarında ise %100.00 olarak tespit edilmiştir (Bkz Çizelge 4.13). Benzer sonuçlar Sadhukhan et al. (2015) tarafından bitkinin kök sayısı ve kök uzunluğu ölçümlerinde tespit edilmiştir. Kök sayısı ve uzunluğu kontrol grubuna kıyasla 10 Gy' de önemli ölçüde arttığı, ancak dozun daha da artmasıyla uzunluğun azaldığı ve kötü morfolojik görünüme neden olduğu bildirilmiştir. Başka bir çalışmada köklenme parametreleri yaprak boyutu ve yaprak sayısı da gama ışınlamasının dozunun artmasıyla azalmış fakat 10 Gy' de bu düşüş minimum seviyede olmuştur (Din et al., 2020).

Oksinlerin ve hücre bölünmesini etkileyen diğer büyüme maddelerinin, daha yüksek radyasyon dozlarına maruz kalması sonucu hücre canlılığı olumsuz etkilenir (Mahura et al., 2010). Çalışmamızda da radyasyon dozunun artmasıyla eksplantların canlılığının azaldığı tespit edilmiştir. Tez çalışmasında yaprak eksplantlarında 30 Gy ve üzerinde, boğum eksplantlarında 60 Gy ve 90 Gy dozlarında, boğum arası eksplantlarında ise 40 Gy ve üzerinde canlı eksplant elde edilememiştir (Bkz. Çizelge 4.13). Benzer sonuçlar Dilta et al. (2003); Sadhukhan et al.(2015); Patil et al.(2015,2017), Susila et al. (2019), Din et al. (2020), Anne and Lim (2021); Miler et al. (2021) ve Kiranmayi et al. (2022) tarafından yürütülen çalışmalarda da gözlenmiş ve araştırmacılar radyasyon dozunun artmasıyla hayatta kalma ve rejenerasyon oranlarının azaldığını bildirmişlerdir. Lamseejan et al. (2000) tarafından yürütülen *in vitro* mutasyon çalışmasında da bu çalışmalara paralel sonuçlar elde edilmiştir. 0, 10, 30, 50, 70, 90, 110 Gy olmak üzere 7 farklı doz ile ışınlamaların ardından, sadece kontrol ve 10 Gy ile ışınlanan bitkilerin hayatta kalarak çiçeklenme gösterdiği bildirilmiştir. Çalışmamızda Pusan kasımpatı çeşidinde de gama ışınlamaları ardından en yüksek canlılık, ışın uygulanmayan kontrol grubunun boğum eksplantında %100.00 olarak elde edilmiştir. Tüm eksplantlar dahilinde doz ortalamalarında en yüksek canlı eksplant oranı %63.33 ile kontrol grubunda gözlenmiştir ve doz miktarı arttıkça yine bu oran düşüş

göstermiştir. Pusan kasımpatı çeşidinin yaprak eksplantında 20 Gy ve üzerinde, boğum arası eksplantında 30 Gy ve üzerinde, boğum eksplantında ise 40 Gy ve üzerinde canlı eksplant gözlenmemiştir (Bkz. Çizelge 4.14).

Eksplant ortalamalarında ise MW ve Pusan çeşitlerinin her ikisinde de boğum eksplantı, en iyi canlı eksplant oranını veren (sırasıyla %41.21 ve %29.39) eksplant olmuştur. Kasımpatı *in vitro* mutasyon ıslahı çalışmalarında bu eksplant kaynağı ile çalışmanın pratik ve hızlı cevap veren bir yöntem olduğu düşünülmektedir. Yaşanan enfeksiyon sorunu nedeniyle gama ışını uygulaması sonrası rejenerasyon sağlanamadığından, dilsî çiçek eksplantlarının mutasyona verdikleri tepki çalışmamızda değerlendirilememiştir. Kasımpatı *in vitro* mutasyon ıslahında eksplant olarak pek çok çalışmada dilsî çiçekler kullanılmıştır (Lamseejan et al., 2000; Misra et al., 2003; Misra and Datta, 2007; Datta et al., 2009a; Verma et al., 2012a; Soliman et al., 2014). Salleh et al. (2015) tarafından yürütülen çalışmada dilsî çiçek eksplantlarının, iyon ışınlarına boğum eksplantına göre daha duyarlı olduğu tespit edilmiştir ve daha fazla mutasyon oluşturduğu bildirilmiştir. Yapılan başka bir çalışmada, yeni kasımpatı çeşitlerinin geliştirilmesinde çiçek eksplantlarının kullanımı yaprak ve gövde eksplantı gibi diğer eksplantlara göre daha fazla fırsat sağladığı bildirilmiştir. Mutasyonlar sonucu oluşan değişimler çiçekler üzerinde küçük noktalar veya çizgiler şeklinde ortaya çıkabilmektedir. Bu mutant çiçek dokularından sürgünlerin veya somatik embriyoların rejenere edilmesiyle stabil mutantların devamına olanak sağladığı belirtilmiştir (Datta and Chakrabarty, 2009).

Tez çalışmasında, canlılık oranlarına çeşit bazında bakıldığında (Bkz. Çizelge 4.15), çeşitler arasında farklılık olduğu dikkat çekmektedir. MW çeşidinde %25.15 olan canlılık, Pusan çeşidinde %15.45 olduğu görülmektedir. Paralel sonuçlar Miler et al. (2021) tarafından yürütülen çalışmada da tespit edilmiştir. Işınlamanın ardından *in vitro* koşullarda 'Karolina' çeşidinden sadece 7 sağlıklı sürgün elde edilirken, 'Profesor Jerzy' çeşidinde toplamda 428 sürgün kaydedilmiştir. Araştırmacılar rejenerasyon verimine genotipin etkisinin önemli olduğunu belirtmişlerdir.

Işınlanan materyal uygulama esnasında hasar alarak hassaslaşıp gelişme döneminde zayıf düşebilmektedir (Kantoğlu ve Kunter, 2021). Tez çalışmasında da gama ışınlamaları ardından canlı kalan bazı eksplantlar büyümelerine devam ederken, bazıları ise gelişme göstermemişlerdir. MW çeşidi incelendiğinde 10 Gy ile ışınlamada %84.44 olan canlı eksplantlardan %77.77'si gelişme gösterirken, 20 Gy ışınlamada %41.11'den %30.02'si, 30 Gy ışınlamada %27.77'den %23.37'si ve 40 Gy ışınlamada %24.44'den %24.51'inin gelişme gösterdiği görülmektedir. Pusan çeşidinde ise, 10 Gy ile ışınlamada %42.22 olan canlı eksplantlardan %30.03'si gelişme gösterirken, 20 Gy ışınlamada %38.88'den %33.37'si, 30 Gy ışınlamada %25.55'den %15.62' sinin gelişme gösterdiği tespit edilmiştir. Genel çeşit ortalamalarında ise MW çeşidinde %23.09'dan %20.77' si gelişme gösterirken, Pusan çeşidinde ise %15.45'inden %11.39'u gelişme göstermiştir (Bkz. Çizelge 4.15 ve Çizelge 4.18). Bu durumun ışınlama sırasında meydana gelen radyasyon hasarından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Tez çalışmasında eksplant başına düşen sürgün sayısı ortalama değerleri incelendiğinde (Bkz. Çizelge 4.21) sürgün sayılarının çeşide ve doz oranına göre değiştiği, doz oranı arttıkça sürgün sayısının azaldığı dikkat çekmektedir. MW çeşidinde kontrol grubunda 6.54 adet, 10 Gy ile ışınlamada 4.17 adet, 20 Gy ışınlamada 2.81 adet, 30 Gy ışınlamada 1.32 adet ve 40 Gy ışınlamada 1.05 adet olarak tespit edilirken; Pusan çeşidinde kontrol grubunda 4.31 adet, 10 Gy ile ışınlamada 3.54 adet, 20 Gy ışınlamada 2.04 adet, 30 Gy ışınlamada 1.01 adet ve 40 Gy ışınlamada 0.00 adet olarak belirlenmiştir. Çeşit ortalamalarına göre ise MW çeşidinde 1.55 adet, Pusan çeşidinde 1.05 adet olarak tespit edilmiştir. Benzer sonuçlar Miler et al. (2021) tarafından yürütülen çalışmada da tespit edilmiştir. Yüksek enerjili fotonlarla (toplam doz 5, 10 ve 15 Gy) ve yüksek enerjili elektronlarla (toplam doz 10 Gy) ışınlanan 'Profesor Jerzy' çeşidinde eksplant başına düşen ortalama sürgün sayısı 1.80 adet olarak bildirilirken, 'Karolina' çeşidinde 0.18 adet olarak bildirilmiştir.

5.2.1 EMD₅₀ belirleme çalışmaları

Lamseejan et al. (2000) tarafından yürütülen bir çalışmada 0, 10, 30, 50, 70, 90, 110 Gy dozları ile ışınlanan kasımpatıya ait çoklu sürgünlerde LD₅₀, 14 Gy olarak tespit edilmiştir. Haspolat et al. (2019) tarafından “Bacardi” kasımpatı çeşidinde 0.5, 10, 15, 20, 25 ve 30 Gy ile ışınlanan boğum eksplantlarında LD₅₀’nin 20 Gy olduğu bildirilmiştir. “Donglinruixue” kasımpatı çeşidinde gama ışını uygulamasında LD₅₀ dozu yaklaşık olarak 35 Gy olarak belirlenmiştir (Wang et al., 2020). ‘Migok’ adlı standart tip bir kasımpatı bitkisinden alınan *in vitro* eksplantlar, sırasıyla 0, 30, 50, 70 ve 100 Gy dozlarında gama ışınına maruz bırakıldığı çalışmada LD₅₀’nin 30 Gy olduğu tespit edilmiştir (Kang et al., 2013). Benzer şekilde Setia et al. (2020), “Thiching Queen” and “Purnima” kasımpatı çeşitleri 0, 5, 10, 15 and 20 Gy dozlarında gama ışınına maruz kaldıktan sonra LD₅₀ dozu Thai Chen Queen için 20 Gy, Purnima çeşidi için 15 Gy olduğu saptanmıştır. Bindiya kasımpatı çeşidinde LD₅₀ dozu 30 Gy olarak (Singh and Bala, 2015) tespit edilmişken, Arpitha et al. (2023) Lexy Red kasımpatı çeşidinde LD₅₀ dozunu 25 Gy olarak bildirmişlerdir. “Local Golden” kasımpatı çeşidinde 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 and 3.0 Krad gama ışını dozlarından LD₅₀ dozunun 2.5 ve 3.0 Krad arasında olduğu saptanmıştır (Patil et al., 2017). “Brandevil” kasımpatı çeşidinin köklü çeliklerinin 0, 10, 20, 30, 40, 50 Gy gama ışını dozlarına maruz bırakıldığı bir başka çalışmada LD₅₀ dozu 27 Gy olarak tespit edilmiştir (Haspolat, 2022). Yukarıdaki çalışmaların sonuçları incelendiğinde kasımpatıda gama ışınlamaları ardından yapılan etkili doz çalışmalarının 14 Gy ile 35 Gy arasında değiştiği dikkat çekmektedir. Tez çalışmasında da bu sonuçlara paralel olarak MW çeşidinde LD₅₀ 24 Gy olarak belirlenirken, Pusan çeşidinde ise 22 Gy olarak tespit edilmiştir (Bkz. Şekil 4.14 ve Şekil 4.15). “Reagan Red” kasımpatı çeşidinin dilsî çiçekleri ve boğum eksplantlarının iyon ışını (0, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 5.0, 8.0, 10, 15, 20 ve 30 Gy dozlarında) ile ışınlandığı bir çalışmada, dilsî çiçek eksplantları için LD₅₀ dozu 2.0 Gy iken; nodal eksplantları için 4.0 Gy olduğu tespit edilmiştir (Salleh et al. 2015). Buradan ışınlama kaynağına bağlı olarak EMD₅₀’nin değiştiği sonucuna varılabilir.

5.2.2 Etkili doz ile yapılan ışınlamalar ve mutant bireylerin eldesi

Mutagen uygulamasıyla bitki boyunun değiştiğini belirten çok sayıda çalışma bulunmaktadır (Lamseejan et al., 2000; Kim et al., 2016; Patil et al., 2015,2017; Haspolat et al., 2019; Anitha et al., 2021; Anne and Lim, 2021; Nasri et al., 2022). Yüksek gama ışınlama dozlarının oksinleri etkisiz hale getirerek bitkilerin boyunu kısalttığı bildirilmiştir (Banerji and Datta, 1992; Banerji and Datta, 2002; Kapoor et al., 2014; Anne and Lim, 2021'den). Işınlanan mutant bitkilerde MW çeşidinde bitki boyu minimum 65 cm, maksimum 124 cm olduğu saptanmıştır. Pusan çeşidinde ise minimum bitki boyu 21 cm iken, maksimum 112 cm olduğu belirlenmiştir. Tez çalışmasında MW çeşidinin mutantlarında %2.0 mutasyon frekansı ile bitkilerde kısa boy (<40 cm) ve %6.5 mutasyon frekansı ile uzun boy (>80 cm) tespit edilirken, Pusan çeşidinin mutantlarında ise %2.5 mutasyon frekansı ile bitkilerde kısa boy (<40 cm) ve %15 mutasyon frekansı ile uzun boy (>80 cm) tespit edilmiştir. Tez çalışmasında bitki boylarının bazı mutant bitkilerde ışınlamayla birlikte azalmış olduğu fakat daha fazla sayıda mutantta artmış olduğu dikkat çekmektedir. Dilt et al.'a göre (2003) ise de ışınlanan bitkilerin boyları azalmaktadır. Literatüre bakıldığında yapılan çalışmalarda çıkan bu farklı sonuçların, etkili dozla ıslama yapıp yapılmadağı ile ve mutantların dört generasyon atlatılıp atlatılmadığı ile ilgili olduğu düşünölmektedir. Tez çalışmasında dal ağırlıklarına bakıldığında MW çeşidinde minimum 66 g, maksimum 571 g olarak ölçölmüştür. Pusan çeşidinde ise dal ağırlıkları MW ve Pusan çeşitlerinde sırasıyla 8 g ve 550 g olarak kaydedilmiştir. Çiçek çapları incelendiğinde MW mutantlarında minimum 9 cm ve maksimum 16 cm olarak belirlenmiştir. Pusan mutantlarında ise minimum 0.5 cm, maksimum 9.5 cm çiçek çapı ölçölmüştür. MW mutantlarında büyük çiçek çapları (>14 cm) %0.4 mutasyon frekansı ile; küçük çiçek çapları ise (<7 cm) %1.5 mutasyon frekansı ile tespit edilmiştir. Pusan mutantlarında ise küçük çiçek çaplı (<4 cm) bitkiler %4.4 mutasyon frekansı ile belirlenmiştir. Veriler incelendiğinde, ışınlanan bitkilerde kontrol bitkilerine göre artış ve azalışlar olduğu dikkat çekmektedir. Kumari et al. (2013), tez çalışmasına paralel olarak ıslama ile dal ağırlığının ve çiçek çapının azaldığını bildirmiştir. Yine yapılan araştırmalarda ıslama ile çiçek çapının varyasyon gösterdiği bildirilirken (Soliman et al., 2014; Susila et al., 2019), kimi çalışmada ıslama ile çiçek çapının azaldığı (Dilt et al., 2003; Kumari et al., 2013;

Setia et al., 2020), kimi çalışmada ise ışınlama ile çiçek çapının arttığı (Kapadiya et al., 2014) tespit edilmiştir. Çiçek sayılarına bakıldığında ise MW çeşidinde minimum 2 adet, maksimum 46 adet; Pusan çeşidinde ise çiçek sayısı minimum 1 adet ve maksimum 85 adet olduğu saptanmıştır. Tez çalışmasında ışınlama ile birlikte çiçek sayılarının da varyasyon gösterdiği tespit edilmiştir. Benzer sonuçlar farklı araştırmacılar tarafından (Dilta et al., 2003; Soliman et al., 2014; Haspolat et al., 2019) da bildirilmiştir. Tez çalışmasında çiçeklenme yeteneğini kaybeden mutantlar tespit edilirken, aynı tespit Kapadiya et al. (2014) tarafından da bildirilmiştir. Ayrıca Anne and Lim'e (2021) göre, 'Raina', 'Aileen', 'Heimish', 'Whiteplume', ve 'Leporem' çeşitlerinde yüksek ışın maruziyetinden sonra, apikal sürgün oluşumunun durmasından dolayı herhangi bir çiçeklenme gerçekleşmemiştir.

Dilsi çiçek sayıları ise MW mutantlarında 180 ile 700 adet arasında, Pusan mutantlarında ise 10 ile 300 arasında değiştiği ve ışınlama ile geniş bir varyasyon olduğu görülmektedir. Haspolat et al. (2019) ve Setia et al. (2020) da çalışmalarında ışınlama ile dilsi çiçek sayılarının değiştiğini bildirmişlerdir. Tez çalışmasında Pusan mutantlarındaki dilsi çiçek sayılarında meydana gelen artmalar (%1.5) ve azalmalar (%1.1) paralel bir sonuç olarak Puripunyanich et al. (2019) tarafından yürütülen bir çalışmada da bahsedilmiştir. 11-4 numaralı bitkinin sarı çiçekleri, pembe-turuncu ebeveyn hat ile karşılaştırıldığında dilsi çiçeklerinin sayısında azalma olduğu, M07-4 numaralı bitkide ise mutasyon sonucu fazla sayıda dilsi çiçek olduğu belirtilmiştir. Miler et al.'göre (2021) çiçeklerde oluşan varyasyonlar çoğunlukla şekil değişiklikleri ile kendini göstermektedir. Pusan mutantlarında uzun ve ince dilsi çiçekler (%0.9), kısa dilsi çiçekler (%0.5), yanlarından alta doğru kıvrılmış dilsi çiçekler (%0.7) gibi değişimler tespit edilmiştir. MW mutantlarının dilsi çiçeklerinde %1.5 mutasyon frekansı ile deformasyonlar saptanmıştır. Yine %5.3 mutasyon frekansı ile belirlenen kimera, negatif mutasyon olarak kaydedilmiştir. Pusan mutantlarının dilsi çiçeklerinde ise eksik oluşum, dik duruşlu dilsi çiçekler, spoon dilsi çiçekler, boru şeklinde dilsi çiçekler ve dilsi çiçek uçlarında çatallaşma ve kimera oluşumları gibi deformasyonlar (%3.0) belirlenmiştir. Benzer anormal yapıdaki yaprak ve çiçek oluşumları farklı araştırmacılar tarafından da kaydedilmiştir (Dilta et al., 2003; Kumari et al. 2013). Ayrıca ışınlamalardan sonra sık görülen dilsi çiçeklerdeki

spoon şekli oluşumları da tez çalışmasına paralel olarak diğer araştırmacılar tarafından da bildirilmiştir (Kumari et al., 2013; Singh and Bala, 2015; Haspolat et al., 2019). Kasımpatı bitkilerinde mutagen uygulaması sonrasında anormal yapıda yaprak ve çiçek oluşumunun birinci generasyonda gözlemlendiği bildirilmiştir (Datta et al., 2005). Tez çalışmasında ise deformasyonların dördüncü generasyonda bile oluşabildiği tespit edilmiştir.

Yürütülen mutasyon ıslahı çalışmalarında mutagen uygulamasının çiçeklenme süresini etkilediği belirtilmiştir (Haspolat et al., 2019; Nasri et al., 2022). Tez çalışmasında tepki süresi 8 hafta olan Pusan kasımpatı çeşidinde ilk çiçeklenme 7. haftada başlamış olup, tüm bitkilerin çiçeklenmesi 11. haftada tamamlanmıştır. Tepki süresi 10 hafta olan MW kasımpatı çeşidinde ise ilk çiçeklenme 9. haftada başlamış olup, 13. haftada tüm bitkiler çiçeklenmiştir. Hem gama ışınlamalarının hem de üretici serası koşullarının tepki süresi üzerinde etkili olduğu düşünülmektedir. Kapadiya et al. (2014), tüm mutagenik uygulamaların, çiçeklenmeyi 6 ila 7 gün kadar geciktirdiğini tespit etmişlerdir. Ghormade et al. (2020), yüksek dozda kolhisin ve EMS uygulaması, çiçek tomurcuğu başlangıcını, çiçeklenme zamanının ve %50 çiçeklenmeyi geciktirdiği bildirilmiştir. Benzer şekilde Miler et al. (2021), “Profesor Jerzy” kasımpatı çeşidinde ışınlanan bitkilerin daha geç çiçek açtığını belirtmiştir. Çiçeklenmedeki gecikme, çiçek oluşumuna neden olan kimyasal maddelerin sentezine yardımcı olan biyokimyasal yapılarındaki bozukluklardan kaynaklanabilmektedir. (Datta et al., 2001; Anne and Lim'den, 2021). Işınlamanın biyokimyasal yolları bozarak bu durumu tetiklediği ve çiçeklenme zamanında gecikmelerin olduğu düşünülmektedir. Benzer şekilde Setia et al., (2020) tarafından ışınlama sonrası tomurcuk oluşumu ve çiçeklenmede gecikme olduğu bildirilmiştir.

Çiçek rengi değişiklikleri, gama ışınları tarafından indüklenen mutasyonlar sonucunda çiçek pigmentlerinin biyosentez yapılarında ya niceliksel ya da niteliksel değişikliklerden kaynaklanıyor olabilir (Datta, 1990). Anne and Lim'e (2021) göre, M₁V₁ neslinde, 30 ve 70 Gy ışınlama seviyeleri daha fazla çiçek renk mutasyonu geliştirmiştir. Maksimum mutasyon frekansı 70 Gy'de elde edilirken, en düşük mutasyon frekansının ise 10 Gy'de gözlemlendiği bildirilmiştir. Bu çalışmalardaki görüşlerden farklı olarak Din et al. (2020), 10 Gy, 20 Gy, 30 Gy ve 40 Gy ile farklı

dozlardaki gama ışınlamalarından en fazla çiçek renk mutasyon sayısının 10 Gy altındaki uygulamalarda tespit edildiğini (açık pembe, turuncu pembe, beyaz ve sarı) bildirmişlerdir. Kasımpatıda gama ışını ile uyarılan çiçek renk ve şekil mutasyonlarının bildirildiği pek çok çalışma bulunmaktadır (Datta et al., 1985; Broertjes and van Harten, 1988; Datta, 1988, 1990; Datta et al., 2001; Setia et al., 2020). Susila et al. (2019) tarafından yürütülen çalışmada 10 Gy ve 20 Gy ışınlaması diğer dozlara kıyasla çiçeklerde renk değişikliklerine neden olan dozlar olmuştur. 10 Gy ve 20 Gy ile ışınlama yapılarak koyu mor ve koyu kırmızı çiçek renkleri elde edilirken, kontrol grubunda çiçek rengi mor olarak kaydedilmiştir. Benzer şekilde Puripunyavanich et al. (2019) tarafından ebeveyn hatları pembe turuncu olan ve 20 Gy ile ışınlanan kasımpatı petallerinin değişim göstererek tamamen pembeye döndüğü tespit edilmiştir. Lamseejan et al. (2000) tarafından mor renkli kasımpatı bitkisinde *in vitro* gama ışını uygulaması ardından yeni sarı renkli bir çiçek saptanmıştır. Benzer şekilde, tez çalışmasında da gama ışını uygulanan bitkilerde kontrol grubuna göre dilsî çiçek rengi değişiklikleri saptanmıştır. Beyaz dilsî çiçeklere sahip MW çeşidinde, M₁V₄ çiçeklenme döneminde %0.7 mutasyon frekansı ile sarı çiçek rengi, %0.1 mutasyon frekansı ile açık sarı dilsî çiçek rengi saptanmıştır. M₁V₅ generasyonunda ise %0.6 sarı dilsî çiçek rengi tespit edilirken, açık sarı dilsî çiçek rengine rastlanmamıştır. Bu durumdan açık sarı dilsî çiçek renginin stabilitesini koruyamadığı sonucu çıkartılabilir. Benzer sonuçlar Miler et al. (2021) tarafından yürütülen çalışmada da tespit edilmiştir. Işınlamalar sonrası yeni renk fenotipleri koyu sarı, açık sarı ve pembe olarak saptanmış olup, bunlardan sadece koyu sarı fenotipi ikinci yıl yetiştirme sürecinde stabil kaldığı belirtilmiştir. Başka bir çalışmada kimyasal mutagen (EMS) uygulaması ardından mutant kasımpatı bitkileri, yaprak boyutu ve şekli, bitki boyu, çiçeklenme zamanı, çiçek çapı, dilsî çiçek rengi ve dilsî çiçek boyu gibi özelliklerde farklılık göstermiştir. Farklılık gösteren tüm varyantların çelikleme ile devamlılığı korunmuş ve bir sonraki nesilde aynı özellikleri göstermiştir (Nasri et al., 2022).

Tez çalışmasında beyaz çiçekli MW çeşidinde mutagen uygulaması ardından sadece sarı çiçek rengi tespit edilmiştir. Benzer şekilde Kaul et al. (2011), beyaz renkli “Snow Ball” çeşidinde gama ışını sonrası mutant sarı renkli çiçek oluşumu bildirmişlerdir. Kasımpatılarda pembe çiçek rengine sahip genotiplere mutagen

uygulaması; açık pembe, koyu pembe, bronz, kahverengi, sarı, beyaz, kırmızı, turuncu ve çizgili gibi geniş bir renk spektrumu eldesi şansını artırmaktadır (Nagatomi, 2001). Ayrıca Schum and Preil'e (1998) göre pembe çiçek renkli kasımpatı genotipleri ışınlandığı zaman şu anki alışlagelmiş tüm kasımpatı çiçeği renklerini vermektedir. Beyaz çiçek rengine sahip bir genotipe mutagen uygulamasında ise, yalnızca pembe ve sarı çiçek rengi elde edilmektedir (Schum, 2003). Haspolat et al. (2019) yaptıkları çalışmada beyaz renkli "Bacardi" çeşidinde gama ışını uygulaması ile pembe renkli çiçeklere sahip mutantlar saptamışlardır. Tez çalışmasında pembe dilsli çiçek renklerine sahip Pusan çeşidinde mutagen uygulaması ardından Schum'un (2003) belirttiği gibi daha geniş bir renk spektrumu eldesi sağlanmıştır. M_1V_4 generasyonunda %1.0 mutasyon frekansı ile açık pembe çiçek rengi oluşumu saptanırken, %1.0 koyu pembe, %0.3 beyaz, %0.2 bej, %0.06 somon çiçek rengi gözlenmiştir. Singh and Bala (2015) tarafından orijinal çeşit çiçek rengi kırmızı olan "Bindiya" çeşidinde gama ışını uygulaması sonrası kırmızıya yakın tonlarda çiçek varyasyonu saptanmıştır. Kontrol grubunun dilsli çiçekleri normal yapıdayken, mutant bitkilerin dilsli çiçeklerinin spoon şekilli ve düzensiz olduğu belirtilmiştir. Tez çalışmasında da benzer şekilde pembe renkli Pusan çeşidinin gama ışını uygulaması sonrası mutantlarında spoon şekilli, düzensiz ve boru şeklinde dilsli çiçekler tespit edilmiştir. %0.03 mutasyon frekansı ile M_1V_4 generasyonunda saptanan spoon ve boru şeklinde dilsli çiçekler, M_1V_5 generasyonunda tespit edilmemiştir. Tez çalışmasında ışınlama sonrası oluşan çiçek rengi mutasyonlarının frekans oranları düşmüş olsa bile stabilitelelerini koruyarak sonraki generasyonlarda devam ettiği gözlenmiştir.

Ticari kasımpatı yetiştiriciliğinde önem arz eden bitki boyu, dal ağırlığı, bitki başına düşen çiçek sayısı, çiçek çapı, tepki süresi gibi özellikler incelenerek yapılan ölçümler sonucunda; Pusan kasımpatı çeşidine ait 5 mutant birey ve MW kasımpatı çeşidine ait ise 2 mutant birey, geliştirilebileceği düşünülerek ileriki çalışmalar için seçilmiştir. Tez çalışmasına paralel olarak Anne and Lim (2021) çalışmalarında 'Aileen', 'Eldora', 'Leporem', 'Olga pembe', 'Raina' ve 'Rania' kasımpatı mutantları, çeşitli gama ışınlamalarına maruz kaldıktan sonra iyi çiçek kalitesi ve daha iyi şekil, boyut ve renkte çeşitler olarak gözlemlenmiştir. 61 mutasyon, orijinal çeşitlerle karşılaştırılarak gözlemlendikten ve değerlendirildikten sonra iyi renk mutasyonu çiçekler ürettikleri için 'Attirance', 'Olga pembe' ve 'Aileen' olmak üzere üç çeşidin

ileriki çalışmalar için seçildiği bildirilmiştir (Anne and Lim, 2021). Zalewska et al. (2011), farklı eksplant tipleri üzerinde *in vitro* mutagenesis ile yeni kasımpatı eşitleri geliştirmişlerdir. Gzlemledikleri bireyler arasında iek renk değişikliklerini rapor etmişlerdir. Bu çalışmanın sonucunda araştırmacılar, farklı eksplant tipleri kullanarak *in vitro* indüklenen mutasyonlarla sarı, beyaz-sarı, koyu mor, soluk mor, koyu pembe, soluk pembe, somon, pembe farklı renkli varyantlar elde etmişlerdir.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Dünyada süs bitkileri sektörü her geçen yıl büyümektedir ve kesme çiçekler arasında en önemli türlerden biri olan kasımpatıda çeşit geliştirmeye yönelik çalışmaların yapılmasının ülke tarımı ve sektör için oldukça önemli olduğu düşünülmektedir.

Çiçek özellikleri ve büyüme yapıları gibi ekonomik olarak değer taşıyan kısımları, mutagen uygulamalarından sonra kolaylıkla değiştirilebildiği için, süs bitkilerinde mutasyon ıslahı ideal bir yöntemdir. Ülkemizdeki kasımpatı mutasyon ıslahı çalışmaları ilk kez Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Süs Bitkileri Şubesi'nde 2016 yılında "Ege Bölgesi Süs Bitkileri Çeşit Geliştirme Entegre Projesi"nin alt projesi olarak "Kasımpatı'nda Mutasyon Islahı Yöntemiyle Çeşit Geliştirme Projesi" ile başlatılmıştır ve proje çıktısı olarak ilk yerli kasımpatı çeşitleri geliştirilmiştir. 2018 yılında "Ege Bölgesi Süs Bitkileri Çeşit Geliştirme Entegre Projesi" nin bir diğer alt projesi olarak başlatılan "Mutasyon Islahında *In Vitro* Çalışmalar" adlı bu doktora projesinde, *in vitro* mutasyon ıslahı detaylı olarak incelenmiştir. Ayrıca tez çalışmasında *in vitro* rejenerasyon teknikleri geliştirilmiş, *in vitro* teknikler ile gama ışınlamaları bir arada yürütülmüş, alt kültüre alma çalışmaları ile ıslah süresi kısaltılmış, mutant dokuların izolasyonu sağlanmış ve ileriki çalışmalarda geliştirilmek üzere farklı özelliklerdeki mutant bireylerin eldesi sağlanmıştır.

Süs bitkileri çeşit geliştirme çalışmalarında *in vitro* teknikler doğrudan ıslah yöntemi olarak kullanılabileceği gibi klasik ıslah yöntemlerinde karşılaşılan güçlükleri aşma ve ıslah süresini kısaltma şeklinde de kullanılabilir (Gülbağ, 2015; Kazaz vd., 2015). Tez çalışmasında mutasyon çalışmalarının *in vitro* kültür teknikleriyle birlikte kullanımı ıslah sürecini önemli ölçüde hızlandırmıştır. Öncelikle *in vitro* rejenerasyon protokolünün geliştirilip, sonrasında mutasyon çalışmalarına geliştirilen rejenerasyon ortamıyla başlamak çalışmada pratiklik kazandırmış olup, ışınlama sonrasında rejenerasyon olmaması durumunun ortamdaki kaynaklanmadığı konusunda emin olunmuştur. Gama ışını uygulaması sonrası M₁V₁-M₁V₄ arası generasyon atlatma çalışmalarının *in vitro* koşullar altında alt kültüre alma çalışmalarıyla yürütülmesi, bir bitkinin üç kez alt kültüre

alınmasıyla altı ay gibi kısa bir süre zarfında istenilen generasyona ulaşılmasını sağlamıştır. Bu proje çalışmasında elde edilen mutant bitkilerde meydana gelen farklılıkların çoğunluğu çiçek karakterleri ile ilgili olmuştur. Özellikle dilsî çiçek renklerinde ve şekillerinde dikkate değer değişimler gözlenmiştir. Pembe renkli Pusan çeşidinin mutantlarında açık pembe, koyu pembe, beyaz, bej, somon renkli, çizgili, boru ve spoon şeklinde dilsî çiçekler tespit edilmiştir. Beyaz renkli MW kasımpatı çeşidinin mutantlarında ise sarı renk gözlemlenmiştir. Tez çalışmasında meydana gelen değişimlerden renk mutantları genel olarak stabilitesini koruyabiliyorken, şekil mutantlarının (boru ve spoon çiçek şekli) ise sonraki generasyonlarda stabilitesini koruyamadığı sonucu ortaya çıkmıştır. Pusan ve MW kasımpatı çeşitlerinin eksplantlarında yapılan *in vitro* gama ışınlamaları ile farklı eksplantların *in vitro* mutagen uygulamasına verdikleri tepkiler ve mutasyon oranları belirlenmiştir. Her iki çeşit için de boğum eksplantının *in vitro* mutasyon ıslahı çalışmaları için, yapılan rejenerasyon denemelerinde gösterdikleri yüksek rejenerasyon kabiliyetleri ve ışınlamalardan sonraki yüksek canlılık, gelişme oranları gibi değerleri nedeniyle en verimli eksplant kaynağı olduğu sonucuna varılabilir. Bundan sonra yürütülecek olan *in vitro* mutasyon ıslahı çalışmalarında boğum eksplantı ve mutantların içinde saklı kalan somatik mutantların yakalanması ile daha fazla mutasyon eldesi şansı nedeniyle dilsî çiçek eksplantının kullanımı önerilmektedir. Kasımpatı mutasyon ıslahı çalışmalarında başarıyı etkileyeceği için, değişime en çok cevap veren ümit var genotipleri seçerek ıslah çalışmalarına başlamak önerilmektedir. Şimdiye kadar yürütülen çalışmalara ve bu tez çalışmasından elde edilen bulgulara göre, pembe renkli genotiplerin seçilerek çalışmalara devam edilmesinin, daha geniş renk skalası eldesi şansını arttıracığı için uygun olduğu söylenebilir.

Tez çalışmasında elde edilen sonuçlar *in vitro* mutasyon çalışmalarının yeni varyasyonlar oluşturmak için çok etkili olduğunu göstermektedir ve yeni kasımpatı çeşitlerinin geliştirilmesinde bu yöntemin kullanımı umut verici ve hızlı olmasından dolayı önerilmektedir.

Gelecekte yapılacak mutasyon ıslahı çalışmalarında, moleküler tekniklerin kullanımı önemli araçtır ve çalışmalara eklenmesi önerilmektedir. Moleküler teknikler, genetik varyasyonların hızlı ve etkin bir şekilde analiz edilmesini sağlar.

Özellikle TILLING gibi moleküler yöntemler, nokta mutasyonlarını tespit etmek için yüksek verimlilikle çalışır ve istenilen özelliklere sahip bitki varyasyonlarını hızla bulmayı sağlar. Bunun dışında ileri generasyon dizileme (NGS) yöntemi gibi yenilikçi yaklaşımlar mutant genlerin aktarımı ve daha üstün nitelikli bireylerin eldesine yönelik umut vadetmektedir. Bu nedenle, mutasyon ıslahı çalışmalarında moleküler tekniklerin kullanımının yaygınlaştırılması, genetik çeşitliliği artırmak ve istenilen özelliklere sahip bitki varyasyonlarını hedeflemek için önemli bir adım olacağı düşünülmektedir.



KAYNAKLAR DİZİNİ

- Ackerson, C.**, 1967, Original species of the chrysanthemum, National Chrysanthemum Society Bulletin, 23(3):105-107 pp.
- Ahloowalia B.S., Maluszynski M. and Sigurbjornsson, B.**, 1995, Application of *in vivo* and *in vitro* mutation techniques for crop improvement, Euphytica, 85: 303–315 pp.
- Alsoufi, A.S.M.M. Ahmed, Z.S. and Salim, A.M**, 2021, The efficiency of interaction between cytokines and auxins in micropropagation of chrysanthemum plant (*Chrysanthemum indicum* L.), IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci., 735, 12048.
- Anderson, N.O.**, 1987, Reclassifications of the genus *Chrysanthemum* L., HortSci., 22(2):313 p.
- Anderson, N.O.**, 2004, Breeding flower seed crops, In: M. McDonald and F. Kwong (eds.), Flower seeds, CABI, 53-86 pp.
- Anderson, N.**, 2006, Chrysanthemum. In: Anderson NO (Ed). Flower Breeding and Genetics: Issues, Challenges and Opportunities for the 21st Century, Springer, Netherlands, 389-437 pp. <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-4428-1>.
- Anitha, G., Shiragur, M., Patil, B.C., Nishani, S., Seetharamu, G.K., Ramanagouda, S.H. and Naika, B.N.**, 2021, Mutation studies in chrysanthemum cultivar Poornima white, Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry, 10(1): 1235-1239.
- Anne, S. and Lim, J.H.**, 2021, Variability of chrysanthemum cultivars induced by gamma irradiation, Horticultural Science And Technology, 39(5):660-672.
- Arpitha, D.M., Nataraj, S.K., Srinivasa, V., Ganapathi, M. and Ramesh, A.N.**, 2023, Assessment of survivability and genetic variability in mutated population of hybrid cut *Chrysanthemum* cv.Lexy Red, Eco. Env. and Cons. 29 (April Suppl. Issue) : 2023; 223-226p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Asami, I., Hasegawa, T. and Yamada, M.,** 2010, Development of easy screening method to evaluate the non-branching characteristics of chrysanthemum line in juvenile plantlet stage and in vitro stage. Res. Bull. Aichi Agric. Res. Ctr. 42: 1–6.
- Asoko, N., Ruamrungsri, S., Yoosumran, V. and Saetiew, K.,** 2020, Improvement of *Dendranthemum grandiflora* cv. Canter with colchicine *in vitro*. International Journal of Agricultural Technology 16(2): 237-246.
- Banerji, B.K. and Datta, S.K.,** 1992, Gamma rays induced flower shape mutation in *Chrysanthemum* cv ‘Jaya’, J Nucl Agric Biol, 21:73–9 .
- Banerji, B.K. and Datta, S.K.,** 2002, Induction and analysis of gamma ray induced flower head shape mutation in ‘Lalima’ chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*), Indian J Agric Sci, 72:6-10.
- Barakat, M.N.,** 2008, Application of *in vitro* culture for resistance to desertification. Meterology, Enviroment and Arid Land Agriculture, 19: 3-18 pp.
- Barakat M.N., Abdel, F.R.S., Badr, M. and El-Torky M. G.,** 2010a, *In vitro* culture and plant regeneration derived from ray florets of *Chrysanthemum morifolium*, African Journal of Biotechnology, 9 (8):1151- 1158pp.
- Barakat, M.N., Abdel, F.R.S., Badr, M. and El-Torky, M.G.,** 2010b, *In vitro* mutagenesis and identification of new variants via RAPD markers for improving *Chrysanthemum morifolium*, African Journal of Agricultural Research, 5:748-757 pp.
- Basiran, M.,** 2000, Mutation induction as a tool for varietal development in ornamental plants, Malaysian Institute for Nuclear Technology Research, [http://www.iaea.org/inis/collection/NCLCollectionStore/ Public/32/016/32016660.pdf](http://www.iaea.org/inis/collection/NCLCollectionStore/Public/32/016/32016660.pdf) Erişim Tarihi: 30.07.2023
- Bitki Çeşitleri Bülteni,** 2022, T.C. TARIM ve ORMAN BAKANLIĞI, Bitkisel Üretim Genel Müdürlüğü, Sayı/No: 2022-03 Yayın Tarihi:30.12.2022.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Brandkamp**, 2021, <http://www.brandkamp.de/en/products/chrysanthemums.html>, Erişim Tarihi: 21.09.2021.
- Broertjes, C.**, 1969, Mutation breeding of *Streptocarpus*, *Euphytica*, 18: 333-339 pp.
- Broertjes, C.**, 1972a, Mutation breeding of *Achimenes*, *Euphytica*, 21: 48-63 pp.
- Broertjes, C.**, 1972b, Use in plant breeding acutem chronic of fractionated doses of X-rays or fast neutrons as illustrated with leaves of *Saintpaulia*, PhD Thesis, Agriculture Publication Document, Wageningen, Agriculture Resistance Report, 774-776 pp.
- Broertjes, C. and Leffring L.**, 1972, Mutation breeding of *Kalancho*, *Euphytica*, 21: 415-423 pp.
- Broertjes, C., Roest S., and Bokelmann G.S.**, 1976, Mutation breeding of *Chrysanthemum morifolium* Ramat, using *in vivo* and *in vitro* adventitious bud technique, *Euphytica*, 22:11-19 pp.
- Broertjes, C.**, 1982, Significance of *in vitro* adventitious bud techniques for mutation breeding of vegetatively propagated crops, In *Induced Mutations in Vegetatively Propagated Plants II*, Vienna: IAEA, 1-10 pp.
- Broertjes, C. and Van Harten A.M.**, 1988, *Applied Mutation Breeding for Vegetatively Propagated Crops*. Elsevier Science Publisher, The Netherlands, ISBN 0-444-42786-4, 345 p.
- Brown, J.L. and Harney, P.M.**, 1974, Induction of non-chimaeral mutants in *Begonia*, *HortScience*, 9(3): 276 p.
- Bush, S.R., Earle, E.D. and Langhans, R.W.**, 1976, Plantlet from petal segments, petal epidermis, and shoot tips of the periclinal chimera, *Chrysanthemum morifolium* ‘‘Indianapolis’’, *Am J Bot*, 63:729–737 pp.
- Chae, S.C.**, 2016, Influence of auxin concentration on *in vitro* rooting of *Chrysanthemum morifolium* Ramat., *Biosci. Biotechnol. Res. Asia*, 13:833–837 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Chakrabarty, D., A.K.A. Mandal, and S.K. Datta,** 1999, Management of chimera through direct shoot regeneration from florets of chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.), J. Hort. Sci. Biotech, 74: 293-296 pp.
- Chakrabarty, C., Mandal, A.K.A. and Datta, S.K.,** 2000, Retrieval of new coloured chrysanthemum through organogenesis from sectorial chimera, Current Science, 78(9):1060-1061pp.
- Chhetri, M., Jeon, S.M., Naing, A.U. and Kim, C.,** 2013, Efficient plant regeneration from petal segment of standard-type Chrysanthemum, Current Research on Agriculture and Life Sciences, 31(2):94-100 pp.
- Chowdhury, J., Hoque, I. and Sarker, R.,** 2021, PTC&B Development of an Efficient *in vitro* regeneration protocol for Chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium* Ramat), Plant Tissue Culture and Biotechnology, 32:161-171 pp.
- Clark, R.B.,** 1962, History of culture of hardy chrysanthemums. Nat'l. Chrysanthemum Soc. Bull. 18(3):144.
- Cline, M.G.,** 1991, Apical dominance, Bot. Rev., 57: 318–358 pp.
- Cockshull, K.E.,** 1985, *Chrysanthemum morifolium*, In: A. Halevy (ed.). CRC handbook of flowering, 2:236-257 pp.
- Crook, C.B.,** 1942, Genetic studies of chrysanthemums, MS Thesis, Kansas State University, (unpublished).
- Cumming, A.,** 1939, Hardy chrysanthemums, Whittlesey House, New York.
- Datta, S. K., Banerji, B. K. and Gupta, M. N.,** 1985, 'Tutika'-A new chrysanthemum cultivar evolved by gamma irradiation, J. Nuclear Agric.Biol., 14(4):160.
- Datta, S.K.,** 1987, “Colchi Bahar” a new chrysanthemum cultivar evolved by colchi mutation, The Chrysanthemum, 45(1), 40 p.
- Datta, S.K.,** 1988, Chrysanthemum cultivars evolved by induced mutations at National Botanical Research Institute, Lucknow, Chrysanthemum, 44:72-75.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Datta, S.K.**, 1990, Induction and analysis of somatic mutations in garden chrysanthemum. *Adv Horti Sci* 1:241-254.
- Datta, S.K., Chakrabarty, D., Mandal, A.K.A.**, 2001, Gamma ray-induced genetic manipulations in flower colour and shape in *Dendranthema grandiflorum* and their management through tissue culture, *Plant Breed*, 120:91-92. doi:10.1046/j.1439-0523.2001.00553.x
- Datta, S.K., Misra P., Mandal A.K.A. and Chakrabarty C.**, 2002, Direct shoot organogenesis from 48 different explants of chrysanthemum, marigold, and tuberose. *Israel Journal of Plant Sciences*, 50:287–291 pp.
- Datta, S.K., P., Misra and A.K.A. Mandal.**, 2005, *In vitro* mutagenesis – a quick method for establishment of solid mutant in chrysanthemum, *Current Science*, 88(1), 10 p.
- Datta S.K., Teixeira da Silva J.A.**, 2006, Role of induced mutagenesis for development of new flower colour and type in ornamentals, In: Teixeira da Silva JA (Ed.), *Floriculture, ornamental and plant biotechnology: advances and topical issues 1470*, (1st edn), Global Science Books Ltd., Isleworth, 640–645 pp.
- Datta, S.K.**, 2009a, A Report on 36 years of practical work on crop improvement through induced mutagenesis, In: *Induced Plant Mutations in the Genomic Era*. Ed. QY Shu, FAO/IAEA, Rome, ISBN: 978-92-5-106324-8, 251-256 pp.
- Datta, S.K.**, 2009b, Role of classical mutagenesis for development of new ornamental varieties, In: *Induced Plant Mutations in the Genomic Era*, Ed. QY Shu, FAO/IAEA, Rome, ISBN:978-92-5-106324-8, 300-302 pp.
- Datta, S.K., and Chakrabarty, D.**, 2009, Management of chimera and *in vitro* mutagenesis for development of new flower colour/shape and chlorophyll variegated mutants in chrysanthemum, In Shu (ed), *Induced plant mutations in the genomics era*, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 303-305 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Datta, S.K.**, 2012, Success story of induced mutagenesis for development of new ornamental varieties. In: M.I. Kozgar and S. Khan (eds), Induced Mutagenesis in Crop Plants. Biorem. Biodiv. Bioavail., 6 (Special Issue 1): 15-26 p.
- Datta, S.K.**, 2019, Need based tissue culture in floriculture: A success Story, J. Plant Sci. Res., 2019, 35:245–254 pp.
- Datta, S.K.**, 2023, Technology package for induced mutagenesis, Journal of Biology and Nature, 15(1), 70-88.
- Deberg, P.C. and Read, P.E.**, 1991, Micropropagation, In: Deberg and R.H. Zimmerman (Eds.), Micropropagation, Kluwer Academic Pub. ISBN 09723-0818-2, Netherlands, 1-13 pp.
- Dilta, B. S., Sharma, Y. D., Gupta, Y.C., Bhalla, R. and Sharma, B.P.**, 2003, Effect of gamma rays on vegetative and flowering parameters of chrysanthemum, J. Orn. Hort., 6: 328-334 pp.
- Din, A, Qadri Z.A., Wani, M.A., Rather, Z.A., Iqbal, S., Malik, S.A., Hussain,, P.R., Rafiq S., Nazki, I.T.**, 2020, Congenial *in vitro* -ray-induced mutagenesis underlying the diverse array of petal colours in chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* kitam) cv. “Candid”, Biol Life Sci Forum, 4: 21 p. <https://doi.org/10.3390/IECPS2020-08780>
- Din, A., Qadri, Z.A., Wani, M.A., Rather, Z.A., Iqbal, S., Malik, S.A., Rafiq S. and Nazki, I.T.**, 2021, Mechanisms generating the numerous hues of chrysanthemum petals can be traced to *in vitro* γ -ray-induced mutagenesis., 22 November 2021, PREPRINT (Version 2) available at Research Square, <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-617238>
- Din, A., Qadri, Z.A., Wani, M.A., Iqbal, S., Malik, S.A., Bhat, Z.A. and Banday, N.**, 2022, Developing an efficient *in vitro* callusing and regeneration protocol in *Dendranthema* $\times$ *grandiflorum* Kitam., Journal of Crop Science and Biotechnology, 25(4) 393-405 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Donini, P.**, 1982, Mutagenesis Applied to Improve Fruit Trees: Induced Mutations in Vegetatively Propagated Plants, FAOIAEA Panel Proceedings Series; 310 p; ISBN 92-0-111182-7, Vienna.
- Dowrick, G.J.**, 1952, The chromosomes of chrysanthemum, I. The species. Heredity, 6:365-375 pp.
- Dowrick, G.J.**, 1953, The chromosomes of chrysanthemum, II. Garden varieties. Heredity, 7:59-72 pp.
- Eisa, E.A., Tilly-Mándy, A., Honfi, P., Shala, A.Y. and Gururani, M.A.**, 2022, Chrysanthemum: a comprehensive review on recent developments on *in vitro* regeneration, Biology, 11(12):1774 p.
<https://doi.org/10.3390/biology11121774>
- Emsweller, S.L., P. Brierley, D.V. Lumsden, and F.D. Mulford.**, 1937, Improvement of flowers by breeding, USDA Yearbook, pp.890-998.
- Eken, L., Kabakçı, M., Dayar, İ., Şirin, U. and Özzambak, M.E.**, 2019, The effects of Epibrassinolide and some other plant growth regulators on micropropagation of *Limonium sinuatum* (L.) Mill., Murat Zencirkıran (Ed.); Researches in Landscape and Ornamental Plants, Gece Kitaplığı, Ankara, ISBN • 978-625-7958-27-1, 179-196 s.
- Ertan, N.**, 1982, Kesme Çiçek Yetiştiriciliği. Atatürk Bahçe Kùltürleri Araştırma Enstitüsü, Yayın No: 52.
- Francis, D.; Sorrell, D.A.**, 2001, The Interface between the cell cycle and plant growth regulators: a mini review, Plant Growth Regul., 33: 1–12 pp.
- Furutani, N., Matsumura, A., Hase, Y., Yoshihara, R. and Narumi, I.**, 2008, Dose response and mutation induction by ion beam irradiation in chrysanthemum. JAEA Takasaki Ann. Rep. 2007: 69.
- Fu-Yun, L.**, 2010, Tissue culture and rapid propagation of *Chrysanthemum morifolium*, Plant Phisiol. Commun. 2010, 12, 314–316.
- Gaul, H.**, 1977, Plant injury ve lethality. In Manual on Mutation Breeding,, 2nd edn, Vienna: IAEA, 8-87 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Gao, Y., Zhao, B., Ding, G. and Zhang, Q.** 2001, Shoot regeneration from stem and leaf explants of *Dendrathera Grandiflorum*. J. Beijing For. Univ. 2001, 23, 32–33.
- Geier, T.,** 1989, An improved type of “Kohleria” obtained through *in vitro* chemical mutagenesis, Mutation Breeding Newsletter, 34:7-8 pp.
- Ghormade, G.N., Yadlod, S.S., Abhangrao, A.K. and Adsure, D.D.,** 2020, Effect of chemical mutagens on growth and flowering of chrysanthemum varieties in VM1 generation, International Journal of Chemical Studies 2020; 8(4): 1576-1579.
- Grunewaldt, J.,** 1983, *In vitro* mutagenesis of Saintpaulia and Pelargonium cultivars, Acta Horticulture, 226:271-275 pp.
- Gülbağ, F.,** 2015, Türkiye’de süs bitkileri ıslah çalışmaları, Türktob Dergisi, 14:12-15 s.
- Haspolat, G., Senel, U., Kantoglu, Y.T., Kunter, B. and Guncag, N.,** 2019, *In vitro* mutation on Chrysanthemums, Acta Horticulturae, 1263: 261-266 pp.
- Haspolat, G., Zeybekoğlu, E., Senel, Ü., Salman, A. ve Özzambak, M.E.,** 2021, Kasımpatı, Kazaz S., Yalçın Mendi Y. (Ed.); Süs Bitkileri Islahı (Türler), Gece Kitaplığı, Ankara, 321-373 s.
- Haspolat, G.,** 2022, Changes on mutant pot chrysanthemums (*Dendranthema × grandiflora* Tzelev.), Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca Volume 50, Issue 4, Article number 13002, DOI:10.15835/nbha50413002.
- Hemlata, C., and Mahdi A.,** 2016, *In vitro* regeneration of *Chrysanthemum morifolium* cv. White through petal explant, IJSSR,, 5(1), 35-44 pp.
- Hemsley, W.B.,** 1889, The history of the chrysanthemum: the principle modification of the chrysanthemum, Gardeners Chronicle, 6:586-587 pp.
- Himstedt, J.P., Jacobsen, H.J. and Fischer, K.,** 2000, Shoot regeneration from stem and leaf explants of Chrysanthemum (*Dendranthema × grandiflorum*), Acta Hortic., 560: 421–424 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Hisamura, A., Mine, D., Takebe, T., Abe, T., Hayashi, Y. and Hirano, T.,** 2016, Breeding of summer-autumn flowering chrysanthemum cv. Hakuryo with a little generation of malformed flower. RIKEN Accel. Prog. Rep. 49: 24.
- Imakiire, S., Nagayoshi, S., Koriyama, K. and Ueno, K.,** 2006, Breeding process and characteristics of standard type chrysanthemum cultivar “Aladdin.” Bull. Kagoshima Agric. Res. Cent. 34: 15–19.
- Imtiaz, M., Khattak, A.M., Ara, N., Iqbal, A. NS Rahman, H.U.,** 2014, Micropropagation of *Jartorpha Curcas* L. through Shoot Tip Explants Using Different Concentrations of Phytohormones, J. Anim. Plant Sci., 24: 229–233 pp.
- Imtiaz, M., Khattak, A.M., Khan, M.A., Jalal, F., Hussain, S., Said, F. and Bo, H.,** 2019, Rapid *in vitro* propagation of *Chrysanthemum morifolium* through shoot bud explants, Pak. J. Bot., 51:1093–1098 pp.
- Jahan, M.T., Islam, M.R., Islam, S.S., Das, P., Islam, M.M., Kabir, M.H. and Mamun, A.N.K.,** 2021, Clonal propagation of *Chrysanthemum morifolium* Ramat using various explants obtained from field grown plants, GSC Biol. Pharm. Sci., 16: 087–093 pp.
- Jaramillo, H. E., Moreno, A., Forero, A., Cancino, G., Monsalve, L. and Acero, W.,** 2008, *In vitro* regeneration of three chrysanthemum (*Dendrathera grandiflora*) varieties "via" organogenesis and somatic embryogenesis, Universitas Scientiarum, 13. 118-127.
- Jarzina, A.S., Zenkteler, M. and Podlowska, B.,** 1982, Regeneration of plants from leaves of *Chrysanthemum morifolium* Ram. cv. Bronze Bornholm in *in vitro* cultures, Acta Societatis Botanicorum Poloniae, 51(2):173-178 pp.
- Jerzy, M. and Lubomski, M.,** 1991, Adventitious shoot formation on *ex in vitro* derived leaf explants of *Gerbera jamesonii*, Scientia Horticulturae, 47:115-124 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Jerzy M. and Zalewska M.**, 1996. Polish cultivars of *Dendranthema grandiflora* Tzvelev and *Gerbera jamesonii* bred *in vitro* by induced mutations. Mut. Breed. Newslett. 42, 19.
- Jevremovic, S., and Radojevic, L.J.**, 2004, Mass production of different Chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*) cultivars by culture *in vitro*, J. Sci. Agric. Res., 65: 47–54 pp.
- Jevremovic, S., Subotic, A., Miljkovic, D., Trifunovic, M., Petric, M., Cingel, A.**, 2011, Clonal fidelity of chrysanthemum cultivars after long term micropropagation by stem segment culture. Acta Hortic. 2011; 961:211–216. doi: 10.17660/ActaHortic.2012.961.25.
- Jo, Y.D. and Kim J.B.**, 2019, Frequency and spectrum of radiation-induced mutations revealed by whole-genome sequencing analyses of plants, Quantum Beam Sci 3:7.
- Jones, E.M.**, 1958, Early-flowering chrysanthemums, W.H. & L. Collingridge Ltd., London.
- Kantoğlu, K.Y., Tepe, A., Kunter, B., Fırat, A.F. and Peşkircioğlu, H.**, 2014, Vegetable crops breeding by induced mutation and a practical case study of *Capsicum annuum* L., In: Mutagenesis: Exploring Genetic Diversity of Crops. Wageningen Academic Publishers., Tomlekova, N.B., Kozgar, M. I. and Wani, M. R. (eds), 41-55, The Netherlands.
- Kantoğlu, K.Y. ve Kunter, B.**, 2021, Mutasyon ıslahı. Ed: N., Y., Mendi ve S. Kazaz. Süs Bitkileri Islahı (Klasik ve Biyoteknolojik Yöntemler), 145-202 s, Gece Kitaplığı, ISBN 978-625-7478-51-9.
- Kang, E.J., Lee, Y.M., Sung, S.Y., Ha, B.K., Kim, S.H., Kim, D.S., Kim, J.B. and Kang, S.Y.**, 2013, Analysis of the genetic relationship of gamma-irradiated *in vitro* mutants derived from standard-type *Chrysanthemum* cv. Migok, Hortic. Environ. Biotechnol., 54:76–81 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kapadiya, D.B., Chawla, S. L., Patel, A. I. and Ahlawat, T. R.,** 2014, Exploitation of variability through mutagenesis in chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.) var. Maghi, The Bioscan 9 (4), 1799-1804.
- Karim, M.Z., Amin, Asaduzzaman, M.N., Islam, F.H.S. and Alam, R.,** 2002, Rapid multiplication of *Chrysanthemum morifolium* through *in vitro* culture, Pakistan Journal of Biological Sciences, 5:1170-1172 pp.
- Karper, J.J. and Pierik, R.L.M.,** 1981, Gemuteerde kalanchoe blomen kunnen vegetaited worden vermeerderd, Vakkblad Voor de Bloemisterij, 36(44):44-45 pp.
- Kaul, V., Miller, R.M., Hutchinson, J.F. and Richards, D.,** 1990, Shoot regeneration from stem and leaf explants of *Dendranthema grandiflora* Tzvelev (syn. *Chrysanthemum morifolium* Ramat.). Plant Cell, Tissue Organ Cult. 21(1): 21-30.
- Kaul, A., Kumar, S., Thakur, M. and Ghani, M.,** 2011, Gamma ray-induced *in vitro* mutations in flower colour in *Dendranthema grandiflora* Tzelev., Floriculture and Ornamental Biotechnology, 5(1): 71-73 pp.
- Kazaz, S., Erken, K., Karagüzel, Ö., Alp, Ş., Öztürk, M., Kaya, A.S., Gülbağ, F., Temel, M., Erken, S., Saraç, Y.E., Elinç, Z., Salman, A. ve Hocagil, M.,** 2015, Süs bitkileri üretiminde değişimler ve yeni arayışlar, Türkiye Ziraat Mühendisliği VIII. Teknik Kongresi Bildiri Kitabı-1, 645-672 s.
- Kazaz, S.,** 2019, Süs Bitkileri Yetiştiriciliği Ders Notları, 2018-2019 Eğitim-Öğretim Yılı, Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Erişim Tarihi: 20.07.2023.
- Kazaz, S., Kılıç, T., Doğan, E., Yalçın Mendi, Y. ve Karagüzel, Ö.,** 2020, Süs Bitkileri Üretiminde Mevcut Durum ve Gelecek, IX. Türkiye Ziraat Mühendisliği Teknik Kongresi Kitabı, 673-698 s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kazaz, S.**, 2021, Dünyada ve Türkiye’de Süs Bitkileri Sektörü, Kazaz S., Yalçın Mendi Y. (Ed.); Süs Bitkileri Islahı (Türler), Gece Kitaplığı, Ankara, 19-57 s.
- Kazeroonian, N., Power, J.B. and Davey, M.R.**, 2014, An Assessment of Somaclonal Variation on *Chrysanthemum* Cv. “Rosomee Splendid”, Sci. Hortic., 38: 287–294 pp.
- Kazeroonian, R., Mousavi, A., Jari, S. K. and Tohidfar, M.**, 2018, Factors influencing *in vitro* organogenesis of *Chrysanthemum morifolium* cv. 'Resomee Splendid'. Iran J Biotech., 16(2):1454. <https://doi.org/10.21859/ijb.1454>
- Kengkarj, P.; Smitamana, P.; Fujime, Y.**, 2008, Assessment of somaclonal variation in *Chrysanthemum* (*Dendranthema Grandiflora* Kitam.) using RAPD and morphological analysis, Plant Tissue Cult. Biotechnol., 18:139–149 pp.
- Kereša, S., Mihovilović, A., Barić, M., Židovec, V., and Skelin, M.**, 2012, The micropropagation of chrysanthemums via axillary shoot proliferation and highly efficient plant regeneration by somatic embryogenesis, African Journal of Biotechnology, 11: 6027-6033 pp.
- Khalid, N., Davey, M. R., and Power, J. B.**, 1989, An assessment of somaclonal variation in *Chrysanthemum morifolium*: the generation of plants of potential commercial value, Sci. Hortic., 38: 287–294 pp.
- Kharkwal, M.C.**, 2012, A brief history of plant mutagenesis. In: Shu QY, Forster BP, Nakagawa H, editors. Plant mutation breeding and biotechnology, Wallingford: CABI, 21-30 pp.
- Kharkwall, M.C.**, 2017, Mutation breeding for crop improvement, Geography and You, 102: 27-32 pp.
- Kim, Y.S., Sang, Y.S., Jo, J.D., Lee, H.J., and Sang, H.K.**, 2016, Effects of gamma ray dose rate and sucrose treatment on mutation induction in chrysanthemum, Eur. J. Hortic. Sci., 81(4): 212–218 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kiranmayi, M., Ravindra Kumar, K., Ramanandam, G. and Paratpara Rao, M.,** 2022, Effect of micro-wave radiation on *in vitro* plant regeneration in Chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*), Biological Forum – An International Journal, 14(3): 1074-1078.
- Kong, Y, Bai, JR, Shang, H.Z. and Wang, N.Y.,** 2013, Application of heavy ion beam irradiation in ornamental flowers breeding, Acta Horticulturae Sinica, 40(9): 1837–1845 pp.
- Kapoor, M., Kumar, P. and Lal, S.,** 2014, Gamma radiation induced variations in corn marigold (*Glebionis segetum*) and their RAPD-based genetic relationship, Indian J Agric Sci, 84:796-801.
- Kornerup, A. and Wanscher J. H.,** 1978, Methuen Handbook of Colour, 3rd Edt. Eyre Methuen, London, 252 p.
- Kumar, R., De, L. C. and Baiswar, P.,** 2007, Production of chrysanthemum under greenhouse condition. Conference Paper (<https://www.reseachgate.net/publication.> Production of chrysanthemum under greenhouse conditions/ (Son Erişim Tarihi 25.12.2022).
- Kumar, B., Kumar, S. and Thakur, M.,** 2012, *In vitro* mutation induction and selection of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* Tzelev) lines with improved resistance to *Septoria obesa*, Sydney International Journal of Plant Research, 2(4):103-107 pp.
- Kumar, G., Sindhu, S., Kumar, S. and Ruati, V.,** 2017, *In vitro* isolation, regeneration and purification of yellow mutant in chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*) cv. Lalit through ray floret regeneration, Indian Journal of Agricultural Sciences, 87:958-63 pp.
- Kumari, K., Dhatt, K.K. and Kapoor, M.,** 2013, Induced mutagenesis in Chrysanthemum morifolium variety ‘Otome pink’ through gamma irradiation, The Bioscan, 8(4):1489-1492.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kulpa, D.**, 2011, Plant regeneration in inflorescence culture of chrysanthemum (*Dendranthema x grandiflora* (Ramat.) Kitamura), Journal of Food, Agriculture & Environment, 9(1): 715-718 pp.
- Lamseejan, S., Jompuk, P., Wongpiyasatid, A., Deeseepan, S. and Kwanthammachart P.**, 2000, Gamma-rays induced morphological changes in chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*), Kasetsart J. (Nat. Sci.), 34: 417–422 pp.
- Lee, Y.M., E.J. Kang, S.Y. Sung, S. H. Kim, B. K. Ha, D. S. Kim. J.B. Kim, and S. Y. Kang.**, 2013, The effects of plant growth regulators on plant regeneration and direct shoots formation of petal explants of chrysanthemum flower color mutants varieties, “ARTI-purple” and “ARTI –queen”. Kor. J. Hort. Sci. Technol., 31(3):359-365 pp.
- Lema-Rumińska, J. and Niedojadlo, J.**, 2014, Somatic embryogenesis in leaf explants of chrysanthemum radiomutants of the ‘lady’ group, Propagation of Ornamental Plants Vol. 14, No 4, 177-183.
- Lim, K.B., Kwon, S.J., Lee, S.I.**, 2012, Influence of genotype, explant source, and gelling agent on *in vitro* shoot regeneration of chrysanthemum, Hortic. Environ. Biotechnol., 53:329–335 pp. <https://doi.org/10.1007/s13580-012-0063-x>
- Liu, C.X., Ma, X., Dong, F.L., Zhou, Y.W.**, 2015, Establishment of regeneration system of *Chrysanthemum morifolium* ‘ziyan’ and ‘niu 9722’, Pratacultural Sci., 32:188–195 pp.
- Longley, L.E.**, 1949, Chrysanthemums for the North, Horticulture, 27(11):404.
- Longley, L.E.**, 1950, Chrysanthemum breeding at the University of Minnesota, National Chrysanthemum Society Bulletin, 5:45-46.
- Lönnig, W.E.**, 2005, Mutation breeding, evolution, and the law of recurrent variation. Recent Res. Dev. Genetics Breeding, 2:45-70 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Mahure, H.R., Choudhary, M.L., Prasad, K.V. and Singh, S.K.,** 2010, Mutation in chrysanthemum through gamma irradiation, Indian J. Hort. 67(Special Issue), November 2010: 356-358.
- Maluszynski, M., Ahloowalia, B.S. and Sigurbjornsson, B.,** 1995, Application of *in vivo* and *in vitro* mutation techniques for crop improvement, Euphytica, 85:303–315 pp.
- Mandal, A.K.A., Chakrabarty, D. and Datta, S.K.,** 2000a, Application of *in vitro* techniques in mutation breeding of chrysanthemum, Plant Cell Tissue and Organ Culture, 60:33–38 pp.
- Mandal, A.K.A., Chakrabarty, D. and Datta, S.K.,** 2000b, *In vitro* isolation of solid novel flower colour mutants from induced chimeric ray florets of chrysanthemum, Euphytica, 114:9–12 pp.
- Mandal, A.K.A. and Datta, S.K.,** 2005, Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from ray florets of chrysanthemum, Biologia Plantarum, 49 (1): 29-33.
- Mani, T. and Senthil, K.,** 2010, Somatic embryogenesis and regeneration in *Chrysanthemum*, BTAIJ, 4(4), 161-167 pp.
- Matsumura, A., Nomizu, T., Furutani, N., Hayashi, K., Minamiyama, Y. and Hase, Y.,** 2010, Ray florets color and shape mutants induced by $^{12}\text{C}^{5+}$ ion beam irradiation in chrysanthemum, Sci Hortic. 123:558–661.
- May, R.A. and Trigiano, R.N.,** 1991, Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaves of *Dendranthema grandiflora*, J. Amer. Soc. Hort. Sci., 116(2):366-371 pp.
- Melsen, K., Van de Wouw, M. and Contreras, R.,** 2021, Mutation breeding in ornamentals, HortScience horts, 56(10):1154-1165 pp.
<https://doi.org/10.21273/HORTSCI16001-21>
- Mikkelsen, E. and Sink, K.,** 1978, *In vitro* propagation of Rieger elatior Begonia, Hortscience, 13(3):242-244.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Miler, N. and Zalewska, M.,** 2014, Somaclonal variation of chrysanthemum propagated *in vitro* from different explants types, Acta Sci. Pol. Hortorum Cultus, 13:69–82 pp.
- Miler, N. and Muszczyk, P.,** 2015, Regeneration of callus and shoots from the ovules and ovaries of chrysanthemum *in vitro*, Canhoto, J. M. and Correia, S. I. (Eds) Acta Hort, 20:103-106.
- Miler, N. and Kulus, D.,** 2018, Microwave treatment can induce chrysanthemum phenotypic and genetic changes, Sci Hortic 227:223–233.
- Miler, N., Kulus, D. and Sliwinska, E.,** 2020, Nuclear DNA content as an indicator of inflorescence colour stability of *in vitro* propagated solid and chimera mutants of chrysanthemum. Plant Cell Tissue Organ Cult (PCTOC). 143(2):421–430.
- Miler, N., Iwona, J., Jakubowski, S. and Winiecki, J.,** 2021, Ovaries of chrysanthemum irradiated with high-energy photons and high-energy electrons can regenerate plants with novel traits, Agronomy, 2021;11:1111.
- Misra, P., Datta, S.K. and Chakrabarty, D.,** 2003, Mutation in flower colour and shape of *Chrysanthemum morifolium*, Induced by γ -Radiation, Biol. Plant, 47:153–156 pp.
- Misra, P. and Datta, S.K.,** 2007, Standardization of *in vitro* protocol in *Chrysanthemum* cv. Madam E Roger for development of quality planting material and to induce genetic variability using γ -radiation, Indian Journal of Biotechnology, 6:121-124 pp.
- Morton, J.,** 1891, Chrysanthemum culture for America, Rural Publishing Co., New York.
- MVD,** 2023, International Atomic Energy Authority, Mutant Variety Databases, <https://mvd.iaea.org/>. Erişim Tarihi: 28.07.2023.
- Murgayanti, S.E.; Wieny, R.H. and Rustiani, S.,** 2010, Callus formation and plant regeneration of Chrysanthemum leaf disks explants through *in vitro*, International. Int. Semin. Hortic. Support Food Secur., 4:22–23.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Nagatomi, S.**, 2001, New approaches for effective mutation induction in gamma field, JP0150433. JAERI-Conf 2001-003, 123-133 pp.
- Nagatomi, S. and K. Degi.**, 2009, Mutation breeding of Chrysanthemum by gamma field irradiation and *in vitro* culture, 258–261 pp., In: Q.Y. Shu (ed.), Induced plant mutations in the genomic era, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
- Nahid, J.S., Shyamali, S. and Kazumi, H.**, 2007, High frequency shoot regeneration from petal explants of *Chrysanthemum morifolium* Ramat. in *in vitro*, Pak. J. Biol. Sci., 10: 3356–3361.
- Naing, A.H., Kim, C.K., Yun, B.J., Jin, J.Y. and Lim, K.B.**, 2013, Primary and secondary somatic embryogenesis in *Chrysanthemum* Cv. Euro., Plant Cell Tissue Organ Cult., 112: 361–368.
- Naing, A.H., Jeon, S.M., Han, J.S., Lim, S.H., Lim, K.B. and Kim, C.K.**, 2014, Factors influencing *in vitro* shoot regeneration from leaf segments of Chrysanthemum, Comptes Rendus-Biol., 337:383–390 pp.
- Naing, A.H. and Kim, C.**, 2014, Seasonal effects on shoot regeneration from petal explants of Chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*) cv. ‘Baeksun’, Current Research on Agriculture and Life Science, 32. 10.14518/crals.2014.32.4.031.
- Nakornthap, A.**, 1974, Radiation induced somatic mutations in Kalanchoe (*Kalanchoe laciniata*), Mutation Breeding Newsletter, 3:14 p.
- Nalini, R.**, 2012, Micropropagation of Chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*) using shoot tip as explants, International Journal of Food, Agriculture and Veterinary Sci., 2(2):62-66 pp.
- Nalini, R., Anjana, M.J., Arathi, C.S., Aswathy, M., Ayana, B. and Bhuvaneswari, R.**, 2016, Effect of growth regulators on micropropagation of Chrysanthemum (*Dendranthema Grandiflora* Ramat.) Scru., IRJ Agric, 3: 7–9 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Nasri, F., Zakizadeh, H., Vafae, Y. and Mozafari, A.A.,** 2018, *In vitro* propagation of Chrysanthemum: an Overview on its Utility in Mutagenesis and Genetic Transformation Techniques, Agri Res & Tech: Open Access J, 15(4):102-105 pp.
- Nasri, F., Zakizadeh, H., Vafae, Y. and Mozafari, A.A.,** 2022, *In vitro* mutagenesis of *Chrysanthemum morifolium* cultivars using ethylmethanesulphonate (EMS) and mutation assessment by ISSR and IRAP markers. Plant Cell Tiss Organ Cult 149, 657–673. <https://doi.org/10.1007/s11240-021-02163-7>
- New York Botanical Garden,** 2023, “Classifications on Chrysanthemums”, <https://libguides.nybg.org> , (Erişim Tarihi: 15.08.2023).
- Oladosu, Y., Rafii, M.Y., Abdullah, N., Hussin, G., Ramli, A., Rahim H.A., Miah, G. and Usman, M.,** 2016, "Principle and application of plant mutagenesis in crop improvement: a review.", Biotechnology & Biotechnological Equipment, 30(1). 1-16 pp.
- Okada, T., Ikeda, H., Oono, Y., Yoshihara, R., Hase, Y. and Narumi, I.,** 2010, Development of new Gunma original variety of chrysanthemum by ion beam irradiation, JAEA Takasaki Ann. Rep. 2009: 63.
- Okamura, M., Hase, Y., Furusawa, Y. and Tanaka, A.,** 2015, Tissue-dependent somaclonal mutation frequencies and spectra enhanced by ion beam irradiation in chrysanthemum, Euphytica 202: 333–343.
- Özzambak, M.E., Okul, E.N., Gün, İ., Zanjani, S.R.Y. ve Zeybekoğlu, E.,** 2017a, Barış Zambağı (*Spathiphyllum*)’nın *in vitro* kültüründe besin ortamına ilave edilen farklı antibiyotiklerin çoğalma ve gelişme üzerine etkileri, IV. Süs Bitkileri Kongresi Bildiriler Kitabı, Antalya, 303-307 s.
- Özzambak, M.E., Zanjani, S.R.Y., Gün, İ. ve Zeybekoğlu, E.,** 2017b, Nergisin farklı besin ortamlarında *in vitro* çoğaltılması, IV. Süs Bitkileri Kongresi Bildiriler Kitabı, Antalya, 298-302s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Özzambak, M.E., Zeybekoğlu, E., Gün, İ. ve Kılınç, T.,** 2018, *Spathiphyllum*'un *in vitro* mikro çoğaltımı üzerine şeker konsantrasyonlarının etkileri, Sakarya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 22(3):1015-1023 s.
- Özzambak, M.E., Şenel, Ü., Haspolat, G., Zeybekoğlu, E. ve Başer, S.,** 2021a, Mikroçoğaltım Teknikleri, Ed: N., Y., Mendi ve S. Kazaz. Süs Bitkileri Islahı (Klasik ve Biyoteknolojik Yöntemler), 341-360 s, Gece Kitaplığı. ISBN 978-625-7478-51-9.
- Özzambak, M.E., Haspolat, G., Şenel, Ü., Zeybekoğlu, E. ve Başer, S.,** 2021b, Somaklonal Varyasyon, Ed: N., Y., Mendi ve S. Kazaz. Süs Bitkileri Islahı (Klasik ve Biyoteknolojik Yöntemler), 393-412 s, Gece Kitaplığı. ISBN 978-625-7478-51-9.
- Özzambak, M.E. ve Zeybekoğlu, E.,** 2023, Kesme Çiçek Yetiştiriciliği, 5. Bölüm, Kasımpatı Yetiştiriciliği, Basımda.
- Palai, S.K., and Rout, G.R.,** 2011, Characterization of new variety of Chrysanthemum by using ISSR markers, Hortic. Bras., 29(4).
- Pant, M., Lal, A. and Jain, R.,** 2015, A simple cost effective method for mass propagation of *Chrysanthemum morifolium* and antibacterial activity assessment of *in vitro* raised plantlets, J. Appl. Pharm. Sci., 5:103–111 pp.
- Park, S.H., Kim, G.H. and Jeong, B.R.,** 2007, Adventitious shoot regeneration from cultured petal explants of Chrysanthemum, Hortic. Environ. Biotechnol, 48: 387–392 pp.
- Pathirana, R.,** 2011, Plant mutation breeding in agriculture. In CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources, 6-032. <https://doi.org/10.1079/PAVSNNR20116032>
- Patil, U.H., Deshmukh, G.N. and Kazi, N.A.,** 2015, Mutation breeding in chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* T.), Asian Journal of Multidisciplinary Studies, 3(4):25-27 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Patil, U.H., Karale, A.R., Katwate, S.M. and Patil, M.S.,** 2017, Mutation breeding in chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* T.), Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry, 6(6): 230-232 pp.
- Penna, S., Sonawane, B. and Patade, V.,** 2012, *In vitro* mutagenesis and selection for crop improvement: strategies and prospects, In book: Bioremediation, Biodiversity and Bioavailability Edition: 6 (Special Issue 1), Global Science Book.
- Petty, L.M., Harberd, N.P., Carré, I.A., Thomas, B. and Jackson, S.D.,** 2003, Expression of the Arabidopsis Gai Gene under Its Own Promoter Causes a Reduction in Plant Height in Chrysanthemum by Attenuation of the Gibberellin Response, Plant Sci., 164:175–182 pp.
- Pierik, R.L.M.,** 1997, *In Vitro* Culture of Higher Plants; Springer: Dordrecht, The Netherlands, 250 p.
- Prathyusha, N., Dorajeerao, A.V.D., Ravindrakumar, K., Aparna, D. and Salomi Suneetha, D.R.,** 2021, *In vitro* propagation of chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*) cultivars from ray floret explants, The Pharma Innovation Journal, 10(10): 415-417.
- Purente, N., Chen, B., Liu, X., Zhou, Y. and He, M.,** 2020, Effect of ethyl methanesulfonate on induced morphological variation in M3 generation of *Chrysanthemum indicum* var. aromaticum, HortScience, 55:1099-1104.
- Puripunyanich, V., Piriaphattarakit, A., Chanchula, N. and Taychasinpitak, T.,** 2019, Mutation induction of *in vitro* Chrysanthemum by gamma irradiation, Chiang Mai Journal of Science, v.46, n.3, 609-617 p.
- Randall, H. and Wren, A.,** 1983, Growing chrysanthemums. Croom Helm Ltd. Kent, U.K.
- Roest, S., Van Berkel, M.A.E., Bokelmann, G.S. and Broertjes, C.,** 1981, The use of an *in vitro* adventitious bud technique for mutation breeding of *Begonia* x *Hiemalis*, Euphatica, 30(2):381-388 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Rout, G.R. and Das, P.,** 1997, Recent trends in the biotechnology of Chrysanthemum: a critical review, Sci. Hortic, 69 (3-4): 239-257 pp.
- Rout, G. R., Mohapatra, A. and Jain, S.M.,** 2006, Tissue culture of ornamental pot plant: A critical review on present scenario and future prospects, Biotechnology advances, 24(6): 531-560 pp.
- Sadhukhan, R., Swathi, K., Sarmah, D. and Mandal, T.,** 2015, Effect of different doses of gamma rays on survivability and rooting ability in chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.), Journal Crop and Weed, 11(1):62-65 pp.
- Sagel, Z. Peskircioglu, H., Tutluer, I., Uslu, N., Senay, A., Taner, K.Y., Kunter, B., Sekerci, S., ve Yalcin, S.,** 2002, Bitki Islahında Mutasyon ve Doku Kültürü Teknikleri, III: Ulusal Mutasyon Kursu Kurs Notları, TAEK, ANTHAM Nükleer Tarım Radyobioloji Bölümü, Ankara.
- Sakamoto, K., Takatori, Y., Chiwata, R., Matsumura, T., Tsukiashi, K., Hayashi, Y. and Abe, T.,** 2016, Production of mutant line with early flowering at low temperature in spray-type chrysanthemum cultivar induced by C-ion beam irradiation, RIKEN Accel. Prog. Rep. 49: 262.
- Salleh, S., Ahmad, Z., Hassan, A.A., Awang, A., Sandrang, A.K. and Abdullah, T.L.,** 2012, Effect of ion beam irradiation on morphological and flowering characteristics of chrysanthemum, Research and Development Seminar 2012.
- Salleh S., Ahmad, Z., Hassan, A.A., Awang, Y. and Oona, Y.,** 2015, Effects of ion beam irradiation on morphological and flowering characteristics of chrysanthemum, Jurnal Sains Nuklear Malaysia, 2027(2): 31-38.
- Sauvadet, M.A., Brochard, P. and Boccon-Gibod, J. A.,** 1990, Protoplast-to-plant system in Chrysanthemum: differential responses among several commercial clones, Plant Cell Rep., 8: 692–695 pp.
- Schum, A. and Preil, W.,** 1998, Induced mutations in ornamental plants,. In S. Mohan Jain, D.S. Brar and B.S. Ahloowalia. (eds.). Somaclonal Variation and Induced Mutations in Crop Improvement, Kluwer Academic Publishers, 333–366 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Schum, A.**, 2003, Mutation breeding in ornamentals: an efficient breeding method?, *Actahorticulturae*, 612:6, 47-60 pp.
- Scott, E.L.**, 1957, The breeders handbook. Handbook No. 4. Nat', Chrysanthemum Society.
- Setia, M.K., Bala, M. and Singh, S.**, 2020, Induction of novel inflorescence traits in Chrysanthemum through ^{60}Co gamma irradiation, *International Journal of Radiation Biology*, 96: (10), 1309-1316 pp.
- Shama Rao, H.K. and Singh, Y.**, 1976, Gamma ray induced early bulbil formation and growth abnormalities in *Kalancho daigremontiana* H. and P., *Indian journal of Experimental Biology*, 14:358-360 pp.
- Shama Rao, H.K.**, 1977, Gamma ray induces mutations in *Kalanchoe daigremontiana* H and P., *Indian Journal of Experimental Biology*, 15(4):326-328.
- Shinoyama, H., Kazuma, T., Komano, M., Nomura, Y. and Tsuchiya, T.**, 2002, An efficient transformation system in chrysanthemum [*Dendranthema × grandiflorum* (Ramat.) Kitamura] for stable and non-chimeric expression of foreign genes, *Plant Biotechnol.*, 19:335–343 pp.
- Shinoyama, H., Nomurai, Y., Tsuchiya, T. and Kazuma, T.**, 2004, Efficient method for somatic embryogenesis and plant regeneration from leaves of chrysanthemum (*Dendranthema X grandiflorum* (Ramat.) Kitamura), *Plant Biotechnology*, 2(1): 25-33 pp.
- Shinoyama, H., Anderson N., Furuta H., mochizuki, A., Nomura Y. and Singh R.P.**, 2006, Chrysanthemum biotechnology., In: Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology: Advances and Topical Issues (Volume I, 1 st Edn). J.A. Teixeira da Silva (ed), Global Science Books, Ltd., Isleworth, UK: 140-163 p.
- Shirao, T., Ueno, K., Minami, K., Tanaka, A., Imakiire, S., Hase, Y. and Tanaka, A.**, 2007, Ion beam breeding of chrysanthemum cultivar 'Sanyo-ohgon', *JAEA Takasaki Ann. Rep.* 2006: 74.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Shu, Q.Y., Forster, B.P. and Nakagawa, H.,** 2011, Plant mutation breeding and biotechnology, plant breeding and genetics section joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture International Atomic Energy Agency, Vienna, Austria, 371-385 pp.
- Shu, Q.Y., Forster, B.P., Nakagawa, H.,** 2012, Principles and applications of plant mutation breeding, In: Shu QY, Forster BP, Nakagawa H, editors, Plant mutation breeding and biotechnology, Wallingford: CABI; 301-325 pp.
- Singh, A.K.,** 2006, Chrysanthemum, Flower crops cultivation and management, New India Publishing Agency, ISBN.81-89422-35-9, 73-93 pp.
- Singh, M. and Bala, M.,** 2015, Induction of mutation in chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* Tzvelev.) cultivar Bindiya through gamma irradiation. Indian Journal of Horticulture 72(3):376-381.
- Singh, M. and Bala, M.,** 2019, Effect of different colours of light as night break on growth and flowering of chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium* ramat.) genotypes, Agric Res J 56 (3) : 572-575 pp.
- Smith, M.,** 1985, *In vitro* mutagenesis, Annual Review of Genetics, 19: 423-462 pp.
- Smith, R.H.,** 2012, Plant Tissue Culture: Techniques and Experiments; Elseivier, Academic Press: Cambridge, MA, USA, 183 p.
- Soliman, T.M.A., Lv, S., Yang, H., Hong, B., Ma, N. and Zhao, L.,** 2014, Isolation of flower color and shape mutations by gamma radiation of *Chrysanthemum morifolium* Ramat cv. Youka, Euphytica, 199, 317–324 pp.
- Song, J.Y., Mattson, N.S. and Jeong, B.R.,** 2011, Efficiency of shoot regeneration from leaf, stem, petiole and petal explants of six cultivars of *Chrysanthemum morifolium*, Plant Cell Tiss Organ Cult, 107:295–304 pp.
- Steward, F. C., Mapes, M. O. and Smith, J.,** 1958, Growth and organized development of cultured cells. I. Growth and Division of Freely Suspended Cells. American Journal of Botany, 45(9), 693–703.
<https://doi.org/10.2307/2439507>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Stewart, R.N. and Dermen, H.,** 1970, Somatic genetic analysis of the apical layers of chimeral sports in chrysanthemum by experimental production of adventitious shoots, *Am J Bot*, 57:1061–1071 pp.
- Suprasanna, P., Jain, S.M., Ochatt, S.J., Kulkarnia, V.M. and Predierid, S.,** 2012, Applications of In Vitro Techniques in Mutation Breeding of Vegetatively Propagated Crops, In: Shu QY, Forster BP, Nakagawa H, editors. *Plant mutation breeding and biotechnology*, Wallingford: CABI, 371-385.
- Susila, E., Susilowati, A. and Yunus A.,** 2019, The morphological diversity of *Chrysanthemum* resulted from gamma ray irradiation. *Biodiversitas* 20(2):463-467.
- Suzuki, K., Takatsu, Y., Gonai, T., Nogi, M., Sakamoto, K., Fukunishi, N., Ryuto, H., Saito, H., Abe, T. and Yoshida, S.,** 2005, Flower color mutation in spray-type chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitamura) induced by heavy-ion beam irradiation, *RIKEN Accel. Prog. Rep.* 38: 138.
- Tamaki, K., Yamanaka, M., Hayashi, Y., Abe, T. and Koyama, Y.,** 2017, Effect of the cultivar characteristics on the appearance of flower color mutants by C-ion irradiation in chrysanthemum, *Hort. Res. (Japan)* 16: 117–123.
- Tamari, M., Tanokashira, Y., Nagayoshi, S., Kido, K., Tojima, F., Hase, Y. and Oono, Y.,** 2017, Development of low temperature-flowering chrysanthemum variety ‘Ryujin’ and ‘Touma’, *QST Takasaki Ann. Rep.* 2015. 130.
- Tanaka, R. and Watanabe, K.,** 1972, Embryological studies in *Chrysanthemum* cv. makinoi and its hybrid crossed with hexaploid *Chrysanthemum* cv. Japonense, *Hiroshima Daigaku. J. Faculty Sci., Hiroshima Univ., Ser. B, Div. 2 (Botany)*, 14(2):75-84 pp.
- Tanaka, K., Kanno, Y., Kudo, S. and Suziki, M.,** 2000, Somatic embryogenesis and plant regeneration in chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitamura), *Plant Cell Reports*, 19:946–953 pp.
<https://doi.org/10.1007/s002990000225>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Tanokashira, Y., Nagayoshi, S., Hirano, T. and Abe, T.,** 2014, Effects of heavy-ion-beam irradiation on flower-color mutation in chrysanthemum, RIKEN Accel. Prog. Rep. 47: 297.
- Telem, R., Sadhukhan, R., Wani, S., Sarkar, H. and Singh, N.,** 2016, Estimating the efficiency of different explants for direct *in vitro* multiple shoots development in chrysanthemum, International Journal of Agriculture, Environment and Biotechnology, 9(3):345-352 pp.
- Teixeira da Silva, J.A.,** 2003, Chrysanthemum: advances in tissue culture, postharvest technology, genetics and transgenic biotechnology, Biotechnol. Adv., 21:715-766 pp.
- Teixeira da Silva, J.A.,** 2004, Ornamental chrysanthemums: improvement by biotechnology, Plant Cell Tissue Organ Cult., 79: 1 p.
- Teixeira da Silva, J.A., Shinoyama, H., Aida, R., Matsushita, Y., Raj, SK., Chen, F.,** 2013, Chrysanthemum biotechnology:quo vadis?, Critical Reviews in Plant Sciences, Vol.32, No.1:21 p.
- Teixeira da Silva, J.A.,** 2014, Organogenesis from chrysanthemum *Dendranthema x grandiflora* (Ramat.) Kitamura petals (disc and ray florets) induced by plant growth regulators, Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology, 22 (1): 145-151 pp.
- Teixeira da Silva, J.A. and Kulus, D.,** 2014, Chrysanthemum biotechnology: discoveries from the recent literature, Folia Hort. 26/2: 67-77 p.
- Teixeira da Silva, J.A., Lema- Rumińska, J., Tymoszek, A. and Kulpa, D.,** 2015, Regeneration from chrysanthemum flowers: a review. Acta Physiologiae Plantarum 37(2):36 p.
- Thangmanee, C. and Kanchanapoom, K.,** 2011, Regeneration of chrysanthemum plants (*Chrysanthemum* × *Grandiflorum* (Ramat.) Kitam.) by callus derived from ray floret explants, Propagation of Ornamental Plants, 11(4):204-209 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Thao, L.D., Dung, N.V. and Tham, N.T.,** 2015, Study on chrysanthemum breeding by gamma (Co⁶⁰) irradiation on callus of 4 exotic varieties, Journal of Agricultural Technology 2015 Vol. 11(8):1813-1822 pp.
- The National Chrysanthemum Society Inc. USA,** 2023, “Line Drawings Chrysanthemum Classes”, <https://mums.org/line-drawings-chrysanthemum-class/>, (Erişim Tarihi: 15.08.2023).
- The Plant List,** 2023, Species in Chrysanthemum, <http://www.theplantlist.org/browse/A/Compositae/Chrysanthemum/>, (Erişim Tarihi: 14.08.2023).
- Thomas, T.D. and Maseena, E.A.,** 2006, Callus induction and plant regeneration in *Cardiospermum halicacabum* (L.) an important medicinal plant, Scientia Horticulturae ,108L, 332–336 pp.
- Tilney-Bassett, R.A.,** 1986, Plant chimera. St. Martin’s Press, ISBN-10 0713129360, 208 p.
- Trademap,** 2022. <https://www.trademap.org/> Erişim Tarihi: 28.07.2023.
- TÜİK,** 2022. Türkiye İstatistik Kurumu, Türkiye Süs Bitkileri Üretim Verileri. <https://biruni.tuik.gov.tr/medas/?locale=tr/> Erişim Tarihi: 14.08.2023.
- Tutuncu, M., Kantoğlu, Y., Kunter, B. and Mendi, N.Y.,** 2023, Induced mutations for developing new ornamental varieties, Mutation Breeding for Sustainable Food Production and Climate Resilience, Ed. Suprasanna Penna, S. Mohan Jain, 669-692pp. 10.1007/978-981-16-9720-3_22.
- Tymoszuik, A. and Zalewska, M.,** 2014a, Biological factors affecting regeneration of adventitious shoots from *in vitro* isolated ligulate florets of chrysanthemum, Acta Sci. Pol. Hortorum Cultus, 13(3):155-165 pp.
- Tymoszuik, A. and Zalewska, M.,** 2014b, *In vitro* adventitious shoots regeneration from ligulate florets in the aspect of application in chrysanthemum breeding, Acta Sci. Pol. Hortorum Cultus, 13: 45–58 pp.
- UPOV,** 2023, www.upov.int, Erişim Tarihi:25.07.2023.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Van Dordrecht, E.M.**, 1984, Mutaatieveredeling bij Kalanchoe veelbeloved, Vakkblad Voor de Bloemistmisterij, 39(25):50-51 pp.
- Van Harten, A.M.**, 1998, Mutation Breeding Theory and Practical Applications, Cambridge University Press, ISBN 0521470749. 353 p.
- Verma, O.P.**, 2012, Standardization of auxin concentration for root induction in *Chrysanthemum morifolium*, Adv. Appl. Sci. Res, 3:1449–1453 pp.
- Verma, A., Prasad, K.V., Singh, S.K. and Kumar, S.**, 2012a, *In vitro* isolation of red coloured mutant from chimeric ray florets of chrysanthemum induced by gamma-ray, Indian J. Hort., 69(4): 562-567 pp.
- Verma, A. K., Prasad, K. V., Janakiram, T. and Kumar, S.**, 2012b, Standardization of protocol for pretreatment, surface sterilization, regeneration, elongation and acclimatization of *Chrysanthemum morifolium* Ramat., Intl. J. Hort., 2(3): 7-12 pp.
- Viehmeyer, G. and Uhlinger, R.D.**, 1955, Chrysanthemum improvement. University of Nebraska, College of Agric. The Agric. Expt. Station Bulletin, SB 428.
- Vilasini, P. and Latipah, Z.**, 2000, Somaclonal variation in *Chrysanthemum morifolium* generated through petal cultures, J. Trop. Agric. And Fd. Sc., 28(2): 115-120 pp.
- Wakita, N., Kazama, Y., Hayashi, Y., Ryuto, H., Fukunishi, N., Yamamoto, K., Ijichi, S. and Abe, T.**, 2008, Induction of floral-color mutation by C-ion irradiation in spray-type chrysanthemum, RIKEN Accel. Prog. Rep. 41: 230.
- Wang, X., Zeng, L., Peng, Y., Xi and C., Lin, D.**, 2013, Studies on rapid-micropropagation technology of different Chrysanthemum cultivars, J. Shanghai Jiaotong Univ. Sci, 31:19–29 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Wang, H., Dong, B., Jiang, J., Fang, W., Guan, Z., Liao, Y., Chen, S. and Chen, F.,** 2014, Characterization of *in vitro* haploid and doubled haploid *Chrysanthemum morifolium* plants via unfertilized ovule culture for phenotypical traits and DNA methylation pattern. *Front. Plant Sci.* 2014; 5:728–738.
- Wang, L., Wu, J., Lan, F., and Gao, P.,** 2020, Morphological, cytological and molecular variations induced by gamma rays in *Chrysanthemum morifolium* ‘Donglinruixue’, *Folia Horticulturae*, 32. 10.2478/fhort-2020-0009.
- Wankhede, K.N., Narkhede, M.N., Shivankar, R.S. and Rathod, T.H.,** 2000, Callus induction and micropropagation studies in *Chrysanthemum*, *Ann. Plant Physiol.*, 14:174–177 pp.
- Waseem, K., Khan, M.Q., Jaskani, J., Khan, M.S.,** 2008, Impact of different auxins on the regeneration of chrysanthemum (*Dendranthema morifolium*) through *in vitro* shoot tip culture, *Pakistan Journal of Agricultural Research*, 20 (1-2), 51-57 pp.
- Waseem, K., Jilani, M.S. and Khan, M.S.,** 2009, Rapid plant regeneration of chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium* L.) through shoot tip culture, *Afr J Biotechnol*, 8:1871–1877 pp.
- Waseem, K., Jilani, M.S., Khan, M.S., Kiran, M. And Khan, G.,** 2011a, Efficient *in vitro* regeneration of chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium* L.) plantlets from nodal segments, *African Journal of Biotechnology*, 10(8):1477-1484 pp.
- Waseem, K., Jilani, M., Jaskani, M., Khan, M., Kiran, Me., Ghazanfar, A. and Khan, U.,** 2011b, Significance of different plant growth regulators on the regeneration of chrysanthemum plantlets (*Dendranthema morifolium* L.) through shoot tip culture, *Pakistan Journal of Botany*, 43:1843-1848 pp.
- Watanabe, K.,** 1977, The control of diploid-like meiosis in polyploid taxa of *Chrysanthemum* (Compositae), *Japanese Journal of Genetics*, 52(2):125-131 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Woolman, J.**, 1953, Chrysanthemums for garden and exhibition, W.H. & L. Collingridge, Ltd., London.
- Xu, P., Zhang, Z., Wang, B., Xia, X., and Jia, J.**, 2012, Somatic embryogenesis and plant regeneration in chrysanthemum (Yuukou), Plant Cell Tiss Organ Cult, 111, 393–397 pp.
- Yamaguchi, H., Shimizu, A., Konosuke, D. and Morishita, T.**, 2008, Effects of dose and dose rate of gamma ray irradiation on mutation induction and nuclear DNA content in chrysanthemum, Breeding Science, 58:331-335 pp.
- Yamaguchi, H.**, 2018, Mutation breeding of ornamental plants using ion beams, Breeding Science, 68: 71-78.
- Yesmin, S. and Hashem, A.**, 2014, Efficient *in vitro* regeneration of chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.) through nodal explant culture, Nuclear Science and Application, 23. 47-50.
- Yesmin, S., Hashem, A., Das, K., Hasan, M. and Mahmud, Islam, M.**, 2017, Efficient *In vitro* regeneration of chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.) through nodal explant culture, 10.13140/RG.2.2.15980.67208.
- Zalewska, M., Lema-Rumińska, J. and Miler, N.**, 2007, *In vitro* propagation using adventitious buds technique as a source of new variability in chrysanthemum, Scientia Horticulturae, 113(1): 70-73 pp.
- Zalewska, M., Miler, N., Tymoszek, A., Drzewiecka, B. and Winiecki, J.**, 2010, Results of mutation breeding activity on Chrysanthemum× grandiflorum (Ramat.) Kitam. in Poland. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities*, 13(4), 27-35.
- Zalewska, M., Miler, N. and Tymoszek, N.**, 2011, New chrysanthemum cultivars as a result of *in vitro* mutagenesis with the application of different explant types, Acta Sci. Pol. Hortorum Cultus, 10(2), 109-123.

TEŞEKKÜR

Doktora öğrenimimin her aşamasında sağladığı akademik katkılarının yanı sıra, paylaştığı hayat tecrübeleri ile nasıl erdemli bir insan olunduğunu da tekrar tekrar gözlemlediğim ve örnek aldığım değerli hocam Prof. Dr. M. Ercan ÖZZAMBAK'a teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmamın kurgusundan yazımına kadarki her aşamasında, fikirleriyle bana yol gösteren ve tez çalışmasının yanı sıra her konuda ilham aldığım eş danışman hocam Dr. K. Yaprak KANTOĞLU' na şükranlarımı sunarım.

Doktora tezi süresince, çalışmamı her daim bir adım daha iyiye ve ileriye taşımam için aydınlatıcı fikir ve düşünceleriyle katkılarını esirgemeyen Doktora Tez İzleme Komitesi üyesi hocam Prof. Dr. Soner KAZAZ'a minnetlerimi sunarım. Göstermiş olduğu pozitif yaklaşımlarıyla, her daim çalışmaya teşvik eden Doktora Tez İzleme Komitesi üyesi hocam Prof. Dr. İbrahim DUMAN'a, katkılarından dolayı teşekkürlerimi sunarım. Lisans öğrenim sürecinden bu yana özenli çalışma konusunda örnek aldığım, tez yazım aşamasında da titiz incelemeleriyle bana bir kez daha yol gösteren doktora tez jürisi üyelerinden Prof. Dr. Uğur ŞİRİN hocama ve her konuda yardımlarını esirgemeyen doktora tez jürisi üyelerinden Dr. Öğr. Üyesi Emrah ZEYBEKOĞLU hocama tezime verdikleri katkılarından dolayı çok teşekkür ederim.

Tez çalışmamı destekleyen T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü ve Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'ne ve çalışanlarına, süs bitkileri şubesi şefi Dr. Gülden Haspolat'a ve yardımlarından dolayı Bayram Çetin'e, mutasyon çalışmaları kapsamında ışınlamaların gerçekleştirildiği Türkiye Enerji, Nükleer ve Maden Araştırmaları Kurumu (TENMAK), Nükleer Enerji Araştırma Enstitüsü (NÜKEN)'e, üretici koşullarında bitkileri gözlemlemek için serasının kapılarını bana açan Kemal KUŞKOVAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Mutasyon ıslahı çalışmalarında tecrübe ve bilgilerine ne zaman başvursam samimiyetle cevap aldığım, yardımlarını esirgemeyen Dr. Burak KUNTER hocama, desteğini ve dostluğunu her daim hissettiren ETAE Bitki Doku Kültürü

Laboratuvarı sorumlusu Biyolog Umut ÖZER'e ve laboratuvar çalışanlarına teşekkürü bir borç bilirim. Araştırmalarım sırasında göstermiş oldukları yardımlar ve manevi katkıları ile yanımda olan Dr. Müge ŞAHİN, Dr. Seda ÜÇEŞ, Zir. Yük. Müh. Kader Kurşun Kırcı, Zir. Yük. Müh. Seza NOYAN, Kimyager Emine Serin ve Dr. Erdem Sefa ŞAHİN'e çok teşekkür ederim.

Her önemli anımda varlıklarıyla güç aldığım Murat Amcam' a ve Nurten Teyzem' e, desteklerini her zaman hissettiğim canım kardeşim Devran'a, ablam Meram'a ve eşi Koray Abim' e, sevgili yeğenlerim Masal ve Deniz'e varlıkları için teşekkür ederim. Hayatımın her anında olduğu gibi öğrenim hayatım boyunca da maddi ve manevi her konuda yanımda olan canım anneme ve babama şükranlarımı sunarım. Varlığı ve desteği ile her zaman güç aldığım sevgili eşim Baran ŞENEL'e ve gelişiyile hayatı benim için daha da anlamlı kılan sevgili oğlum Can ŞENEL'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

21 / 09 / 2023

Ümran ŞENEL

ÖZGEÇMİŞ

Ümran ŞENEL ilk, orta ve lise öğrenimini Uşak'ta tamamladı. 2005-2009 yılları arasında Adnan Menderes Üniversitesi Ziraat Fakültesinde üniversite eğitimini tamamladı. 2009 yılında Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri ABD'nda başladığı yüksek lisans eğitimini 2012 yılında bitirdi. 2015 yılında Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri ABD'nda Prof Dr. M. Ercan ÖZZAMBAK danışmanlığında başladığı doktora eğitimini 2023 yılında bitirdi.

