



**SORGUM (*Sorghum bicolor* L.) BİTKİSİNDE *IN VİTRO* MUTAJEN
UYGULAMASI VE İPBS RETROTRANSPOZON MARKÖR SİSTEM İLE
MUTANTLARIN DNA PARMAK İZİ İNCELENMESİ**

Adnan KISACIK

**DOKTORA TEZİ
BİTKİ KORUMA ANA BİLİM DALI**

**SİVAS BİLİM VE TEKNOLOJİ ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

TEMMUZ 2025

ETİK BEYAN

Sivas Bilim ve Teknoloji Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

.....
Adnan KISACIK
25/07/2025

SORGUM (*Sorghum bicolor* L.) BİTKİSİNDE *IN VİTRO* MUTAJEN UYGULAMASI
VE iPBS RETROTRANSPOZON MARKÖR SİSTEM İLE MUTANTLARIN DNA
PARMAK İZİ İNCELENMESİ

(Doktora Tezi)

Adnan KISACIK

SİVAS BİLİM ve TEKNOLOJİ ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

Temmuz 2025

ÖZET

Sorghum bicolor L., tarımsal ve endüstriyel kullanımları olan değerli bir C4 bitkisidir. Bu bitki, kurak ve yarı kurak bölgelerde geçerli bir alternatif yem bitkisi olarak bilinmektedir. Bununla birlikte, biyotik ve abiyotik streslere karşı direnci artırılmış genotipler, mevcut iklim değişikliği senaryolarında daha da önem kazanmıştır. Bu araştırma, etil metansülfonat (EMS) ve sodyum azid (NaN_3) kullanarak *in vitro* mutajenez yoluyla *S. bicolor*'da genetik çeşitlilik oluşturmaya amaçlanmıştır. Ayrıca, hidrojen peroksit (H_2O_2) ve trietilentetramin (TETA) de tohum ön uygulama tekniği, *in vitro* kültür koşullarında mutajen olarak kullanılma potansiyelleri nedeniyle kullanılmıştır. Tüm mutajenlerin konsantrasyonu ve maruz kalma süresi, ilk tarama deneylerinden sonra kullanılmıştır. Çimlenme indeksi ile ilgili veriler GerminaR programı kullanılarak elde edilmiştir. Büyüme, biyokimyasal ve antioksidanlar, tek yönlü varyans analizi (ANOVA), faktöriyel regresyon analizi ve Taguchi tasarımı gibi çoklu istatistiksel programlarla hesaplanmıştır. Moleküler çeşitlilik ise Sekans Karakterize Amplifiye Bölge (SCAR) ve Primerler Arası Bağlanma Bölgesi (iPBS) marker sistemleri kullanılarak değerlendirilmiştir. Sonuçlar, tüm kimyasalların çimlenme indeksi, morfolojik, biyokimyasal özellikler ve genetik profillemeye üzerinde önemli farklılıklar göstermiş, maruz kalma süresine kıyasla konsantrasyonun daha büyük bir etkiye sahip olduğunu ortaya koymuştur. Moleküler analiz, uygulanan numunelerde polimorfizmleri tanımlayarak çeşitliliği doğrulamıştır. Sonuçlar, H_2O_2 ve TETA priming ile biyokimyasal bileşenlerin arttığını gösterirken, EMS ve NaN_3 daha büyük moleküler çeşitliliğe yol açmıştır. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar, çoklu performans metrikleri kullanılarak makine öğrenimi (ML) modelleriyle de değerlendirilmiştir. Sonuçlar, modellere ve parametrelere bağlı olarak düşük ve yüksek tahmin yeteneği olduğunu ortaya koymuştur. Çalışma, gelecekteki tarımsal sürdürülebilirlik için bitki ıslah stratejilerine hesaplamalı modellerin entegre edilmesinde yeni bir çağ açmaktadır.

Bilim Kodu : 121301

Anahtar Kelimeler : *In vitro*, iPBS, Mutajen, Makine Öğrenme, Sorgum

Sayfa Adedi : 134

Danışman : Prof.Dr. Muhammad ASIM

IN VITRO MUTAGENESIS APPLICATION IN SORGHUM (*Sorghum bicolor* L.) AND
DNA FINGERPRINTING ANALYSIS OF MUTANTS USING iPBS
RETROTRANSPOSON MARKER SYSTEM

(Ph. D. Thesis)

Adnan KISACIK

SİVAS UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY
INSTITUTE OF GRADUATE STUDIES

July 2025

ABSTRACT

Sorghum bicolor L. is a valuable C4 plant with agricultural and industrial uses. The plant is well-known as a viable alternative forage crop in arid and semi-arid areas. However, genotypes with improved resistance to biotic and abiotic stresses has become more significant in the present climate change scenarios. This research aimed to induce genetic diversity in *S. bicolor* through in vitro mutagenesis using ethyl methanesulphonate (EMS) and sodium azide (NaN₃). Additionally, hydrogen peroxide (H₂O₂) and triethylenetetramine (TETA) were also employed for their potential use as mutagens under in vitro culture conditions by using seed priming technique. The concentration and exposure time of all mutagens were used after initial screening experiments. The data regarding germination index were generated using GerminaR program. The growth, biochemical and antioxidants were computed with multiple statistical programs like oneway analysis of variance (ANOVA), factorial regression analysis, and Taguchi design. Whereas Molecular diversity was assessed using Sequence-Characterized Amplified Region (SCAR) and Inter-Primer Binding Site (iPBS) marker systems. The results illustrated significant variations of all chemicals on germination index, morphological, biochemical properties, and genetic profiling. Results revealed greater impact of concentration compared to the exposure time. Molecular analysis confirmed diversity by identifying polymorphisms in the applied samples. Results illustrated increased biochemical components by While H₂O₂ and TETA priming while EMS and NaN₃ led to greater molecular diversity. Results attained in this study were also evaluated by machine learning (ML) models using multiple performance metrics. Results revealed the low to high prediction ability depending on models and parameters. The study opens new era of integrating computational models for plant breeding strategies for future agricultural sustainability.

Science Code : 121301

Key Words : *In vitro*, iPBS, Mutagenesis, Machine Learning, Sorghum

Page Number : 134

Supervisor : Prof. Dr. Muhammad ASIM

TEŞEKKÜR

Bu doktora tezinin hazırlanmasında emeği geçen herkese en içten teşekkürlerimi sunarım. Öncelikle, tez sürecimin her aşamasında bilgi, deneyim ve sabrıyla bana yol gösteren değerli danışmanım Prof. Dr. Muhammad ASİM'a sonsuz teşekkür ederim. Kendisinin akademik desteği ve yönlendirmeleri bu çalışmanın başarıyla tamamlanmasında büyük rol oynamıştır. Moleküler çalışmalar sırasında değerli katkılarıyla bana destek veren Doç. Dr. Muhammad Azhar NADEEM'e ve bu süreçte hem motivasyonu hem de değerli katkılarıyla Doç. Dr. Zemran MUSTAFA'ya teşekkür ederim. İstatiksel analizler ve makine öğrenmesi konusunda katkılarından dolayı Dr. Öğr. Üyesi Seyid Amjad ALİ'ye minnettarım. Moleküler Laboratuvar uygulamalarında her zaman yardıma hazır olan ve tecrübelerini paylaşmaktan çekinmeyen Amjed ALİ'ye ve ayrıca Doku Kültürü Laboratuvarında da yardımlarıyla büyük katkı sağlayan Ayşegül ŞAHİN AYDIN'a minnettarım. Bitkilerin aktarılması ve gözlenmesi sürecinde her zaman yardımcı olan Arş. Gör. Furkan ULAŞ'a çok teşekkür ederim. Ayrıca Sabeen REHMAN ve Salma Naimatullha SOOMRO'ya da teşekkür ederim. Tabii ki de tez sürecim boyunca maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, varlıklarıyla bana güç veren sevgili eşim ve kızıma en derin şükranlarımı sunuyorum. Onların sabrı, anlayışı ve desteği olmasaydı bu süreci tamamlamak mümkün olmazdı.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xii
RESİMLERİN LİSTESİ	xiii
HARİTALARIN LİSTESİ.....	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	9
2.1. <i>In Vitro</i> Mutajen Çalışmalar.....	9
2.1.1. Fiziksel mutajenler	12
2.1.2. Kimyasal mutajenler	15
2.2. Sorghum Bitkisinde Mutajen Çalışmaları	22
2.3. Mutajen Çalışmalar İçin Moleküler Markörlerin Kullanımı.....	23
2.4. Tarımda ANOVA, RSM ve Taguchi Design Yöntemlerinin Kullanılması	26
2.5. Yapay Zekâ Çalışmaları (Tarımda/Mutajen)	27
3. MATERYAL ve YÖNTEM	31
3.1. Deneme Yeri	31
3.2. Bitki Materyali	31
3.3. Büyüme Ortamları ve Doku Kültürü Koşulları.....	31
3.4. Kimyasal Mutajenik Ajanlar	32

3.5. <i>İn Vitro</i> Kültür ve Sterilizasyon Çalışmaları.....	32
3.6. <i>İn Vitro</i> Kültürü ve Mutajen Uygulamaları.....	33
3.7. Mutajen Uygulaması Sonucu Çimlenme Verilerinin Alınması	34
3.8. İstatiksel Analiz.....	39
3.9. Moleküler Çalışmalar.....	40
3.9.1. DNA izolasyonu.....	41
3.10. Yapay Zekâ Analizleri	46
4. BULGULAR ve TARTIŞMA	49
4.1. Sterilizasyon Optimizasyon Sonuçları	49
4.2. Kimyasal Mutajen Uygulaması ve Çimlenme Sonuçları	50
4.2.1. EMS uygulaması	50
4.2.2. NaN ₃ uygulaması	52
4.3 <i>In vitro</i> Koşullarda EMS'nin Çimlenme İndekslerine Etkileri	54
4.4. Trietilen tetraamin (TETA) ve Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂) Uygulamasının Bitki Büyüme Üzerindeki Etkileri	61
4.4.1. Deney tasarımının (DOE) faktöriyel regresyon analizi (FRA)	63
4.4.2. Makine öğrenmesi analizi	66
4.5. Trietilen tetraamin (TETA) ve Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂) Uygulamasının Biyokimyasal ve Antioksidant Üzerindeki Etkileri.....	71
4.5.1. ANOVA analizi.....	71
4.5.2. Tepki yüzeyi regresyon analizi	72
4.5.3. Pareto diyagramı ve normal grafik analizi	73
4.5.4. Isı haritası ve ağ grafik analizi	75
4.5.5. Makine öğrenme analizi.....	77
4.6. Mutajen Uygulaması ve Moleküler Analizler.....	86

Sayfa

4.6.1. DNA izolasyonu.....	86
4.6.2. SCoT analizleri.....	87
4.6.3 İBPS analizleri	89
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	100
KAYNAKLAR	104



ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 3.1. Murashige ve Skoog (1962) ortamında bulunan maddeler ve konsantrasyonları	31
Çizelge 3.2. Mutajen dozajı ve uygulama süresine yönelik yanıt yüzeyi analizinde kullanılan tepki yüzey metodolojisi (RSM) düzeni	40
Çizelge 3.3. PZR gerçekleştirmek için kullanılan bileşikler ve miktarları	42
Çizelge 3.4. Çalışmada kullanılan iPBS primerlerinin adları, dizileri ve eşleşme (annealing) sıcaklıkları.....	43
Çizelge 3.5. iPBS-PZR için kullanılan termal döngü protokolü (Retro50)	44
Çizelge 3.6. EMS ve NaN ₃ mutajenleriyle farklı konsantrasyon ve sürelerde uygulanan örnek gruplarının dağılımı	45
Çizelge 4.1. Sterilizasyon sonrası her bir çeşide ait çimlenme oranı.....	49
Çizelge 4.2. EMS konsantrasyonu ve uygulama süresine göre çimlenme oranları	51
Çizelge 4.3. NaN ₃ konsantrasyonu ve uygulama süresine göre çimlenme oranları	52
Çizelge 4.4. Yaygın kullanılan çimlenme indeksleri	54
Çizelge 4.5. Sorgumun çimlenme indekslerine ait varyans analizi (ANOVA) sonuçları ...	56
Çizelge 4.6: Sorgumda çimlenme indeksleri için taguchi yöntemine göre sinyal/gürültü S/N oranı sonuçları	58
Çizelge 4.7. H ₂ O ₂ ve TETA'nın sorgumun <i>in vitro</i> çimlenme ve büyüme özellikleri üzerindeki etkisi.....	62
Çizelge 4.8. Sorgum'un <i>in vitro</i> çimlenme ve büyüme özelliklerinin faktöriyel regresyon analizi.....	63
Çizelge 4.9. Sorgum bitkisinin <i>in vitro</i> çimlenme ve büyüme özellikleri için makine öğrenme (ML) modellerine ait performans ölçütleri	68
Çizelge 4.10. TETA ve H ₂ O ₂ ile kimyasal ön işlemeye karşılık olarak <i>Sorghum bicolor</i> 'un fide ve biyokimyasal dinamiklerine ait kodlanmış denklemler	72
Çizelge 4.11. TETA ve H ₂ O ₂ ile kimyasal ön uygulamaya yanıt olarak <i>Sorghum bicolor</i> 'un fide ve biyokimyasal dinamiklerinin Yanıt Yüzeyi Regresyon Analizi	73

Çizelge**Sayfa**

Çizelge 4.12. TETA ve H ₂ O ₂ ile kimyasal ön uygulamaya yanıt olarak Sorghum bicolor'un fide ve biyokimyasal dinamiklerinin makine öğrenmesi analizi	78
---	----



ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 1.1. Sorgum (<i>Sorghum bicolor</i>) bitkisinin vejetatif ve üreme yapılarının gösterimi.....	3
Şekil 4.1. Taguchi tasarımı kullanılarak farklı çimlenme indekslerinin sinyal/gürültü (S/N) oranı analizi	60
Şekil 4.2. H ₂ O ₂ uygulamasının sorgum bitkisinde <i>in vitro</i> çimlenme ve büyüme özelliklerine etkisinin normal dağılım grafiği analizi	64
Şekil 4.3. TETA uygulamasının sorgum bitkisinde <i>in vitro</i> çimlenme ve büyüme özelliklerine etkisinin normal dağılım grafiği analizi	65
Şekil 4.4. Farklı makine öğrenme modellerinin (ML) gerçek ve tahmin edilen değerler ...	67
Şekil 4.5. H ₂ O ₂ ve TETA ile muamele edilmiş bitkilerin biyokimyasal analizi için Pareto grafiği analizleri	74
Şekil 4.6. H ₂ O ₂ ve TETA ile muamele edilmiş bitkilerin biyokimyasal analizi için normal plot analizleri.....	75
Şekil 4.7. H ₂ O ₂ ve TETA ile muamele edilmiş bitkilerin biyokimyasal analizi için ısı haritası	76
Şekil 4.8. H ₂ O ₂ ve TETA ile muamele edilmiş bitkilerin biyokimyasal analizi için network plot analizleri.....	77
Şekil 4.9. H ₂ O ₂ ve TETA ile muamele edilmiş bitkilerin biyokimyasal analizi için makine öğrenmesi analizleri	81

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 3.1. Sterilizasyon sonucu <i>in vitro</i> kültüre alınmış tohumlar	33
Resim 3.2. Mutajen uygulanmış tohumlar	34
Resim 3.3. Doku kültüründe çimlenen tohumların yetiştirme kaplarına alınması	37
Resim 3.4. Gelişen fidelerin daha geniş saksılara alınması	37
Resim 3.5. DNA izolasyon ve PZR çalışmaları.....	42
Resim 3.6. Primer ve DNA analizi çalışmaları.....	44
Resim 4.1. EMS (etil metan sülfonat) ve sodyum azid (NaN_3) ile muamele edilmiş Sorghum bicolor örneklerine ait SCoT 1 analiz sonuçları.....	88
Resim 4.2. EMS (etil metan sülfonat) ve sodyum azid (NaN_3) ile muamele edilmiş Sorghum bicolor örneklerine ait SCoT 4 analiz sonuçları.....	88
Resim 4.3. iPBS2074 primeri ile elde edilen Sorghum bicolor örneklerinin %1,5 agaroz jelde PZR bant profilleri.	90
Resim 4.4. iPBS2245 primeri ile elde edilen Sorghum bicolor örneklerinin %1,5 agaroz jelde PZR bant profilleri.	92
Resim 4.5. iPBS2382 primeri ile elde edilen Sorghum bicolor örneklerinin %1,5 agaroz jelde PZR bant profilleri.	94
Resim 4.6. iPBS2385 primeri ile elde edilen Sorghum bicolor örneklerinin %1,5 agaroz jelde PZR bant profilleri.	97
Resim 4.7. iPBS2389 primeri ile elde edilen Sorghum bicolor örneklerinin %1,5 agaroz jelde PZR bant profilleri.	99

HARİTALARIN LİSTESİ**Harita****Sayfa**

Harita 1.1. Dünyadaki Sorgum üretimi (USDA, 2023)	4
---	---



SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler

Açıklamalar

mg/L	miligram/Litre
mgGAE/g	miligram gallik asit eşdeğeri/g
mM	milimolar
atm	atmosfer basıncı
v/v	hacim/hacim
w/v	ağırlık/hacim
°C	santigrat derece
HgCl₂	cıva(II) klorür
NaN₃	sodyum azid
LD₅₀	Lethal Dose 50
GR₅₀	Growth Reduction 50
g	Yerçekimi ivmesi

Kısaltmalar

Açıklamalar

AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
CTAB	Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide
DOE	Design of Experiments
DArT	Diversity Arrays Technology
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
EMS	Etil Metan Sülfonat
FAO	Food and Agriculture Organization
ISSR	Mikrosatallitler Arası Tekrarlanan Diziler
İBPS	Primer Bağlanma Bölgeleri Arası Polimorfizm
LightGBM	Light Gradient Boosting Machine

ML	Makine Öğrenmesi
MAPE	Ortalama Mutlak Yüzde Hatası
MMS	Metil Metan Sülfonat
MS	Murashige ve Skoog Besi Ortamı
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
R²	Belirlilik Katsayısı
RAPD	Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA
RF	Rastgele Orman (Random Forest) Algoritması
RFLP	Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi
RMSE	Kök Ortalama Kare Hatası
RSM	Tepki Yüzey Metodolojisi
RSRA	Göreceli Standart Regresyon Doğruluğu
SCoT	Başlangıç Kodonu Hedefli Polimorfizm
SNP	Tek Nükleotid Polimorfizmi
SSR	Basit Dizi Tekrarları
SVR	Destek Vektör Regresyonu
TFC	Toplan Flavonoid İçerik
TPC	Toplam Fenolik İçerik
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu
UAEA	Uluslararası Atom Enerjisi Ajansı
USDA	Amerika Birleşik Devletleri Tarım Bakanlığı

1. GİRİŞ

Yem bitkileri olarak bilinen bitki grupları, tarımsal üretim sistemlerinde sürdürülebilirliği sağlamak için olmazsa olmazdır. Sığır yetiştiriciliğinde en temel kaynak olan kaba yem, hayvan sağlığı ve çıktısı için kesinlikle gereklidir. Düşük kaliteli ve yetersiz yem hem et ve süt verimini düşürür hem de hayvanların fizyolojik performansını tehlikeye atar (Açıkgöz ve ark., 2016). Tarihsel süreçte yem bitkileri, çoğunlukla hayvancılık sistemlerinin gelişmesiyle birlikte önem kazanmıştır. Sanayi devrimi sonrası yoğun hayvancılık faaliyetleri, kaliteli ve sürekli yem ihtiyacını doğurmuş; bu durum yem bitkilerinin tarımsal üretim sistemleri içindeki payını artırmıştır. 20. yüzyılın ortalarından itibaren, özellikle mısır ve yonca gibi türlerin silajlık ve kuru ot olarak kullanımı yaygınlaşmış, modern yem üretim teknikleri gelişmiştir (FAO, 2021). Türkiye'deki kaba yem üretimi, Tarım ve Orman Bakanlığı ve TÜİK'in raporlarına göre, hayvancılık sektörünün ihtiyacını karşılayamamaktadır.

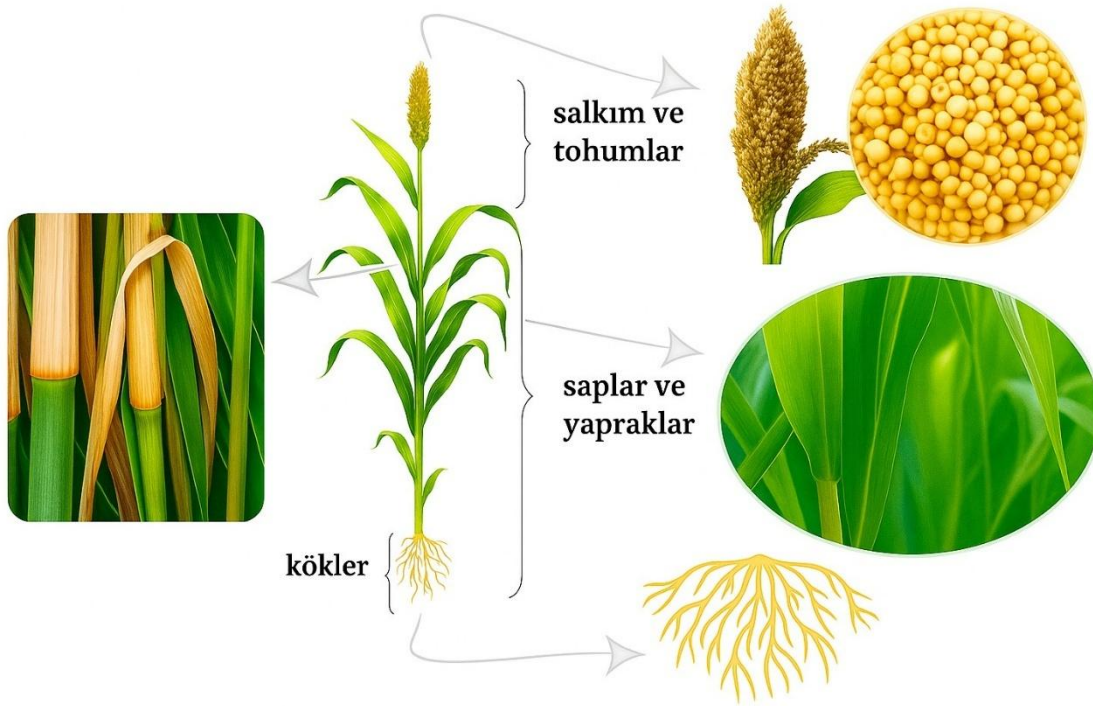
Türkiye'deki yem üretiminin 2024 yılı itibarıyla hayvancılık sektöründe kullanılan yem miktarının yaklaşık %90'ını karşılayabilecek durumdadır (Tarım ve Orman Bakanlığı, 2024). Yem maliyetlerinin artması, bu açık nedeniyle üreticinin karlılığını düşürmekte ve bu da hayvansal ürün fiyatlarının artmasına neden olmaktadır. Günümüzde yem bitkilerine olan talep, yalnızca verim değil, aynı zamanda çevresel sürdürülebilirlik, karbon ayak izi ve kuraklığa dayanıklılık gibi faktörlerle değerlendiriliyor. Türkiye'de yem bitkileri tarımının ilerlemesini engelleyen önemli sorunlardan bir tanesi yeterli bilginin eksikliğidir. Yem bitkileri tarımının ekonomik faydaları hakkında çok sayıda küçük ve orta ölçekli üretici bilgisizdir veya teknik olarak yetersizdir (Somuncuoğlu, 2021). Kuraklık gibi çevresel faktörlerin artması, özellikle sulama imkânı olmayan yerlerde geleneksel yem bitkilerinin yetiştirilmesini zorlaştırmaktadır. Bu nedenle, alternatif yem bitkilerinin önemi artmasının sonucu olarak geleneksel türlerin yerini daha az su tüketen ve zor koşullara dayanıklı türler almıştır. Bu durumda, düşük girdi gereksinimi ve yüksek biyokütle potansiyeli nedeniyle en iyi seçeneklerden biri olduğunu düşünülmektedir (Badigannavar, 2018). İklim değişikliği, artan atmosferik CO₂, artan sıcaklıklar ve değişen yağış düzenleri nedeniyle hayvan yemi miktarını ve kalitesini derinden etkileyeceği düşünülmektedir. Özellikle yonca gibi baklagiller başta olmak üzere C3 bitkileri, daha yüksek CO₂ seviyelerinden faydalanır ve yüksek fotosentez oranları ve biyokütle üretimi gösterirler, ancak sorgum gibi birçok C4

yem türü, normal koşullarda gerçekleştirdikleri fotosentez verimliliği nedeniyle yüksek CO₂ seviyelerine ihmal edilebilir bir tepki gösterebilir (McGranahan ve ark., 2018).

Sahra altı Afrika gibi kuraklığa ve yüksek ısıya duyarlı bölgelerde, yem üretiminin azalması ve hayvancılık faaliyetleri üzerindeki baskıların artması beklenmektedir. Bununla birlikte, sıcak hava dalgaları gibi iklimsel göstergeler, bitki büyüme döngülerini önemli ölçüde kısaltarak yem miktarını ve besin kalitesini azaltabilir. Bu durum gerekli önlemler alınmadığı takdirde hayvan üretkenliğini ve gıda güvenliğini tehlikeye atabilir (Giridhar ve Samireddypalle, 2015). Hayvan yeminin bulunabilirliği ve kalitesinin iklim değişikliğinden önemli ölçüde etkilenmesi bekleniyor. Daha yüksek sıcaklıkların ve yüksek CO₂'in bazı yem türlerindeki karbonhidrat miktarını artırabilmesine rağmen, bitki dokularında lignin birikimini teşvik ederek protein içeriğini ve sindirilebilirliğini azaltacağı tahmin edilmektedir. Besin açısından yeterli yem kaynaklarının sürdürülmesi, daha önce belirtilen değişikliklerin yanı sıra artan su kıtlığı ve özellikle kuraklığa karşı hassas bölgelerde son derece zorlaştırmaktadır (Cheng ve ark., 2022).

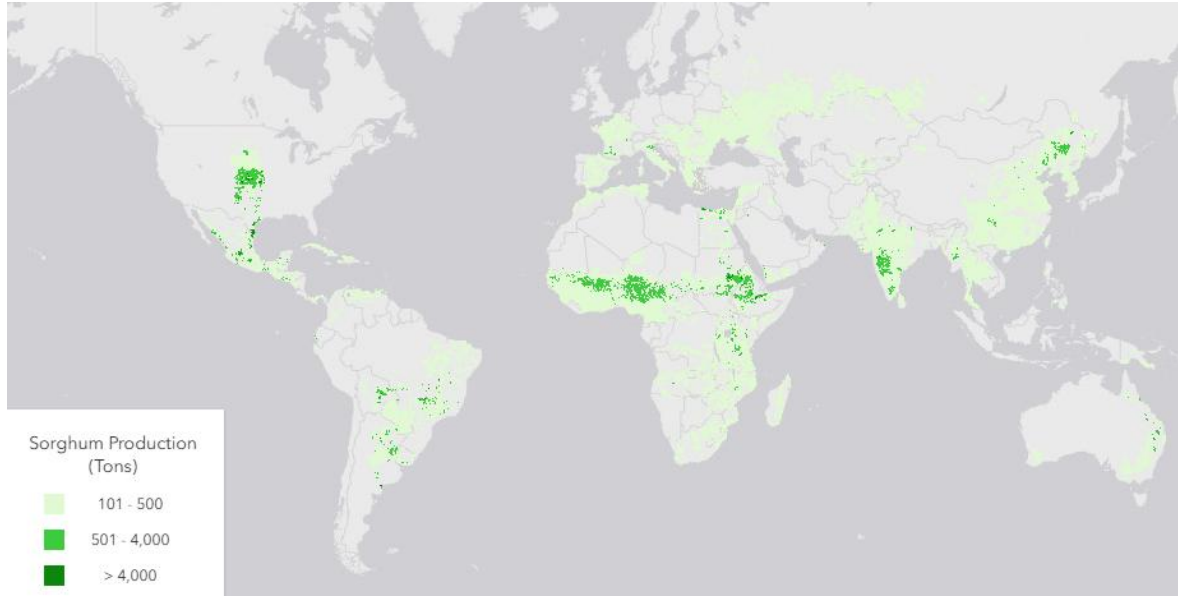
Yüksek sıcaklık koşullarına uyum sağlamış olan sorgum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench], Poaceae familyasından bir C4 bitkisidir. Morfolojik olarak mısır benzer ancak önemli ölçüde daha dayanıklı ve düşük maliyetli bir bitkidir. Bitki 1,5 ila 4 metre arasında bir boya erişebilir; yaprakları uzun, sapı sağlam ve güçlüdür. Salkım şeklinde başaklarda toplanan taneler farklı renk ve boyutlarda bol miktarda bulunur (Şekil 1.1.). Karbonhidrat, protein ve tanen içeriği bakımından zengin olan taneler içerir (Taylor ve ark., 2006). Yüksek derecede genetik ve morfolojik çeşitlilik sorgumu çeşitli tarımsal ekolojik bölgelere ve üretim stratejilerine adapte olmasına yardımcı olur. Bu çeşitlerin her biri tane sorgumu, tatlı sorgum, yem sorgumu ve süpürge darısı farklı amaçlarla da yetiştirilebilmektedir. Biyoetanol üretimi için tatlı sorgum, şeker açısından zengin sapsızları için değerlidir; yem çeşitleri hayvancılıkta yüksek biyokütle verimi için yetiştirilir. Sorgum çeşitleri arasındaki özellikler, değişen iklim koşullarında gıda, yem ve endüstriyel kullanıma uygun, kurak iklime dayanıklı, çok çeşitli bir ürün olarak potansiyelini göstermektedir (Bramel ve ark., 2022). Hem kurak hem de yarı kurak koşullara karşı inanılmaz dayanıklılığı nedeniyle oldukça önemli bir ürün olarak yükselen sorgum ülkemizde "darı" olarak bilinmektedir. Türkiye'de özellikle Orta Anadolu, Güneydoğu Anadolu ve Ege'nin bazı bölgelerinde, düşük su ihtiyacı ve tuzlu koşullara toleransı onu mısır ve diğer geleneksel yem bitkilerinin bir

alternatifi haline getirmektedir. Tahıl ve yem üretiminde dünya çapındaki önemine rağmen Türkiye'de sorgum çiftçiliği hala küçük olsa da hayvancılık için sürdürülebilir yem sağlama konusundaki olası katkısı giderek daha fazla ilgi çekmektedir (Tiryaki, 2005).



Şekil 1.1. Sorgum (*Sorghum bicolor*) bitkisinin vejetatif ve üreme yapılarının gösterimi

Sorgum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench], son derece uyumlu ve dayanıklı bir tahıl ürünü olup, küresel tarım ve gıda güvenliği açısından önemli bir öneme sahiptir. Dünya çapında beşinci en önemli tahıl ürünü olarak kabul edilen sorgum, özellikle kuraklıktan etkilenen alanlarda ve zorlu çevre koşullarında gelişir. Bu nedenle yarı kurak ve kurak bölgeler için temel bir gıda kaynağı haline gelmiştir. Dünya özellikle ABD, Hindistan, Nijerya ve Sudan gibi ülkelerin sorgumu yem bitkisi olarak başarıyla kullandıkları görülmektedir (Harita 1.1.). Bu ülkelerde sorgum çeşitleri yalnızca silaj değil, tane yem, mera bitkisi ve hatta biyoyakıt amacıyla da kullanılmakta, bu da bitkiye olan ilgiyi artırmaktadır.



Harita 1.1. Dünyadaki Sorgum üretimi (USDA, 2023)

Sorgumun fizyolojik özellikleri onu kuru ve yarı kurak koşullarda hayatta kalma ve üretim için özellikle uygun hale getirir. Mısır gibi C3 mahsullerinin aksine, sorgum C4 bitkisi olmanın verdiği avantajla güçlü güneş ışığı ve yüksek sıcaklıklarda büyük fotosentetik verimlilik sağlar. Düşük su stresinde, düşük terleme oranlarıyla daha yüksek su kullanım verimliliği sağlar. Sorgumun bir kilogram kuru madde üretmek için benzer koşullar altında mısırın ihtiyaç duyduğu miktarın neredeyse yarısı kadar suya ihtiyacı vardır (Blum, 2004). Sorgum özellikle tuzlu, asidik ve alkali ortamlar da dahil olmak üzere çeşitli toprak koşullarında büyümeye adapte olmuştur. Adaptasyon derecesi olarak; pH seviyeleri 5,5 ile 8,5 arasında olan topraklarda gelişir. Organik madde açısından zengin, iyi drene edilmiş topraklarda en iyi sonuçları verse de sorgum yine de düşük verimliliğe sahip tarlalarda da iyi sonuçlar verebilir. Bu kadar zorlu koşullarda gelişme yeteneği, onu sürdürülebilir ve iklime dayanıklı tarım ürünleri açısından önemli bir tür haline getirmektedir (Saballos, 2008). Sorgum, güçlü antioksidan özellikler gösteren ve kanser, diyabet ve kardiyovasküler bozukluklar gibi kronik hastalık risklerinin azalması da dahil olmak üzere sağlık yararları ile ilişkilendirilen yüksek konsantrasyonlarda fenolik bileşikler, tanenler ve flavonoidlerle karakterize bir besin profiline sahiptir (Birhanu, 2021; Espitia-Hernández ve ark., 2022). Dayanıklılığı ve marjinal koşullara toleransı nedeniyle, *S. bicolor*, özellikle kaynattıktan sonra, temel amino asit konsantrasyonu ve protein sindirilebilirliğinde sınırlamalar olsa bile, Asya ve Afrika'daki geleneksel diyetlerde önemli hale gelmektedir. Özellikle gıda kıtlığının olduğu bölgelerde, insan tüketimi için sorgumu en üst düzeye çıkarmak için hasat sonrası

işleme tekniklerine ve çekirdek özelliği seçimine olan ihtiyacı vurgulanmaktadır (Anglani, 1998).

S. bicolor, zorlu çevre koşullarında gelişmeye uygun ve önemli tarımsal ve ekonomik avantajlar sağlayan, son derece dayanıklı ve çok yönlü bir tahıl ürünü olarak öne çıkmaktadır. Nişastalı taneler, şeker yüklü saplar, lifli yapraklar ve besin açısından zengin yan ürünlerden oluşan yapısal bileşenler, sürdürülebilir kaynak yönetimi için kapsamlı bir stratejinin oluşturulabilmesine fırsat yaratır. Taneler, önemli besin değeri sağlarken, lignoselülozik ve yapısal olmayan şekerler açısından zengin olan sap, biyoetanol üretimi ve biyomalzeme uygulamaları için çift amaçlı bir biyokütle görevi görmektedir. Bütün bunlara ek olarak, gıda, yem ve endüstriyel kullanım yöntemleriyle sorgum yan ürünlerinin değerlendirilmesi, tarımsal atıkları azaltmak, kırsal ekonomileri desteklemek ve iklimle ilgili kaynak kıtlığını hafifletmek için ayrıcalıklı bir ürün olarak değerlendirmek mümkündür. Dünya çapında odak noktasının gıda güvenliğini enerji özerkliğiyle uyumlu hale getiren tarım sistemlerine doğru kaymasıyla birlikte sorgum, endüstriyel inovasyon ve çevresel sürdürülebilirlik açısından önemli olanaklar sergileyerek, kaynakların verimli kullanıldığı atıklarının minimize edildiği dairesel tarımın başlıca örneklerinden biri olarak karşımıza çıkmaktadır (Bakari ve ark., 2023). *S. bicolor*, polifenol, lif ve kafirin seviyelerinin yükselmesine atfedilebilen glisemik düzenleme, anti-inflamatuar etkiler ve anti-kanserojen aktivite dahil olmak üzere çeşitli biyoaktif özellikler gösteren bir tahıldır. Çölyak hastalığı da dahil olmak üzere belirli diyet gereksinimleri için uygunluğu, tip 2 diyabet, dislipidemi ve bazı kanserlere karşı koruyucu faydalarıyla birlikte, onu işlevsel gıda bileşimlerinde uygulanabilir bir unsur haline getirir (Khalid ve ark., 2022).

Sorgumun üretimi, özellikle yabani otları kontrol etmek için çıkış sonrası herbisit alternatiflerinin kıtlığı nedeniyle sürekli bir kısıtlamayla karşılaşmaktadır. Doğal çeşitlilik ve mutajenez, herbisit direncinin ortaya çıkarmıştır. Teknolojik inovasyon ve ekolojik dengeye yönelik ikili odaklanma, herbisite dirençli sorgum gelişiminin gelecekteki yörüngesini şekillendirmektedir (Pandian ve ark., 2022). Kapsamlı genetik kaynakları ve dikkate değer ekolojik dayanıklılığıyla öne çıkan sorgum, tahıl bitkileri arasında genom evrimini, stres adaptasyonunu ve biyokütle verimliliğini araştırmak için de bir model organizma haline gelmiştir. Orta düzeydeki genom boyutu ve minimal gen çoğaltma seviyeleri, pirinç gibi kompakt genomlar ile mısır ve şeker kamışı gibi karmaşık, poliploid

genomlar arasında karşılaştırmalı bir genomik bağlantı kurar. Bu özellikler, sorgumun gıda güvenliği ve sürdürülebilir biyoenerji çözümleri için temel araştırma ve pratik ürün geliştirmedeki belirgin rolünü vurgulamaktadır (Paterson, 2008).

Sorgumda yapay seleksiyon, melezleme gibi standart ıslah teknikleri kullanılarak kalıtsal özelliğe sahip basit nitelikler etkili bir şekilde iyileştirilmiştir. Ancak kuraklık toleransı veya abiyotik strese direnç gibi birkaç gen tarafından kontrol edilen karmaşık nitelikler söz konusu olduğunda prosedür çok daha zor hale gelir. Bu özelliklerin düşük kalıtım göstermesi ve diğer unsurlarla önemli etkileşimi bazen birkaç farklı yönden değerlendirme gerektirir. Bu nedenle geleneksel yetiştirme, genellikle değişken sonuçlarla yavaş bir ilerleme sağlar. Bu, geleneksel yaklaşımların sınırlarını ve sorgum iyileştirme planlarında çağdaş biyoteknoloji araçlarının kullanılmasına yönelik artan ihtiyacın önemi artmaktadır (Rooney, 2012). Sorgum üretimi sırasında sıklıkla zararlılar, hastalıklar ve kuraklık gibi çok sayıda biyotik ve abiyotik stres faktörüyle karşılaşmaktadır. Bu nedenle sürdürülebilir üretimi korumak için dayanıklı çeşitlerin yaratılmasını gereklidir. Mutajenez, bu zorluklarla başa çıkmak için bitki ıslahı ve genetik araştırmalarında temel bir araç olarak ortaya çıkmıştır.

Kimyasal mutajenez olarak kullanılan Etil metan sülfonat (EMS), birçok mutajenik teknik arasında dikkate değer bir etkinlik göstermiştir. EMS, DNA'daki guanin bazlarını alkillenerek yüksek sıklıkta genetik değişikliğe neden olur ve bu da G: C'den A: T'ye baz geçişlerine yol açar. Bu mutasyonlar birçok fenotipik değişikliğe yol açabilir ve EMS'yi işlevsel genomik ve bitki geliştirme için temel bir araç haline getirir. EMS, çevresel zorluklara karşı artan dirençliliğe, üstün besin profillerine ve yüksek verime sahip sorgum çeşitlerinin yaratılmasını sağlayan geniş bir mutasyon dizisi oluşturmuştur (Jankowicz-Cieslak ve Till, 2016). Mutajenezi hem in vivo hem de in vitro gerçekleştirilebilir ve her biri benzersiz faydalar sağlamaktadır. İn vitro mutajenez, mutasyon indüksiyonunu doku kültürü metodolojileriyle bütünleştirerek genetik varyantların yaratılması ve yayılması için düzenlenmiş bir ortam sunar. Bu teknik, genetik çeşitliliği iyileştirme ve avantajlı özelliklerin seçimini ve yayılmasını hızlandırma yeteneğini göstermiştir. Araştırmalar, biyotik ve abiyotik zorluklara karşı geliştirilmiş dayanıklılığa sahip ürünler yaratmada in vitro mutajenezi etkinliğini çok defa göstermiştir (Predieri ve Di Virgilio, 2007; Xu ve ark., 2012).

Tepki Yüzey Metodolojisi (RSM), Taguchi Yöntemi ve Varyans Analizi (ANOVA), deneyleri tasarlamak ve verileri analiz etmek için popüler yollardır. RSM, birçok girdi değişkeni ve çıktı arasındaki karmaşık bağlantıları tanımlayabilir ve bu da onu optimizasyon sorunları için kullanışlı hale getirir (Myers ve ark., 2016). Öte yandan Taguchi Yöntemi, kontrol edilemeyen faktörleri idare edebilecek kadar güçlü tasarımlar yapmaya odaklanır. Özellikle üretim süreçlerindeki parametreleri optimize etmek için kullanışlıdır (Taguchi, 1986). ANOVA, deney grupları arasındaki ortalama farkların istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığını kontrol eder, ancak RSM ve Taguchi kadar çok optimizasyon seçeneğine sahip değildir (Montgomery, 2017). RSM ve Taguchi süreçleri doğrudan iyileştirebilir, ancak ANOVA çoğunlukla hipotezleri iyileştirmekten çok onları değerlendirmek için bir teknik olarak kullanılır. Kullanacağınız yaklaşım, araştırma hedeflerinize, verilerinizin doğasına ve elinizdeki kaynaklara bağlı olacaktır.

Yapay Sinir ağları (YZ) gibi makine öğrenme algoritmaları, doğrusal varsayımlar ve önceden tanımlanmış etkileşimlerle sınırlı olan RSM, Taguchi yöntemleri veya ANOVA gibi geleneksel istatistiksel yöntemlerden karmaşık üretim ortamlarında sonuçları tahmin etmede daha esnek ve güçlüdür (Fahle ve ark., 2020). Öte yandan ANOVA'nın YZ entegrasyonu, RSM ve Taguchi'nin aksine çoğunlukla tanımlayıcı analizlerle sınırlıdır. YZ ile geliştirilmiş RSM, bazı çevresel uygulamalarda parametreleri optimize etmek için oldukça yararlı olabilir gibi görünmektedir (Bas ve ark., 2025). Taguchi Yöntemi, dıştan gelen beklenmedik değişimlere dayanıklı deneyler tasarlamak için harikadır, ancak ANOVA hala deney gruplarını birbirinden farklı kılan şeyleri bulmanın en iyi yolu olarak görülmektedir. Yöntem seçimi çalışma hedeflerine bağlıdır. Yapay zekâ entegrasyonunun, büyük veri kümeleriyle ve karmaşık bilgi işlem ihtiyaçlarıyla çalışmak için benzersiz avantajları vardır.

İstatistiksel ve yapay zekâ araçları, RSM, Taguchi tasarımı ve ANOVA gibi araçlar, karmaşık biyolojik reaksiyonları modellemek, analiz etmek ve iyileştirmek için çağdaş biyoteknoloji araştırmalarında çokça kullanılmıştır. Örneğin, RSM, kitosan nanopartikülleri kullanılarak *Bacopa monnieri* özütlerinin antioksidan ve antikanser aktiviteleri için tahmin modelleri oluşturulmasına yardımcı olmuştur. Bu modeller, birçok faktör arasındaki doğrusal olmayan etkileşimleri yakalayabilmiş ve en iyi deneysel ayarları bulabilmiştir (Bulut ve ark., 2025).

Bu çalışmada, *Sorghum bicolor*'da genomik ve fenotipik çeşitliliği artırma kapasitesini incelemek için EMS ve NaN₃ kaynaklı mutajenez kullanılmıştır. Amaç, kuraklık direnci, hastalık toleransı ve verim istikrarı gibi özellik iyileştirmelerini artırmak için *in vitro* mutajenez prosedürlerinin kullanılması üzerine olmuştur. Bu çalışma, gelecekteki tarımsal ve çevresel zorlukları ele alabilecek dayanıklı ve yüksek performanslı sorgum hatları üretmek için çağdaş genomik teknolojilerle mutajenezi kullanmayı amaçlamaktadır.



2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. *In Vitro* Mutajen Çalışmalar

İnsanoğlu dünyadaki varlığından itibaren besin kaynağı olarak öncelikle bitkileri kullanmıştır. Yerleşik tarımın ortaya çıkması ile yabani bitki türlerinde var olan istenen özellikteki bireylerin seçilmesi, kalıtsal varyasyonlar ve yapay seçim yoluyla geleneksel ıslah çalışmalarının temelini oluşturmaktadır. Son yüzyılda ise dünya nüfusunun hızlı artışı buna karşılık kaynakların yetersizliği özellikle gelişmemiş ülkelerde gıdaya ulaşmada zorlukların yaşandığı bilinmektedir. Biyoteknolojinin son yıllarda gelişmesi sonucu bitkilerde doku kültürü yöntemleri, bitki üretimi ve ıslah çalışmalarında önemli bir rol oynamıştır. Bu yöntemler sayesinde bitkilerin çoğaltılması, genetik modifikasyonu ve hastalıklara karşı dirençlerinin artırılması gibi birçok alanda başarılar elde edilmektedir. Mutasyon, canlı organizmaların genetik materyalinde meydana gelen kalıtsal bir değişiktir ve kalıtsal varyasyonlar ile evrimin temel taşlarından biridir. Bu değişiklikler doğal veya yapay olabilir ve çevreye daha iyi uyum sağlayan mutantlar seçilime uğrarlar. Ayrıca mutasyon, yabani türlerin evcilleştirilmesi ile tarım alanında önemli bir rol oynamıştır. Son yıllarda 210 bitki türünde 3.220'den fazla resmi olarak yayımlanmış mutant çeşidi olduğu bilinmektedir. Mutant bitkiler, verim, hastalık ve zararlı organizma, abiyotik streslere karşı direnç hedefleri için üretilebilir. Fiziksel, kimyasal ve biyolojik mutajenler gibi çeşitli mutajenler tanımlanır (Bado ve ark., 2015). Bitkilerde gerçekleştirilen mutasyon ıslahının temelinde bitkilerdeki genetik materyalin değiştirilmesi vardır ve bitki fenotipinde istenen sonuçların aranmasını amaç edinir. Ancak son yıllarda DNA izolasyonu ve PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) teknolojileri ile bitkilerde mutasyonun moleküler işaretleyiciler ile daha kısa sürede doğruluk oranı yüksek sonuçlar da elde edilebilmektedir.

In vitro mutajenez, tarımsal üretimde genetik çeşitliliği ve kaliteyi artırmak için özgün bir yöntemdir. *In vitro* mutajenez prosedürlerinin odunsu bitkilerde genetik çeşitliliği artırmak ve ticari açıdan önemli özellikler yetiştirmek için mükemmel bir araç olarak hizmet ettiği vurgulanmıştır. Çalışma, gama ışınları gibi fiziksel mutajenlerin uygun konsantrasyonlarda kullanımı ve seçilen mutantların hızlandırılmış yayılımı yoluyla genetik çeşitlilik oluşturma prosedürlerini ayrıntılı olarak açıklamıştır (Predieri ve Virgilio, 2007).

Bu yöntemin hem biyotik hem de abiyotik stres faktörlerine karşı dayanıklılığı artırmada ve çıktıyı iyileştiren yeni varyasyonlar üretmede dönüştürücü etkisi gösterilmiştir. Doku kültürüyle birleştirilen mutasyon indüksiyonu, seçilen mutantların hızlı bir şekilde çoğaltılması ve istenen özelliklerin artırılması için etkili ve sürdürülebilir bir yöntem olması sağlanmıştır (Xu ve ark., 2012).

In vivo ve *in vitro* mutajenez prosedürleri, bitki genetiğinde temel araçlar olarak hizmet ederek genetik çeşitliliği artırır ve tarımsal iyileştirme hedeflerini kolaylaştırır. Bu iki prosedür tarafından oluşturulan moleküler mekanizmaların ve mutasyon tiplerinin benzer olduğunu ortaya koyar ve bu da her iki tekniğe yönelik birleşik bir yaklaşımın bilimsel olarak daha tutarlı olduğunu göstermiştir (Mullins ve ark., 2021).

Kimyasal ve fiziksel mutajenez teknikleri, bitki genetik çeşitliliğini artırmak ve dolayısıyla yeni türlerin geliştirilmesini kolaylaştırmak için gereklidir. Mutajenlerin dikkatli bir şekilde seçilmesinin, uygulama yöntemlerinin optimizasyonunun ve çevre koşullarının titizlikle düzenlenmesinin mutasyon verimliliğini artırabileceğini ve dolayısıyla bitki ıslahı ve genetik araştırma için etkili metodolojiler sağlayabileceğini ileri sürmektedir (Kodym ve Afza, 2003).

Sürgün uçları, kallus, meristemler ve protoplastlar gibi farklı eksplantlar kullanılarak, birçok bitki materyali mutajenlerle hızlı bir şekilde işlenebilir ve taranabilir. Genellikle çok hücreli yapılardan gelen kimerik bitkilerin (hücresel düzeyde farklı genotipler taşıyan bitkiler) ardışık alt kültürler aracılığıyla ayrılabilmesini belirtmektedir. Öte yandan, tek hücrelerden gelen somatik embriyogenez, genetik olarak tek tip mutantlar elde etmeyi mümkün kılmıştır. Etil metan sülfonat (EMS) gibi kimyasal mutajenler, hücre süspansiyonları ve protoplastlar üzerinde iyi çalışıldığı görülmüştür. Öte yandan fiziksel mutajenler genellikle sürgün uçlarında ve diğer ilgili organlarda kullanılmaktadır. Ayrıca hastalığa dirençli mutantları erken dönemde bulmaya yardımcı olmak için kültür ortamına mantar toksinleri eklemek gibi seçim baskısı kullanmaktan da bahsedilmektedir. Bundan sonra, bu seçilen hatlar seraya alıştırılabilir ve özellikle abiyotik stres faktörlerinin yoğun olduğu saha denemelerinde tekrar test edilebilir. Genel olarak, *in vitro* bazlı mutajenez, özellikle tohumlardan yetiştirilen ürünler ve biyotik ve abiyotik etkenlerden kaynaklanan stres toleransı ile ilgili özellikler için geleneksel yaklaşımlardan çok daha iyi bir sonuç alınmaktadır (Jain ve ark, 2008).

Tetiklenen mutajenez, genetik çeşitlilik yaratarak ve geliştirilmiş ürün çeşitlerinin hızla ilerlemesini kolaylaştırarak bitki ıslahını olumlu yönde dönüştürmüştür. Bu teknolojinin, stres toleransını iyileştirme, hastalık direnci ve artan üretim potansiyelini geliştirme dahil olmak üzere tarımsal zorluklara sürdürülebilir yanıtlar sunduğu vurgulanmıştır. CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats – bakterilerdeki doğal savunma mekanizmasından geliştirilen ve DNA üzerinde hedefli düzenleme yapılmasını sağlayan bir gen düzenleme yöntemi) ve TILLING (Targeting Induced Local Lesions IN Genomes – kimyasal mutajenlerle oluşturulan rastgele mutasyonları tarayarak belirli genlerde nokta mutasyonlarını tespit etmeye yarayan bir yöntem) gibi çağdaş genomik tekniklerin mutant ıslahına dahil edilmesi, küresel gıda güvenliği ve iklim adaptasyonu zorluklarını ele almak için olağanüstü olasılıklar sunmaktadır (Pathirana, 2021).

TILLING gibi sofistike moleküler yaklaşımların ortaya çıkması, mutasyon tanımlamasını ve bitki ıslahında kullanımını önemli ölçüde dönüştürmüştür. TILLING, hedef genlerdeki belirli mutasyonların tespitini kolaylaştırmak için kimyasal mutajenezi yüksek verimli tarama ile birleştirir. Bu yöntem, gelişmiş stres toleransı, hastalık direnci ve verim potansiyeli dahil olmak üzere olumlu özellikler gösteren sorgum genotiplerinin geliştirilmesini önemli ölçüde hızlandırmıştır (Jankowicz-Cieslak ve Till, 2016; Pathirana, 2021).

Son yıllarda biyoteknolojinin gelişmesi ile birlikte bitki ıslahında doku kültürü yöntemlerinin, bitki üretimi ve genetik modifikasyonunun önemli araçlar haline gelmesine olanak tanımıştır. Bu yöntemler sayesinde bitkilerin çoğaltılması, genetik modifikasyonu ve hastalıklara karşı dirençlerinin artırılması gibi birçok alanda başarılar elde edilmiştir.

Özellikle, kimyasal mutajenlerin kullanımı, bitki fenotipinde istenen sonuçların aranmasını amaç edinir. Çalışmalarda, sodyum azid (NaN_3), etil metan sülfonat (EMS) ve kolşisin gibi kimyasal mutajenlerin etkileri incelenmiştir. Bu mutajenlerin farklı konsantrasyonları ve işlem süreleriyle bitki morfolojisinde belirgin değişiklikler gözlemlenmiştir.

Özellikle, NaN_3 ve EMS'nin bitkilerin stres toleransını artırmak için etkili bir mutajen olduğu tespit edilmiştir. Kolşisinin ise bitki poliploidizmini artırmak için etkili bir mutajen olduğu görülmüştür.

2.1.1. Fiziksel mutajenler

Fiziksel mutasyon ıslahı; radyasyon, X ışınları ve gama ışınları gibi enerji yüklü parçacıkların bitkilerin tohum, embriyo, sürgün, kök ve yapraklarına uygulanması suretiyle bitki doku hücrelerindeki genetik bilginin değiştirilmesidir. Kimyasal mutasyon ıslahı ise bitki dokularına kimyasal maddelerin uygulanması sonucu genetik bilginin değiştirilmesi çalışmalarıdır. Bu yöntemlerle elde edilen mutant bitkilerden istenen özelliğe sahip olanlar seçilerek üretim süreci devam ettirilir. Bu süreç istenen özellikteki bitkilerin seçilip vejetatif doku kültürü yöntemi ile çoğaltılarak bitkinin genetik olarak aynı özelliklere sahip klonları elde edilmesiyle devam eder.

Fiziksel mutajenlerin, özellikle gama ışınları ve X ışınlarının, bitki genomlarında gelecek nesillere aktarılacak mutasyonlara neden olabilecek kadar güçlü olduğu uzun zamandır bilinmektedir. Bu iyonlaştırıcı radyasyonlar biyolojik parçaları iki şekilde etkiler: doğrudan, DNA'daki kovalent bağları kırarak veya dolaylı yoldan, proteinlere ve nükleik asitlere çok daha fazla zarar veren reaktif oksijen türleri oluşturarak. Bunların birçoğu daha yüksek verim, abiyotik strese karşı daha iyi tolerans ve zararlılara ve hastalıklara karşı direnç gibi daha iyi agronomik özelliklere sahiptir. Tetiklenen mutasyonlar rastgeledir, ancak fiziksel mutajenler mutasyonlara neden olmada oldukça başarılı oldukları, ucuz oldukları ve *in vitro* kültür ve moleküler işaretleyici teknikleriyle kullanılabildikleri için yine de çok faydalıdır (Yali ve Mituku, 2022).

Proton ışınları düşük doğrusal enerji transferi (LET) radyasyonudur, ancak mutajenik etkileri gama ışınlarınınkinden farklıdır. Arabidopsis'te proton ışınlanması daha geniş bir fenotipik mutasyon yelpazesine ve çok daha fazla yapısal varyasyona (SV), özellikle de genellikle bağlantı noktalarında mikro homolog dizileri içeren inversiyonlara neden olmuştur. Bu, homolog olmayan uç birleşmesinin (NHEJ) DNA onarımında büyük bir rol oynadığını göstermektedir. İlginç bir şekilde, tek baz değişimleri (SBS'ler) ve küçük eklemeler/silmeler (İnversiyon/Delesyon) gibi nokta mutasyonlarının sayısı, aynı biyolojik etkiye sahip seviyelerde proton ve gama ışını tedavilerinde hemen hemen aynı kalmıştır. Bu sonuçlar, uzun zamandır LET'te gama ışınlarına benzediği düşünülen proton ışınlarının, ağır iyon ışınlanmasının yaptığına daha çok benzeyen karmaşık DNA hasarına neden olabileceği

fikrini güçlendirmektedir. Bu, onları bitki mutanti yetiştirme için benzersiz ve kullanışlı bir araç haline getirmektedir (Lee ve ark., 2021).

Gen düzenleme ve diğer gelişmiş teknolojiler farklı bitki türlerinin yetiştirilmesini kolaylaştırır, ancak mutasyon ıslahı hala hem modern hem de klasik yetiştiriciliğinin önemli bir parçasıdır çünkü tüm genom boyunca rastgele değişiklikler yaratma olasılığı daha yüksektir. Çoğunlukla X ışınları ve gama ışınları kullanan klasik radyasyon mutasyon ıslahı yöntemleri, geniş bir mutasyon yelpazesine ve yüksek bir mutasyon oranına sahiptir ve bu da onları çok kullanışlı hale getirir. IAEA Mutant Çeşit Veri tabanına 3.000'den fazla mutant çeşidi eklendi ve bunların 1.000'den fazlası dünya çapında bilinmektedir (Ma ve ark., 2021).

Yüksek enerjili elektromanyetik radyasyonun bir türü olan gama ışınları, dokulardan geçebildikleri ve çok çeşitli genetik değişikliklere neden olabildikleri için bitki ıslahında uzun zamandır kullanılmaktadır. Gama ışınları, dikkatli bir şekilde yönetildiklerinde herhangi bir yeni genetik materyal eklemekten DNA'da kararlı, kalıtsal mutasyonlara neden olabilir. Bu, onları mutasyon ıslahı için güvenli ve kullanışlı bir araç haline getirmektedir. Bunların kullanılması, daha fazla ürün veren, daha hızlı olgunlaşan, biyotik ve abiyotik streslere daha dirençli olan ve üstün besin profillerine sahip yeni ürün türlerinin oluşturulmasını sağlayabilmiştir. Gama ışınlarının kullanımı dünya çapında giderek daha popüler hale geliyor ve sürdürülebilir tarım ve gıda güvenliği için önemli bir yardımcıdır (Bharath ve ark., 2024).

Pirinçlerle yapılan çalışmalarda gama ışınları, incelenen en yaygın fiziksel mutajen türüdür ve araştırmaların %80'inden fazlasını oluşturmaktadır. Pirinç tohumları, kullanılan en yaygın eksplant materyalidir. Araştırmaların çoğu, pirincin ekonomi için çok önemli olduğu Asya'da, özellikle Hindistan, Japonya ve Çin'de yapılmıştır. Araştırmacılar çoğunlukla daha yüksek verim, daha iyi kuraklık ve tuzluluk toleransı ve bitki boyu ve çiçeklenme zamanı gibi daha iyi morfolojik özellikler gibi agronomik iyileştirmeler yapmaya odaklandı. Çalışmalarda ayrıca, giderek daha fazla insanın, standart radyasyon prosedürlerinden daha hassas mutasyonlar yapabilen iyon ışınları gibi yeni teknolojilere ilgi duyulmakta olduğu görülmüştür (Zin ve ark., 2023).

Fiziksel mutasyonlar, özellikle gama radyasyonunun neden olduğu mutasyonlar, iyi adapte olmuş çeşitlerin hassas değişikliklere izin vererek bitki ıslahını büyük ölçüde iyileştirmiştir. 20. yüzyılın başından bu yana, 175 farklı bitki türünde 2.250'den fazla yasal olarak piyasaya sürülen mutant çeşit yaratılmıştır. Bunlara pirinç, buğday ve arpa gibi temel gıda ürünlerinin yanı sıra yüksek değerli endüstriyel ve bahçe bitkileri de dahildir. Bu mutasyonlar, ürünleri daha üretken, biyotik ve abiyotik streslere karşı daha dirençli, daha kaliteli tahıllar ve yağlar haline getirmiş ve çok çeşitli tarımsal iklim koşullarına daha iyi yanıt verebilmelerini sağlamıştır. Bu nedenle, mutajenez yoluyla ıslah, sürdürülebilir tarım için kullanışlı bir yöntemdir (Ahloowalia, Maluszynski ve Nichterlein, 2004).

Termal nötron ışınlaması, yüksek doğrusal enerji transferi (LET) ve gama ve hızlı nötronlardan çok az kirlenmeye sahip olduğundan bitkileri mutasyona uğratmanın yeni bir yolu haline gelmektedir. Çalışmada termal nötronların GR50 ve LD50 değerleriyle gösterildiği gibi buğdayda ve pirinçte önemli mutasyonlara neden olabileceği gösterilmiştir. Termal nötronların gama ışınlarından daha az arka plan mutasyonuna neden olması ve daha yüksek bir mutajenik etkinliğe sahip olması, hedefli ve etkili indüklenmiş mutasyon ıslahı için iyi bir araç olabileceği ortaya koyulmuştur (Kadam ve ark., 2022).

İyonlaştırıcı radyasyon, özellikle gama ışınları, küçük nokta mutasyonlarından büyük kromozomal değişikliklere kadar çok çeşitli genetik değişikliklere neden olabileceği için bitki mutasyon ıslahında çokça kullanılmıştır. Kimyasal bağları bozarak doğrudan ve su radyoliziyle hidroksil radikalleri gibi serbest radikaller oluşturarak dolaylı olarak DNA'yı değiştirebilir. Bu radikaller DNA'daki bazıları değiştirebilir, iplikleri bozabilir ve kromozomları yeniden düzenleyebilir. Gama ışınları, kontrollü ortamlarda mutasyonları bulmayı ve seçmeyi kolaylaştıran *in vitro* doku kültürü prosedürleriyle kullanıldığında son derece yararlıdır. Bu entegrasyon, verim, stres toleransı ve kalite dahil olmak üzere daha iyi agronomik özelliklere sahip yeni çeşitlerin yaratılmasını büyük ölçüde hızlandırmıştır (Çelik ve Atak, 2017).

Hem kısa hem de uzun vadeli gama ışınlarına ve karbon iyonlarına maruz kalan *Arabidopsis thaliana* hatlarının derinlemesine karşılaştırması, meydana gelen mutasyon türlerinin radyasyon türüne ve dozaj oranına bağlı olduğunu göstermiştir. Gama ışınlarına kronik maruz kalma, birim dozaj başına daha fazla mutasyona neden olmuş ve genomda daha geniş

bir değişiklik yelpazesi göstermiştir. Ayrıca, geçiş/transversiyon (Ti/Tv) oranlarının daha büyük gama dozlarıyla düşmesi, mutasyonların gerçekteşme şeklinin daha yüksek dozlarla değiştiğini düşündürmektedir. Bu sonuçlar, hedefin genetik çeşitliliği artırmak mı yoksa genomda belirli değişiklikler yapmak mı olduğuna bağlı olarak, bitki ıslahında mutajenez yöntemlerini iyileştirmek için önemli bilgiler sağlamaktadır (Hase ve ark., 2020).

2.1.2. Kimyasal mutajenler

Kimyasal mutajenler gama ışınları veya X ışınları gibi fiziksel mutajenlere göre istenmeyen veya zararlı olmayan mutasyonlara neden olma olasılığı daha yüksektir. Ancak doğru miktarlarda ve doğru koşullar altında kullanıldığında, kötü özellikleri azaltırken iyi özellikleri artırmada büyük bir avantaja sahiptirler. Birçok kimyasal bileşik vardır, ancak bitki deneysel mutajenez ve mutant yetiştirmede yalnızca birkaç alkile edici ajan yaygın olarak kullanılmıştır. Etil metan sülfonat (EMS), metil metan sülfonat (MMS) ve N-metil-N-nitrozoüre (MNU) gibi alkile edici bileşikler bitkilerde kullanılan en popüler kimyasal mutajenlerden bazılarıdır. Ayrıca kullanılan diğer kimyasallar arasında sodyum azit (SA), kolşisin ve hidroksilamin (H_3NO) bulunur. Bu ajanların bazıları değiştirerek veya DNA'nın küçük kısımlarını silerek nokta mutasyonlarına neden olduğu bilinmektedir. Kimyasal mutajenler sadece tohumlarda değil, birçok farklı bitki parçasında kullanılabilir. Bunlar tam bitkilerde, çeliklerde, polen tanelerinde, soğanlarda ve hatta laboratuvarında yetiştirilen dokularda kullanılabilir. Araştırmacılar, bu esneklik sayesinde etkilemek istedikleri bitki parçasına ve değiştirmek istedikleri özelliğe göre mutajenik tedavileri özelleştirebilir. Kimyasal mutajenezin başlıca faydası, nispeten düşük mutasyon oranlarıyla yararlı genetik çeşitlilik yaratabilmesidir. Bu, fiziksel mutajenlerde yaygın olan büyük ölçekli kromozomal sorunların riskini düşürür. Uluslararası Atom Enerjisi Ajansı (IAEA), kimyasal mutajenez kullanılarak çok sayıda yeni mutant bitki türünün oluşturulduğunu gösteren bir veri tabanı tutmaktadır. Bu türlerin %80'inden fazlası EMS ile yapılan uygulamalar sayesinde ortaya çıkmıştır (Oladosu ve ark., 2016; Viana ve ark, 2019).

Kimyasal mutajenez, yüksek verimli ve strese dayanıklı tarımsal çeşitlerin yaratılmasını kolaylaştırarak genetik çeşitliliğin oluşturulmasında etkili olmuştur. EMS ve MMS gibi alkilleyici kimyasalların tanımlanmasının bitki ıslahını dönüştürdüğünü ve insan genetiği ve çevre sağlığı için daha geniş önemlerini aydınlattığını vurgulamaktadır. Bu gelişmeler,

kimyasal mutajenlerin ikili potansiyelini vurgulamaktadır: genetik geliştirme araçları ve genotoksik tehlikeleri kavramak için göstergeler olarak (Natarajan, 2005).

Etil metan sülfonat (EMS)

Etil metan sülfonat (EMS), bitki araştırmalarında kullanılan en sık kimyasal mutajendir. EMS, DNA bazlarına etil grupları ekleyerek nükleotidlerin yapısını değiştiren güçlü bir alkile edici ajandır. Bu alkil grupları özellikle G/C'den A/T'ye geçişler olmak üzere nokta mutasyonlarına neden olur ve bu da genlerin çalışma şeklini değiştirebilir veya yeni genetik varyasyonlar oluşturabilir. EMS, bitkilerde gen işlevini incelemek ve farklı fizyolojik ve gelişimsel süreçlerin moleküler temellerini anlamak için yaygın olarak kullanılmasının nedeni hem kolay hem de kararlı kalıtsal değişikliklere neden olabilmesidir. EMS mutajenezi, abiyotik strese nasıl dayanılacağına dair araştırmalarda kullanımı nedeniyle son zamanlarda çok ilgi görmektedir. Mutant popülasyonlar oluşturarak ve kuraklığa, tuzluluğa, ısıya veya diğer çevresel stres faktörlerine karşı gelişmiş direnç gösteren bireyleri tarayarak, EMS stres adaptasyonunun altında yatan genetik faktörleri ortaya çıkarmak için güçlü bir araç olabilmektedir. EMS kaynaklı mutajenezin stres toleransını nasıl iyileştirebileceğini tam olarak anlamak için yüksek verimli tarama, moleküler belirteç destekli seçim ve transkriptom veya proteomik analiz gibi çeşitli deneysel yöntemler kullanmamız gerekir. Bu nedenle, EMS tabanlı mutajeneze yönelik daha fazla çalışma yalnızca temel bitki biyolojisi için değil, aynı zamanda iklim değişikliğine dayanabilen tarımsal çeşitler yaratmak için de önemlidir (Chen ve ark., 2023).

Kimyasal mutajenez, bitki ve hayvan genomlarında önemli yoğunlukta yeni nükleotid çeşitliliği üretmek için uygun maliyetli ve doğrudan bir yöntem sunar. Bu nedenle mutajenez işlevsel genomik araştırma ve bitki ıslahı için kullanılabilir. Etil metan sülfonat (EMS), bitkilerde en sık kullanılan kimyasal mutajendir. EMS'nin büyük ölçüde tek baz çifti değişiklikleri ürettiği bilinmektedir. Tek bir bitki soyunda yüzlerce ila binlerce kalıtsal mutasyon üretilebilir (Jankowicz-Cieslak ve Till, 2016).

Emilim dozu fikri, bitkilerdeki kimyasal mutajenlerin biyolojik etkilerine ilişkin, maruz kalma dozuna kıyasla daha kesin bir anlayış sağlar. Karnabahar tohumlarında farklı dozlar, süreler ve ön ıslatma koşullarıyla EMS işlemlerinin kullanılması, ön ıslatmanın EMS

emilimini ertelediğini ve böylece anında hasarı azalttığını göstermektedir. Bununla birlikte, emilimden sonra mutajenin genel etkisi değişmeden kalır. Matematiksel bir model, sağkalım oranları ile tedavi faktörleri arasındaki ilişkiyi çizerek, mutajenez süreçlerini geliştirmede emilim dozunun kritik önemini vurgular. Bu paradigma, mutajenez etkilerinin doğru bir şekilde araştırılmasını ve karşılaştırılmasını kolaylaştırır ve çeşitli bitki sistemleri ve kimyasal ajanlar arasında daha geniş uygulanabilirlik sağlar (Ke ve ark., 2019).

EMS mutajenezi, transgenik yöntemler kullanmadan pirinç yetiştirme uygulamalarını daha çeşitli hale getirmenin bir yoludur. Bu çalışmada ise, tohum ön işleminin mutajenezin ne kadar iyi çalıştığı üzerinde büyük bir etkiye sahip olduğunu bulunmuştur. Deneysel sonuçlar, 12 saatlik bir ön ıslatma süresinin en iyi su emilimini (yaklaşık %25 emilim oranı) sağladığını göstermiştir. Ancak, daha yüksek EMS konsantrasyonları (%1'den fazla) veya daha uzun süreli maruz kalma (24 saatten fazla), çimlenmeyi ve fidelerin hayatta kalmasını üzerinde olumsuz etkiye sahip olduğu gözlenmiştir. LD50'nin %0,5 EMS olduğu bulunmuştur; bu, altı saatlik maruz kalma ile birlikte, bitkileri canlı tutarken yeterli mutasyon yoğunluğu elde etmek için bu dozu doğru doz haline getirmiştir. Bu sonuçlar, transgenik yöntemler kullanmadan tarım için yararlı olan mutasyonlara sürekli olarak neden olmanın bir yolunu göstermiştir (Ünan ve ark., 2022).

Artemisia vulgaris'i tuza karşı daha dayanıklı hale getirmek için kimyasal mutajen olarak EMS kullanılmıştır. *A. vulgaris*'ten elde edilen kallus kültürlerini %0,5 EMS ile muamele edilmiş ve daha sonra tuzlu koşullarda ne kadar iyi gelişebileceklerini görmek için bunları farklı miktarlarda sodyum klorür (NaCl) uygulaması yapılmıştır. Sonuçlar, EMS uygulanan kallusun, NaCl seviyeleri daha yüksek olduğunda bile daha hızlı büyümesiyle görüldüğü gibi, tuz stresiyle daha iyi başa çıkabildiğini göstermiştir. Ayrıca, EMS ile oluşturulan kallus, kontrol grubundan çok daha yüksek seviyelerde biyokimyasal ve antioksidan aktivite gösterdiği gözlenmiştir. Mutant hatlar, daha yüksek metabolik reaksiyonları nedeniyle muhtemelen daha iyi tuz toleransına sahiptir. Sonuç olarak, EMS ile tedavi edilen kallustan yetiştirilen bitkilerin, vahşi tipteki benzerlerine göre tuzlu strese karşı daha dirençli olduğu bulundu. Bu, kimyasal mutajenezin tuza dayanıklı bitki genotipleri yaratmanın iyi bir yolu olabileceğini düşündürmektedir (Kumar ve Kumari, 2021).

EMS, tuz stres toleransını nasıl etkilediğini *in vitro* olarak incelendiği bir çalışmada, *Helianthus annuus* L. cv. Palancı-I çekirdeklerini farklı miktarlarda etil metan sülfonat (EMS) (%0,0, %1,0, %1,5 ve %2,0) ile muamele edilmiş ve ardından bunları dört seviyede sodyum klorür stresi altında yetiştirdiğinde (0,0, 1,25, 2,5 ve 5,0 g/L NaCl) görülmüştür ki, %1,0 EMS işleminin, tuz seviyeleri makul olduğunda sürgünlerinin, köklerinin uzunluğu ve taze ağırlık gibi şekillerini artırarak bitkileri tuza karşı daha toleranslı hale getirmiştir. Biyokimyasal testler ayrıca toplam klorofil içeriğinin daha yüksek ve prolin seviyelerinin stabil olduğunu göstermesiyle EMS kaynaklı varyasyonun ozmotik uyumu ve stres direncini iyileştirebileceğini düşündürmektedir. Genel olarak, EMS uygulamalarının tuzluluğun olumsuz etkilerini azalttığı bulundu. Bu durum, mutasyon ıslahı yoluyla genetik olarak çeşitli ve tuza dayanıklı ayçiçeği hatlarının oluşturulmasında kullanılabileceği fikrini desteklemektedir (Altındal, 2018).

EMS pamuk tohumu çimlenmesi üzerindeki etkilerini kontrollü bir çalışmada, İki pamuk türü, *Gossypium hirsutum* L. (Teks) ve *Gossypium barbadense* L. (Aşkabat 100), 6 ve 12 saat boyunca %0,5 ve %1,0 EMS çözeltilerine konulduğunda EMS konsantrasyonunun ve tohumların buna maruz kaldığı sürenin ne kadar iyi çimlendikleri üzerinde büyük bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Kontrol grupları en yüksek çimlenme oranlarına sahip olmasına rağmen, bazı sonuçlar EMS kaynaklı mutajen pamuk tohumlarının nasıl çimlendiği konusunda farklılıklara neden olabileceğini göstermektedir. Mutajenin miktarı ve tohumların mutajene ne kadar süre maruz kaldığı, mutajenik etkinliği ve toksisiteyi etkileyen önemli faktörlerdir (Güvercin, 2020).

Solanum melongena L. (patlıcan) türüne ait patlıcanın genetik yapısını geliştirmeye yönelik bir çalışmada Surya adlı patlıcan çeşidinin tohumlarına %0,7 hacim/hacim konsantrasyonunda EMS uygulanmıştır. M2 neslinin geliştirilmesiyle, 16 farklı ailenin üyeleri fenotipik olarak incelenmiştir. Bitki boyu, yaprak, çiçek ve meyve morfolojileri gibi özelliklerde dikkate değer varyasyonlar gözlemlenmiştir. Ayrıca, bazı mutantlar belirli gen ailelerine ait hedeflenmiş genlerdeki DNA değişiklikleri için Pacbio RSII ile amplicon sekanslama yöntemi ile taranmıştır (Subramaniam ve Kumar, 2023).

EMS'nin birçok farklı ürün türünde kullanılabilmesi, bir mutajen ajanı olarak ne kadar önemli olduğunu göstermektedir. Araştırmacılar, EMS'nin mangolarda cüceliğe neden

olabileceğini, mandalinalarda stoma yoğunluğunu değiştirebileceğini, *Agave americana*'da ikincil metabolitlerin üretimini artırabileceğini ve *Coffea arabica* hücre kültürlerini tuza karşı daha dayanıklı hale getirebileceğini bulmuşlardır. Ek olarak, EMS, *Nigella sativa*'da daha fazla timokinon içeren tohum varyasyonları yaratmış ve pirinçte bitkileri strese karşı daha dirençli hale getirmiş ve çıktılarını artırmıştır. Bu örnekler, EMS'nin yalnızca nokta mutasyonlarına neden olamayacağını, aynı zamanda tarım ve endüstride yararlı olan işlevsel fenotipik çeşitlilik de yaratabileceğini göstermektedir. Bu nedenle, EMS, bitki ıslahında yeni fikirlerin arkasındaki güçtür ve rastgele mutajenezi, ürünleri iyileştirmenin odaklanmış bir yoluna dönüştürmektedir (Joya-Davila, 2020).

Sodyum azid (NaN_3)

Sodyum azid, çok çeşitli genetik değişikliklere yol açabildiği için bitki mutasyonu ıslahı için en iyi kimyasal mutajenlerden biridir. Bunlara DNA düzeyinde nokta mutasyonları ve delesyonlar, inversiyonlar ve translokasyonlar gibi kromozomal değişiklikler dahildir. Mutajenik işlevi, tohum bazlı çoğaltma sistemlerinde genetik çeşitlilik yaratmak için çok önemlidir ve bu da onu yetiştirilen bitki türlerinin genetik çeşitliliğini artırmak için kullanışlı bir araç haline getirmektedir. Çok iyi çalıştığı ve kullanımı kolay olduğu için bu kimyasal, mahsulleri iyileştirmeyi ve genetiği incelemeyi amaçlayan deneysel mutajenez için popüler bir seçim olarak bilinmektedir (Mir ve Jan, 2023).

Sodyum azid (NaN_3), birçok ürün türünün büyümesini ve verimini iyileştirmek için güçlü bir kimyasal mutajen haline gelmiştir. Genomda büyük sorunlar yaratmadan, çoğunlukla A: T'den G: C'ye geçişler olmak üzere nokta mutasyonları oluşturarak gen işlevinde küçük ama önemli değişikliklere neden olur. NaN_3 ile yapılan mutantlar daha iyi stres toleransına, hastalık direncine ve daha yüksek antioksidan aktivite veya farklı miktarlarda yağ asidi gibi metabolik profillere sahiptir. Bu kazanımlar mısır, arpa, pirinç ve ayçiçeği gibi birçok ürün türünde görülmüştür. Bu nedenle, NaN_3 aracılı mutajenez, GDO kullanmadan ürünleri iyileştirmenin hızlı ve ucuz bir yoludur ve aynı zamanda bitkilerde işlevsel genomik için çok yararlı bir tekniktir (Khan ve ark., 2009).

Bacopa monnieri üzerinde *in vitro* etil EMS ve NaN_3 gibi kimyasal mutajenlerin kullanılmasının, doza ve ne kadar süre maruz kaldıklarına bağlı olarak sürgünlerin büyümesi

ve şekli üzerinde büyük bir etkiye sahip olduğunu gösterilmiştir. Sonuçlar, EMS'nin daha yüksek konsantrasyonlarda (0,10-0,20 mg/L) ve daha uzun süreler boyunca (120 dakikaya kadar) olduğunda en uzun sürgünlere, en fazla yaprağa ve en fazla genel rejenerasyona neden olduğunu göstermiştir. Öte yandan sodyum azit, daha düşük konsantrasyonlarda (0,025-0,05 mg/L) ve daha uzun sürelerde daha iyi çalışmıştır. Çalışma, mutajenik reaksiyonun doza bağlı olduğunu göstermektedir ve fitokimyasalları iyileştirebilecek somaklonal çeşitlilik yaratmak için kimyasal mutajenlerin kullanımını haklı çıkarmaktadır (Mirza, 2020).

Farklı miktarlarda sodyum azidin (1–5 mM) *Eruca sativa* tohumlarının boyunu, yaprak alanını, taze ve kuru biyokütlesini ve klorofil içeriğini nasıl etkilediğini incelendiği bir çalışmada, 60 günlük büyümeden sonra, 3 mM konsantrasyonunun bitkilerin genel sağlık ve verimle ilgili özelliklerini iyileştirmede en iyi olduğu belirlenmiştir. Özellikle 5 mM'nin üzerindeki daha yüksek konsantrasyonlarda daha düşük toplam klorofil içeriği, mutasyonların neden olduğu toksisite veya metabolik sorunların bir işareti olabileceği ve sodyum azitin özellikle asidik fosfat çözeltilerinde (pH 3,2) tamponlandığında mutasyonlara neden olabileceğini göstermektedir (Al-Qurainy, 2009).

Yapılan başka bir çalışmada ise, sodyum azidin mısır (*Zea mays* L.) tohumlarının şekli, işlevi ve kimyasında birçok farklı değişikliğe neden olabilecek iyi bir kimyasal mutajen olduğunu göstermektedir. Farklı miktarlardaki sodyum azidin, fidelerin ne kadar iyi yaşadığı, koçanların nasıl görüldüğü, tohumlarda ne kadar besin maddesi olduğu ve bitkilerde ne kadar klorofil olduğu gibi özellikler üzerinde büyük etkisi olmuştur. Özellikle, 0,02 mM sodyum azid ile muamele edilen gruplar en güçlü büyümeye ve tohum boyutuna sahipti. Öte yandan, 0,04 ve 0,05 mM gibi daha yüksek konsantrasyonlar bitkilerin daha az büyümesine neden olmuş ve genellikle koçan oluşumunu tamamen durdurmuştur. Bu sonuçlar, sodyum azidin gıda güvenliği risk altında olduğunda mısırın besin kalitesini ve üretimini iyileştirmeyi amaçlayan mutant ıslah çabalarında yararlı bir araç olabileceğini doğrulamaktadır (Eze ve Dambo, 2015).

Domateslerle yapılan çalışmalarda, 2,0 mM konsantrasyondaki sodyum azidin iki tip domateste (Trescantos ve Super Regina) çimlenme oranını, fide yüksekliğini ve kök uzunluğunu büyük ölçüde artırdığı bulundu. Bununla birlikte, 4,0 mM'lik bir doz değerlendirilen tüm parametreler üzerinde ters etki yaptı. 2,0 mg/L kinetin ve 2,0 mg/L IAA

kombinasyonunun, hipokotil ve epikotil eksplantlarında kallus yapmak için de en iyi olduğu bulundu. Tuz seviyeleri yüksek olduğunda, kallus taze ağırlığı ve rejenerasyon verimliliği düştüğü görüldü. Bu sonuçlar, kimyasal mutajenezi doku kültürü teknikleriyle birleştirmenin, abiyotik strese maruz kaldıktan sonra domates bitkilerinin yeniden büyümesine yardımcı olmak için iyi bir yol olabileceğini göstermiştir (Abdulrazaq ve Ammar, 2015).

Sodyum azid, bitki hücreleri içinde aktif mutajenik formuna (HN_3) dönüşerek birçok bitki türünde önemli genetik değişiklikler üretme kapasitesini göstermiştir. *Nigella sativa*, *Plantago ovata* ve *Trigonella foenum graecum* arasında NaN_3 'e verilen tepkilerdeki farklılıklar, mutajen duyarlılığı üzerindeki evrimsel özelliklerin etkisini vurgulamaktadır. Yükseltilmiş konsantrasyonlar, yani 4,5 mM, her türün farklı eşikler göstermesiyle, çimlenme oranlarında, hayatta kalma yüzdelерinde ve mutasyon sıklıklarında sürekli olarak önemli farklılıklara neden olmuştur. *Nigella sativa*, muhtemelen az gelişmiş oksidatif stres savunma mekanizmaları nedeniyle en yüksek duyarlılığa sahipken, *Plantago ovata* daha dirençli bir tepki göstererek mutajen toleransındaki evrimsel iyileştirmelerin önemini vurgulamıştır. Bu veriler, sodyum azidin bitki ıslah girişimlerinde genetik çeşitliliği artırmak için güvenilir bir mutajen olarak etkinliğini vurgulamaktadır (Prabha ve ark., 2010).

Metil metan sülfonat (MMS)

Metil metan sülfonat (MMS), DNA alkilasyonu yaparak mutajenez ve rekombinasyon deneylerinde kullanılan bir kimyasaldır. MMS, DNA'daki bazıları değiştirerek replikasyonu engeller. Bu hasar, DNA onarıcı mekanizmalarıyla düzeltilebilir. DNA onarıcı mekanizmalarının verimliliği azaldığında ise hücreler MMS'ye karşı daha hassas hale gelir ve doğrudan çift iplikli kırıklara neden olabilir (Ali Khan ve ark., 2021).

Nigella sativa L. bitkisinin genetik çeşitliliğini artırmak amacıyla yapılan bir çalışmada kuru ve sağlıklı tohumlar farklı dozlarda MMS ile muamele edilmiştir. Yapılan değerlendirmeler sonucunda, *Nigella sativa L.* bitkisinin %0.25, %0,5 ve %0,75 MMS dozlarına en duyarlı olduğu belirlenmiştir. %1 MMS dozu ise ölümcül etki göstermiş ve bu dozun kullanımı önerilmemiştir. Sonuç olarak, bu çalışma *Nigella sativa L.* bitkisinin tarımsal ekonomik

özelliklerinde istenen mutasyonların oluşturulmasında %0.25, %0,5 ve %0,75 MMS dozlarının potansiyel olarak kullanılabileceğini göstermiştir (Amin ve ark., 2016).

Kolşisin (Colchicine)

Çayır çiğdemi bitkisinin tohumları ve yumrularından elde edilen kolşisin, bitkilerde hem poliploidizm (çoklu kromozom setlerinin oluşumu) indüksiyonu hem de mutasyon indüksiyonu için kullanılan bir kimyasaldır. Kolşisin, bitki hücrelerinde hücre bölünmesi sırasında kromozomların hareketini durdurarak hücre bölünmesini etkiler. Ancak, kolşisinin bitkilerdeki kromozomlar ve poliploidizm oluşumundaki tam mekanizması hala tam olarak anlaşılamamıştır (Samadi ve ark., 2022).

Krizantem bitkisinin *in vitro* mutajenez çalışmasında kolşisinin mutasyon indüklemeye etkili olduğu görülmüştür. %0,80 kolşisin ile muamele edilen sürgünlerin boyu kontrol grubundakinden daha yüksek gözlenmiştir ve bu sürgünlerin sadece 2 yan tomurcuğu bulunmaktadır, diğer bitkilerin ise 7-9 yan tomurcuğu vardır. Sap çapları da diğer bitkilere göre belirgin şekilde daha geniş olarak gözlemlenmiştir (Lertsutthichawan ve ark., 2017).

Gül türlerinden olan *Rosa gruss* ve *Rosa centifolia* türlerinde, mikro çoğaltılan bitkilerin sürgün uçlarına kolşisin uygulanmasıyla her iki türde de bitki boyu, yaprak alanı ve çiçek boyutunda belirgin artışlara neden olduğunu göstermiştir. Ayrıca, *Rosa gruss* türünde kolşisinin çiçeklerde renk değişiklikleri ve varyasyonlara yol açtığı gözlemlenmiştir (Baig ve ark., 2016).

2.2. Sorghum Bitkisinde Mutajen Çalışmaları

Gama ışınları ve EMS mutajenleri, M2 neslinde *Sorghum bicolor*'un önemli morfolojik ve verim özellikleri üzerinde büyük bir etkiye sahip olduğu bulunmuştur. 40 mM konsantrasyonda, EMS'nin bitki boyu, yaprak boyutu ve başak başı uzunluğu, tane ağırlığı ve biyokütle birikimi gibi verim faktörleri üzerinde kontrol ve gama ışını uygulamalarından daha iyi sonuçlar alınmıştır. Bu sonuçlar, EMS'nin değerli genetik çeşitlilik, erken çiçeklenme ve yüksek verimli mutantlar yaratmanın iyi bir yolu olduğunu göstermektedir.

Bu, onu sorgumu iyileştirmek için mutasyon ıslah stratejileri için arzu edilen bir araç haline getirdiği düşünülmektedir (Suthakar ve Mullainathan, 2015).

Saksı boyutu, su ve gübre yönetimi ve günün uzunluğu gibi şeyleri dikkatlice kontrol ederek, sorgumun büyümesini hızlı döngü teknikleriyle iyileştirmek mümkündür. Bu koşulları olabildiğince iyi hale getirirseniz, yılda dört ila altı nesil elde edebilirsiniz. Bu yöntem, daha iyi çeşitler üretmek için gereken süreyi önemli ölçüde azaltmaktadır. Genellikle 10 ila 12 yıl sürer, bu yöntem sayesinde özellikle Striga parazit direnci gibi özellikler için mutant yetiştirme hatlarını hızlandırmayı mümkün kıldığı gösterilmiştir (Ghanim ve ark., 2023).

Mutasyona uğramış geniş bir *S. bicolor* popülasyonu yaratmak için kimyasal bir mutajen olarak EMS kullanılan çalışmalarda, REDforGREEN (RG) adı verilen benzersiz bir mutant hat ortaya çıkarılmıştır. RG hattı, özelliğin baskın bir şekilde aktarıldığını ve pigment birikiminin erken yaprak gelişimi sırasında belirli dokularda başladığını ve yaprak boyunca aşağı doğru hareket ettiğini gösterdi. RG mutantı benzersiz bir görsel fenotipe ve yabancı tipten daha yüksek miktarda toplam fenolik, yoğunlaştırılmış tanen ve klorojenik aside sahip olduğu görüldü. Bu mutant hattın tohum dokularında daha fazla pigmentasyon yoktu; bu önemliydi çünkü özelliğin yalnızca yapraklarda mevcut olduğunu göstermektedir. RG'nin oluşturulması, EMS mutajenezisinin, özellikle yapraklar gibi geleneksel olmayan bitki dokularından doğal gıda renklendiricileri yapmak için kullanılabilecek işlevsel varyasyonları bulmada ne kadar güçlü olduğunu göstermektedir (Petti ve ark, 2014).

2.3. Mutajen Çalışmalar İçin Moleküler Markörlerin Kullanımı

Moleküler bitki ıslahındaki gelişmeler, genetik ve genom düzenleme alanlarında daha kapsamlı bir çeşitlilik anlayışı ortaya çıkardı. Yeni nesil dizileme teknolojileri, karmaşık ve yapılandırılmamış popülasyonlar için yeni moleküler belirteçlerin keşfini kolaylaştırdı. Genetik işaretçiler, hedef genle yakından ilişkilidir ve işaret veya belirteç gibi işlev görürler. Bu belirteçler genellikle klasik ve DNA/moleküler işaretçiler olarak iki ana kategoriye ayrılır. Klasik belirteçler, morfolojik, sitolojik ve biyokimyasal işaretçiler gibi çeşitli türleri içerirken, DNA işaretçileri arasında restriksiyon fragment uzunluğu polimorfizmi (RFLP), amplifiye fragment uzunluğu polimorfizmi (AFLP), basit dizi tekrarı (SSR), tek nükleotid

polimorfizmi (SNP) ve çeşitlilik dizisi teknolojisi (DArT) işaretçileri bulunur (Nadeem ve ark., 2018).

Triticum aestivum (buğday) embriyo kültürlerini dört farklı zaman miktarı (2, 4, 6 ve 8 saat) ve beş farklı konsantrasyonda (%0, %0,1, %0,2, %0,3 ve %0,4) EMS ile muamele edildiği çalışmalarda. EMS uygulanan olgun embriyoların tekrar büyüyüp büyüyemediklerini morfolojik olarak incelenmiş ve ardından büyüyen bitkilere moleküler düzeyde bakılmıştır. İnversiyon polimorfizmleri ve genomik instabilite dahil olmak üzere mutajenik etkilere bakmak için primerler arası bağlanma bölgesi (iPBS) retrotranspozon belirteçlerini kullanılmıştır. Sonuçlar, EMS'nin neden olduğu mutajenez tedavilerinin, tekrar yetiştirilen buğday bitkilerinin hem polimorfizm miktarı hem de genomik stabilitesi üzerinde büyük etkileri olduğunu göstermiştir. iPBS belirteçlerinin, kimyasal mutajen tarafından oluşturulan retrotranspozonlar ve genomik yeniden düzenlemelerle ilişkili değişiklikleri bulmak için iyi çalıştığı sonucu alınmıştır. Bu sonuçlar, EMS'nin mutant ıslahında kullanıldığı koşulları iyileştirmenin ne kadar önemli olduğunu ve iPBS gibi moleküler belirteç sistemlerinin indüklenen mutajenezin genetik etkilerini incelemek için ne kadar yararlı olduğunu göstermektedir (Türkoğlu ve ark., 2023).

Chrysanthemum morifolium bitkisinin EMS ile muamelesi sonrası yapılan çalışmada ISSR ve IRAP moleküler işaretçileri kullanılarak genetik farklılıklar tespit edilmiş ve EMS mutajeninin etkili olduğu, elde edilen mutantların çeşitli özelliklerde farklılık gösterdiği görülmüştür (Nasri ve ark., 2022).

Olive (*Olea europaea* L.) 'Kronaki' çeşidinde beş farklı konsantrasyonda sodyum azid (NaN_3) kullanılarak *in vitro* mutajenez yapılmış. Ayrıca Rastgele Amplifiye Edilmiş Polimorfik DNA (RAPD) ve Aralıklı Basit Dizi Tekrarı (ISSR) işaretçileri, üretilen zeytin mutantları arasındaki genetik polimorfizmi tespit etmek için kullanılmıştır. RAPD, ISSR ve birleşik RAPD ve ISSR işaretçi analizine dayanarak, tüm NaN_3 işlemlerinin algılanabilir seviyelerde mutasyona neden olduğu gösterilmiştir (Deh Sheikh ve Moradnejad, 2014).

Bir orkide çeşidi olan *Aerides crispa* Lindl. adlı tıbbi orkide türünde *in vitro* mutajenik çalışmalar için düşük konsantrasyonlarda kolşisin, etil metan sülfonat (EMS) ve düşük dozlarda gama ışınları ile işlenmiş ve sağlıklı sürgün tomurcukları oluşmuştur. Çalışma

sonunda ise, RAPD kullanılarak genetik olarak farklı 15 mutant hat tanımlandı (Srivastava ve ark., 2018).

Pisum sativum üzerinde yapılan çalışma RAPD, ISSR, SCAR ve CAPS gibi PZR tabanlı moleküler belirteçlerin hem doğal hem de yapay (örneğin mutajenik) nedenlerden kaynaklanan genetik çeşitliliği incelemek için çok yararlı olduğunu göstermiştir. Bu belirteçler, çeşitler, hatlar ve mutantlar arasında genetik çeşitliliği doğru bir şekilde bulmayı mümkün kılmıştır. Ayrıca genotiplerin saflığını kontrol etmede ve uzay uçuşu gibi uzun vadeli çevresel zorlukların bunları nasıl etkilediğini görmede de çok yardımcı olmuşlardır. Çalışma ayrıca bu belirteçlerin moleküler genetik haritalama ve tarım için hayati önem taşıyan özelliklerle bağlantılı genleri bulma açısından ne kadar önemli olduğunu vurgulamıştır. Bu, işlevsel genomik ve gelişmiş bitki ıslah taktikleri için ne kadar önemli olduklarını göstermektedir (Gostimsky ve ark., 2005).

Rosa hybrida çeşidinde (First Red, Cri Cri ve Pusa Gaurav) genetik değişikliklere neden olmak için EMS kullanıldığı ve ardından varyasyonları bulmak için RAPD işaretleyici analizinin kullanıldığı çalışmada morfolojik değişiklikler ve yüksek polimorfizm seviyeleri, EMS uygulamasının moleküler düzeyde çok çeşitli mutasyonlara neden olabileceğini göstermiştir. Bu sonuçlar EMS'nin dekoratif bitki ıslahında yeni gül çeşitleri yaratmak için iyi bir erken seçim aracı haline getirmektedir (Senapati ve ark., 2008).

Lilium longiflorum melezlerinde genetik çeşitlilik yaratmak için gama ışınlaması başarıyla kullanılmış ve ortaya çıkan mutasyonlar daha sonra iki moleküler işaretleyici sistemi kullanılarak analiz edilmiştir. Çalışmada, ışınlanmış bitkiciklerin çok fazla genetik çeşitliliğe sahip olduğunu ve ISSR işaretleyicilerinin bu çeşitliliği bulmada diğer işaretleyicilerden daha iyi olduğu bulunmuştur. Bu sonuçlar, fiziksel mutajen ve moleküler işaretleyici analizini birlikte kullanmanın, yeni genotipleri erken dönemde ortaya çıkarmak için iyi bir yol olduğunu göstermektedir. Bu, üremeyi ve daha iyi süs orkidesi çeşitlerinin oluşturulmasını hızlandırdığı düşünülmektedir (Xi ve ark. 2012).

Zea Mays L bitkisi ile yapılan çalışma, hedeflenen kimyasal mutagenezi ve geliştirilmiş SSR belirteç analizini kullanarak germ plazmasında indüklenen genetik çeşitliliğin ne kadar güçlü olabileceğini göstermektedir. Yüksek tane verimi, daha iyi stres toleransı ve farklı

çiçeklenme zamanı gibi daha iyi agronomik özelliklere sahip mutant hatlar üretmek için tekrarlayan karşılıklı mutasyon ıslahını (RRMB) kullanmışlardır. SSR profili, mutantların geleneksel hatlara göre daha fazla genetik çeşitliliğe sahip olduğunu ve benzersiz alellerin fenotipik faydalarla bağlantılı olduğunu gösterdi. Bu sonuçlar, mutajenezin mevcut mahsulleri daha çeşitli hale getirmek, yetiştiricilere genetik darboğazları aşma ve değişen iklimlere uyum sağlama şansı vermek için güçlü bir teknik olduğunu göstermiştir (Kostova ve ark., 2006).

Moleküler işaretleyiciler sadece mutajene dayalı varyasyonları tespit etmek için değil bir bölgede var olan türler arasındaki varyasyonu tespit etmek içinde kullanılmaktadır. Hakkâri ilindeki Derecik ve Çukurca bölgelerinden 73 incir genotipine iPBS primeri kullanarak bakılmış. Çok yüksek bir polimorfizm oranı bulmuşlardır. Yerel incir popülasyonları içinde çok fazla genetik heterojenlik olduğunu göstermektedir. ANOVA analiz sonuçları, genetik varyasyonun %96'sının popülasyonlar içinde bulunduğunu göstermiştir. Bu, bu örneklerin genetik olarak ne kadar çeşitli olduğunu daha da göstermektedir. Ayrıca, sonuçlar, iPBS belirteçlerinin incir germ plazmasını yetiştirmek ve korumak için güçlü, güvenilir ve genomdan bağımsız bir moleküler araç olduğunu göstermektedir (Uçer ve ark. 2025).

2.4. Tarımda ANOVA, RSM ve Taguchi Design Yöntemlerinin Kullanılması

Taguchi tekniği, deneyler tasarlamak için planlı ve metodik bir yoldur. Başlıca amacı, ürünleri ve süreçleri gürültü kaynaklarının neden olduğu kontrol edilemeyen ya da istenmeyen değişikliklere karşı daha dayanıklı hale getirerek kaliteyi ve performansını iyileştirmektir. Daha az deneysel çalışmayla aynı anda birçok farklı faktöre bakmanızı sağlar. Değişkenliği ve kalite kaybını azaltan en iyi parametre seviyelerini seçmenize yardımcı olur. Bu çerçeve, mühendislerin ve araştırmacıların daha ucuz fiyatlarla iyi sonuçlar elde etmelerini sağlar, bu nedenle Taguchi tekniği birçok farklı alanda faydalı olduğu görülmüştür (Mitra, 2011).

Tepki Yüzey Metodolojisi (RSM) ve Taguchi yöntemi farklı bilim ve mühendislik alanlarında nasıl kullanıldığına dair kapsamlı bir genel bakış sunmaktadır. Doğrudan deneylerin çok pahalı veya mümkün olmadığı durumlarda, RSM'nin özellikle birden fazla değişkene sahip sistemleri optimize etmek için yararlı olduğunu vurgulanmıştır. Bu

yaklaşım, bilinen çalışmaların yanı sıra biyosorpsiyon, çözücü ekstraksiyonu, biyodizel üretimi ve biyoteknolojik optimizasyonlarda kullanılmıştır. Güçlü bir tasarım yöntemi olarak bilinen Taguchi yöntemi, az sayıda deneysel denemeyle varyasyonu ne kadar iyi azalttığı ve kaliteyi ne kadar iyileştirdiği için de tercih edilmektedir. Malzemeleri işleme ve işlemekten atık suyu arıtmaya ve nanomalzemeler yapmaya kadar çok çeşitli teknik zorluklar için kullanılabilir. Her iki stratejinin de süreçleri daha verimli ve ürünleri daha iyi hale getirmek için istatistiksel olarak güçlü ve uygun maliyetli yollar olduğu sonucuna varılmıştır (Chizoba ve Kyari, 2020).

Endüstriyel kenevirde *in vitro* olarak fidelerin çimlenmesini ve büyümesini iyileştirmek için en iyi hidrojen peroksit (H_2O_2) konsantrasyonunu bulmak için güçlü bir istatistiksel çerçeve sağlamak amacıyla RSM kullanılmıştır. RSM analizi sonucunda, H_2O_2 'nin çimlenme oranı, fidelerin ortaya çıkışı ve biyokütlenin büyümesi üzerinde büyük bir olumlu etkiye sahip olduğunu gösterdi ve en iyi konsantrasyonun yaklaşık %2,2 olduğu bulundu. Bu aralığın dışında hem çimlenme hem de büyüme oranları düştü ve doğru dozu elde etmenin ne kadar önemli olduğunu gösterdi. Bu yöntem sayesinde, RSM'nin bitki doku kültürü sistemlerindeki deneyleri modellemek için yararlı ve etkili bir araç olduğunu gösterilmiştir (Aasim ve ark., 2022).

Ghaf tohumlarının çimlenmesini etkileyen ön uygulama etkenlerinin (süre, ZnO nanopartikül konsantrasyonu, sıcaklık ve çalkalama) ne kadar önemli olduğunu dikkatlice incelemek için Taguchi deneme tasarımı kullanıldığı bir çalışmada her bir elementin önemini ve göreceli katkısını incelemek için ayrıca varyans analizi (ANOVA) kullanılmıştır. Tepkime modellemesi yapmak ve çeşitli durumlarda çimlenme sonuçlarını tahmin etmek için RSM adı verilen regresyon tabanlı bir yöntem kullanılmış ve Taguchi, ANOVA ve RSM'yi birleştirerek, deneysel çalıştırma sayısını azaltabilecek eksiksiz ve istatistiksel olarak sağlam bir optimizasyon çerçevesi oluşturulmuştur (Francis ve ark., 2024).

2.5. Yapay Zekâ Çalışmaları (Tarımda/Mutajen)

Yapay zekâ (YZ), büyük miktarda genetik, fenotip ve çevresel veriyi işleyip anlamlandırabildiği için hızla modern bitki ıslahının önemli bir parçası haline gelmektedir. YZ, yüksek verimli dizileme, uzaktan algılama ve moleküler analiz sistem platformlarını

derin öğrenme ve makine öğrenimi modelleriyle birleştirerek karmaşık özellikleri doğru bir şekilde tahmin edebilir ve yeni aleller bulabilir. Genom çapında varyant adlandırma, fenotipleri tahmin etme, stresi teşhis etme, gen düzenleme ve genomik seçim gibi çok çeşitli şeyler için kullanılabilir. Ayrıca YZ, genotip ve çevrenin nasıl etkileşime girdiğini simüle ederek yetiştiricilerin genotip ve fenotip arasındaki boşluğu kapatmasına yardımcı olur. Buna ek olarak gen işlevi açıklamasını ve transpozon tespitini de iyileştirebilir. YZ, tarımın ve iklimin değişen ihtiyaçlarını karşılayabilen akıllı ürünler inşa etmeyi mümkün kılar. YZ yalnızca bir analiz aracı değil; Aynı zamanda iklime dayanıklı ve yüksek performanslı gelecek nesil ürün çeşitlerini değiştiren güçlü bir araç olarak kullanılabilir (Farooq ve ark., 2024).

Modern bitki ıslahının fenotipik seçim ve melezleme gibi geleneksel yöntemlerden çok yol kat etmiştir. Marker destekli seçim, genom çapında ilişki çalışmaları (GWAS) ve CRISPR/Cas9 gibi son teknoloji gen düzenleme sistemleri gibi moleküler araçları kullanan daha kesin yöntemlere doğru ilerleme sağlanmıştır. Bu yeni teknolojiler, yetiştiricilerin bitkileri biyotik ve abiyotik stres faktörlerine karşı daha dirençli hale getirmelerine, genetik çeşitliliği artırmalarına ve yüksek verimli çeşitlerin yaratılmasını hızlandırmalarına yardımcı olmaktadır. Ayrıca, yüksek verimli fenotipleme ve genotipik analizde yapay zekâ (YZ) ve makine öğreniminin kullanılması, bitki ıslahında veri odaklı bir iş yapma yolunu açmıştır. Bu, bitkileri her zamankinden daha hızlı ve daha doğru bir şekilde nasıl geliştireceğimize dair kararlar alınmasını sağlamıştır (Sun ve ark., 2024).

Bitki biyoteknolojisindeki son gelişmeler, kimyasal mutajenezi makine öğrenimi (ML) ve yapay sinir ağları (YSA) ile entegre etmenin doku kültürü tepkilerini modellemek ve iyileştirmek için birlikte çalışabileceğini göstermiştir. İki kimyasal mutajen, EMS ve NaN_3 , sürgün rejenerasyonunu ve morfogenetik özellikleri nasıl etkilediklerini görmek için *Bacopa monnieri* üzerinde farklı miktarlarda ve farklı sürelerde kullanılmıştır. Sonuçlar, EMS'nin özellikle daha yüksek konsantrasyonlarda ve daha uzun maruz kalma sürelerinde sürgün uzunluğunu, düğüm sayısını ve yaprak büyümesini artırmada NaN_3 'den daha iyi olduğunu göstermiştir. Öte yandan, NaN_3 daha uzun süre kullanıldığında, özellikle düğüm sayısını artırma söz konusu olduğunda, daha düşük konsantrasyonlarda daha iyi çalışmıştır. Deneylerin sonuçlarını tahmin etmek ve kontrol etmek için Destek Vektör Sınıflandırıcısı, Gauss İşlemi, XGBoost, Rastgele Orman ve Çok Katmanlı Algılayıcı gibi makine öğrenimi

yöntemlerini kullandık. Random Forest (RF) modeli, 0,99 ile 1,00 arasındaki F1 değerleriyle tüm nitelikler için en yüksek tahmin doğruluğuna sahiptir. Bu, biyolojik veri kümeleriyle çalışmak için yeterince güçlü olduğunu gösterir. Bu çalışma, ML odaklı çerçevelerin hassas mutant üremeyi hızlandırmada nasıl daha önemli hale geldiğini göstermektedir. Ayrıca, ekonomi için hayati önem taşıyan diğer bitki türlerinde rejenerasyon sistemlerini iyileştirmek için ölçeklenebilir bir seçenek sunmaktadır (Mirza ve ark., 2023).

Yapay zekanın kullanımı, düzenlenmiş *in vitro* koşullarda nohutların çimlenme ve büyüme indekslerini doğru bir şekilde simüle etmeyi ve iyileştirmeyi mümkün kılmıştır. Işık yayan diyetler (LED'ler) ve hidropriming ile geçirilen farklı zaman miktarlarının birbirini nasıl etkilediğine bakmak için iki güçlü makine öğrenimi yöntemi olan Çok Katmanlı Algılayıcı (MLP) ve Rastgele Forest (RF) algoritması kullanılmıştır. MLP modeli, özellikle sürgün uzunluğu için, RF için 0,789'a kıyasla 0,831'lik bir R^2 değeri ile her zaman RF modelinden daha iyi tahmin doğruluğuna sahip çıktı. MLP ayrıca, çoğu çıktı parametresi için daha düşük ortalama karesel hata (MSE), ortalama mutlak hata (MAE) ve ortalama mutlak yüzdelik hata (MAPE) puanlarına sahipti ve bu, yaptığı işte daha iyi olduğunu göstermiştir. Bu sonuçlar, bitki doku kültürü ve hassas tarımda yapay zekâ tabanlı modelleme çerçevelerinin kullanılmasının ne kadar yararlı olabileceğini göstermektedir. Makine öğrenimi yalnızca tahmin yeteneklerini geliştirmekle kalmadı, aynı zamanda bize birçok çevresel ve fizyolojik değişken arasındaki doğrusal olmayan ve karmaşık korelasyonlara ilişkin veriye dayalı içgörüler de sağlamıştır (Aasim ve ark., 2024).

Meyve ve sebze kabuğu özünden yapılan nanopartiküller, tohumların çimlenmesine, güçlü fideler oluşturmaya ve canlı ve cansız şeylerden korunmasına yardımcı olmak için tohum kaplama veya nano-priming'de kullanıldığı bu çalışmada Nano-priming tohumlarda makine öğrenimi (ML) ve yapay zekâ (YZ) kullanılmış, tohum teşhisi, mahsul yönetimi ve genel olarak çiftçiliğin çeşitli alanlarını iyileştirebilir ve bu da birçok faydaya yol açabileceği sonucuna varılmıştır (Yadav ve Mathur, 2024) .

Bu çalışma, bitki mutasyon ıslahının önemli bir yönünü ele almıştır ancak daha fazla araştırmaya ihtiyaç bulunmaktadır. Özellikle, farklı kimyasal mutajenlerin farklı bitki türleri üzerindeki etkilerinin daha detaylı bir şekilde incelenmesi önemlidir. Ayrıca, mutajenik işlemlerin bitki genlerinin işlevselliği üzerindeki etkileri daha kapsamlı bir şekilde

değerlendirilmelidir. Ayrıca, bu çalışmanın tarım alanında uygulamaları da düşünülmelidir. Elde edilen mutant bitkilerin tarımsal verimliliklerinin artırılması ve streslere dayanıklılıklarının artırılması için nasıl kullanılabileceği üzerine çalışmalar yapılmalıdır. Bu, özellikle gelişmekte olan ülkelerde gıda güvencesi sorunlarına çözüm olabilir. Sonuç olarak, bu çalışma, bitki mutasyon ıslahının önemli bir yönünü aydınlatmıştır. Daha fazla araştırma ve uygulama ile bu yöntemlerin tarım alanında önemli katkılar sağlayabileceğine inanıyoruz.



3. MATERİYAL ve YÖNTEM

3.1. Deneme Yeri

Bu çalışma Sivas Bilim ve Teknoloji Üniversitesi Tarım Bilimleri Fakültesi Bitki Doku Kültürü ve Moleküler Biyoloji laboratuvarlarında yürütülmüştür.

3.2. Bitki Materyali

Bu çalışmada bitki materyali olarak kullanılan *Sorghum bicolor* L. Moench Sivas Bilim ve Teknoloji Üniversitesi Tarım Bilimleri Fakültesinden temin edilmiştir.

3.3. Büyüme Ortamları ve Doku Kültürü Koşulları

Bu çalışmada besin ortamı olarak çeşitli mineral ve tuzların bulunduğu MS (Çizelge 3.1.) kullanılmıştır (Murashige ve Skoog, 1962).

Çizelge 3.1. Murashige ve Skoog (1962) ortamında bulunan maddeler ve konsantrasyonları

Ortamda Bulunan Maddeler		Konsantrasyonu (mg/L)
Makro Elementler	NH ₄ NO ₃	1650,000
	KNO ₃	1900,000
	CaCl ₂ .2H ₂ O	440,000
	MgSO ₄ .7H ₂ O	370,000
	KH ₂ PO ₄	170,000
Mikro Elementler	KI	0,830
	H ₃ BO ₃	6,200
	MnSO ₄ .4H ₂ O	22,300
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,600
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,250
	FeSO ₄ .7H ₂ O	27,850
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
	Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37,250
Vitaminler	Myo-Inositol	100,000
	Nicotinic Acid	0,500
	Pyrotinic Acid	0,500
	Thiamina-HCl	0,100
	Glycine	2,000

Bazal ortama %0,65 agar ekleyerek katılaştırıldı. Ortam hazırlanırken steril saf su kullanıldı. Ortamın pH'ı 1 N NaOH veya 1 N HCl eklenerek 5,8'e sabitlenmiş ve ortamda kullanılacak materyaller 121 °C ve 1,5 atm basınçta bir otoklava koyarak sterilize edilmiştir. Kùltürler günde 16 saat boyunca 24±1°C'de beyaz floresan veya LED aydınlatma altında tutulmuştur.

3.4. Kimyasal Mutajenik Ajanlar

Bu çalışmada, sodyum azid (NaN_3) ve etil metan sülfonat (EMS), laboratuvar ortamında *Sorgum bicolor*'da genlerde değışikliklere neden olmak için kimyasal mutajenler olarak kullanılmıştır. İkinci bir yaklaşım olarak, trietilen tetramin (TETA) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) kullanılmıştır. Steril damıtılmış su kullanarak her mutajenin 10 mg/mL konsantrasyonundaki stok çözeltileri hazırlanmış üretilen stok çözeltileri, ihtiyaç duyulana kadar stabil ve mutajenik kalmaları için 4 °C'de bir buzdolabında saklanmıştır. Bundan sonra, bu çözeltiler doğru çalışma konsantrasyonları olarak 1, 2 ve 3 mg/L olarak seyreltilmiştir.

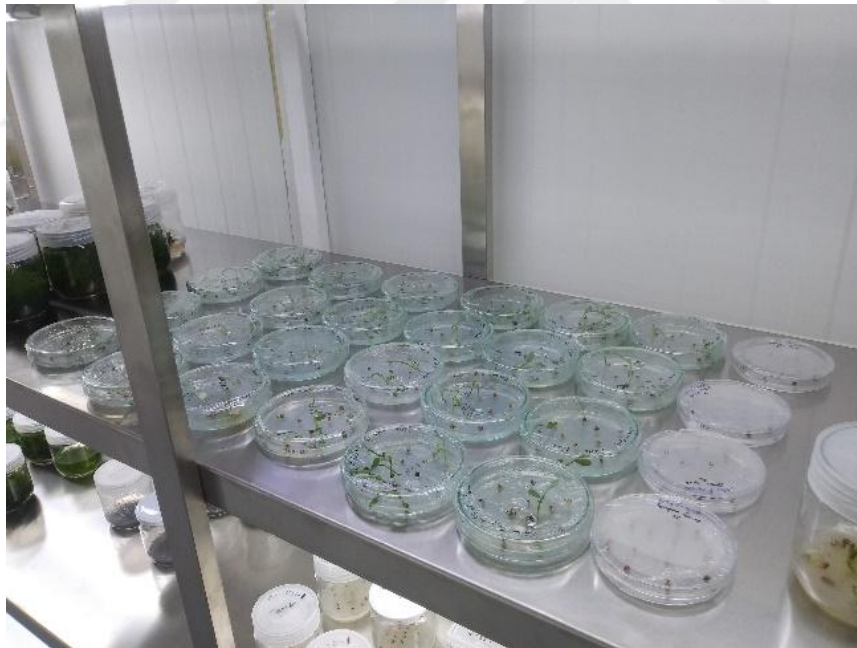
3.5. *In Vitro* Kùltür ve Sterilizasyon Çalışmaları

Bu çalışmada kullanılan bitki materyali tohumlar *in vitro* koşullarda çimlenmeye uygun hale getirilmesi için yüzey sterilizasyonu işlemleri dikkatle uygulanmıştır. *S. bicolor*, tohumlarının herhangi bir kontaminasyon olmadan *in vitro* yetiştirilebilmesini sağlamak ve yüzeyleri sterilize etmek için etkili bir yöntem oluşturulmuştur. Bu aşama, mutajen uygulamaları ve moleküler analiz gibi daha sonraki doku kùltürü tabanlı biyoteknolojik uygulamaların etkinliği üzerinde doğrudan bir etkiye sahip olduğundan çok önemlidir.

Farklı sorgumun farklı genotiplerinden elde edilen tohumlarda çok aşamalı bir sterilizasyon işlemi kullanılmıştır. İlk olarak, tohumların yüzeylerindeki kirlerden kurtulmak ve mikrobiyal kontaminasyonu azaltmak için 5 dakika boyunca %70 etanolde bekletilmiştir. Uygulama sonunda, kalan alkolü durulamak için steril damıtılmış su kullanılmış ve daha sonra, tohumlar 45 dakika boyunca %0,1 cıva klorür (HgCl_2) solüsyonunda bekletilmiştir. Bu, çok çeşitli mikroorganizmalara karşı etkili olan güçlü bir dezenfektandır. Tohumlar, tüm kimyasal kalıntıların gittiğinden emin olmak için her seferinde beş dakika olmak üzere steril damıtılmış suda üç kez durulanmıştır.

Sterilizasyon adımlarından sonra tohumlar, içinde 4,4 g/L MS tuzu, 30 g/L sakaroz ve 6,5 g/L agar bulunan Murashige ve Skoog (MS) ortamına konularak ortamın pH'ı 5,8'e ayarlanarak 1,5 atm basınçta 15 dakika boyunca 121°C'de otoklav uygulaması yapılmıştır. İki deneysel koşul için: birine otoklavlanmadan önce 10 mg/L Bion MX 44 WG fungusiti ve diğerine hiçbir fungusit eklenmemiştir. Kùltürler, 16 saatlik bir fotoperiyot ve %60 bağıl nem ile 24°C $\pm$ 1°C'ye ayarlanmış kontrollü bir ortama sahip bir büyüme odasında tutulmuştur. Tüm sterilizasyon işlemleri laminar hava akış kabini altında aseptik koşullarda gerçekleştirilmiştir.

Sterilizasyon tekniğinin ne kadar iyi çalıştığını görmek için çimlenme ve görünür kontaminasyon oranına bakarak hangi sterilizasyon yönteminin daha etkili olduğunu bulmak için tek yönlü ANOVA analizi kullanılmıştır. Fungisit konsantrasyonu ve inkübasyon süresi gibi kùltür parametrelerini göstermek ve iyileştirmek için tepki yüzey metodolojisi (RSM) ve kontur/yüzey grafikleri (Design Expert yazılımı kullanılarak) kullanılmıştır.



Resim 3.1. Sterilizasyon sonucu *in vitro* kùltüre alınmış tohumlar

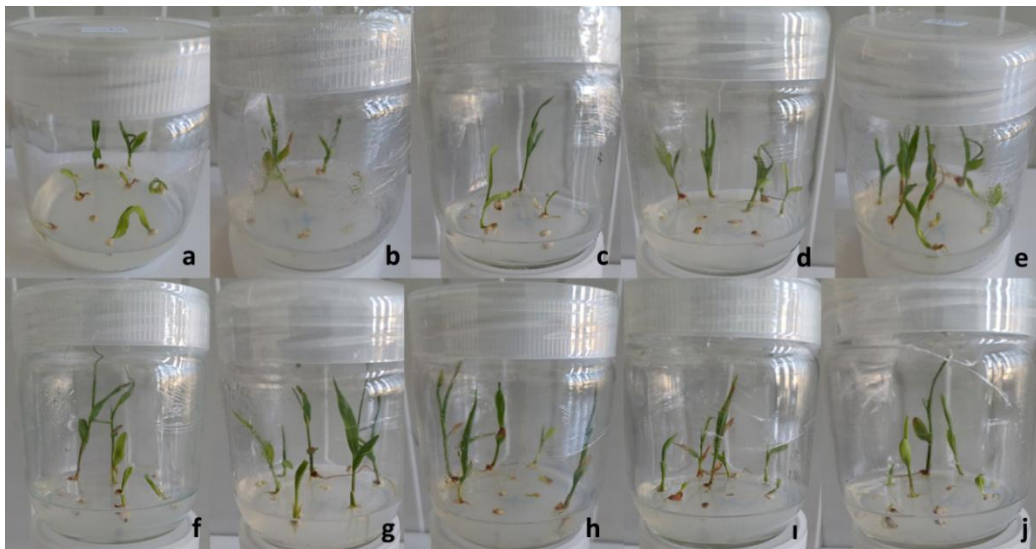
3.6. *İn Vitro* Kùltürü ve Mutajen Uygulamaları

Sterilize edilen tohumlar, (1, 2 ve 3 mg/L) EMS ve NaN₃ içeren mutajen çözeltilerine maruz bırakılmıştır. Her mutajen için 2, 4 ve 6 saatlik üç farklı inkübasyon süresi uygulanmıştır.

Tohumlar, steril kavanozlarda, oda sıcaklığında (yaklaşık 24 ± 1 °C) inkübe edilmiştir (Resim 3.1). Bu süre zarfında mutajen maddenin homojen şekilde tohum yüzeyine ve dokularına nüfuz etmesi sağlanmıştır. Uygulama süresi sonunda tohumlar, mutajen kalıntılarını uzaklaştırmak amacıyla steril saf su ile birkaç kez yıkanmış ve ardından kurutularak çimlenme ve kültür çalışmalarına alınmıştır. Aynı işlemler trietilen tetramin (TETA) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) kimyasalları içinde uygulanmıştır.

3.7. Mutajen Uygulaması Sonucu Çimlenme Verilerinin Alınması

Mutajen uygulamasının ardından, EMS ve sodyum azid ile muamele edilmiş tohumlar MS temel besi ortamı içeren kültür kaplarına alınmıştır. Her uygulama grubu için 4 tekerrürlü deney setleri oluşturulmuş ve her bir kaptaki 10 – 12 tohum yer alacak şekilde düzenleme yapılmıştır. Tohumlar, 24 ± 1 °C sıcaklıkta, 16 saat aydınlık ve 8 saat karanlık olacak şekilde düzenlenen fotoperiyot altında çimlenmeye bırakılmıştır. Tohumların çimlenme durumu, uygulamadan sonraki ilk günden itibaren günlük olarak gözlemlenmiş ve kayıt altına alınmıştır. Çimlenme, radikula ucunun tohum kabuğunu kırarak görünür hale gelmesi olarak tanımlanmıştır (Resim 3.2).



Resim 3.2. Mutajen uygulanmış tohumlar

Çimlenme endekslerine bakmak için sekiz güne kadar her iki günde bir çimlenme gözlemlenmiştir. Bunun için GerminaR paketi (Lozano-Isla, Benites-Alfaro and Pompelli, 2019) kullanılmıştır.

Çimlenme yüzdesi (grp): çimlenme sürecini tamamlayan tohum sayısıdır.

$$grp = \frac{\sum_{i=1}^k n_i}{N} \times 100$$

Burada n_i , günde filizlenen tohum sayısıdır; N , her deney ünitesindeki toplam tohum sayısıdır ve k , çimlenme değerlendirmesinin son günüdür.

Ortalama Çimlenme Süresi (mgt): değerlendirme anında filizlenen tohum sayısına kıyasla filizlenen tohum sayısının oranıdır.

$$mgt = \frac{\sum_{i=1}^k n_i t_i}{\sum_{i=1}^k n_i}$$

t_i , deneyin başlangıcından i gözleme (çimlenme sayımına) kadar geçen zamanı ifade eder.

Çimlenme Hız Katsayısı (gsp): tohumların ne kadar hızlı çimlendiğini gösteren bir indekstir. Daha yüksek gsp değeri, daha hızlı çimlenme anlamına gelir.

$$gsp = \frac{\sum_{i=1}^k G_i}{\sum_{i=1}^k G_i X_i} \times 100$$

G_i , gözlem zamanında çimlenen tohum sayısı, X_i , gözlem zamanına kadar çimlenen tohum sayısını ifade eder.

Belirsizlik (unc): Çimlenme belirsizliği (unc), çimlenmenin zaman içinde ne kadar eşit bir şekilde gerçekleştiğini bulmanın bir yoludur. UNC değerleri düşük olduğunda, genellikle aynı anda çok sayıda tohumun filizlendiği anlamına gelir. Başka bir deyişle, minimum belirsizlik, çimlenmenin daha odaklı olduğu anlamına gelir. Bu endeks, çimlenmenin ne kadar yayılmış veya kümelenmiş olduğunu gösterir.

$$unc = - \sum_{i=1}^k f_i \log_2 f_i \text{ with } f_i = \frac{n_i}{\sum_{i=1}^k n_i}$$

Senkronizasyon (syn): Çimlenme senkronizasyonu (syn) ilk olarak bir popülasyonda aynı anda ne kadar çiçeklenme olduğunu anlamak için yapıldı. Daha sonra çimlenme endeksi olarak da kullanılmıştır. Syn = 1 değeri tüm tohumların aynı anda çimlendiği anlamına gelirken, syn = 0 değeri en az iki tohumun, birer birer olmak üzere çimlendiği anlamına gelir. Daha da önemlisi, syn yalnızca iki tohum aynı anda tohum çimlenme sürecini tamamladığında sıfır olmayan bir sayı verir.

$$syn = \frac{\sum_{i=1}^k C_{n_i,2}}{C_{\sum n_i,2}} \text{ with } C_{n_i,2} = \frac{n_i(n_i - 1)}{2}$$

Çimlenme varyansı (vgt): Çimlenme varyansı endeksi, tohumların çimlenmesinin ne kadar zaman aldığını bir popülasyon içinde gösterir. Yüksek vgt, çok fazla varyasyon olduğu anlamına gelir ve bunun tersi de geçerlidir.

$$vgt = \frac{\sum_{i=1}^k n_i (t_i - \bar{t})^2}{\sum_{i=1}^k n_i - 1}$$

Çimlenme varyasyon katsayısı (cvg): tohumların ne kadar eşit çimlendiğini bulmak için kullanılan istatistiksel bir yöntemdir. Yüksek cvg çok fazla varyasyon anlamına gelirken, düşük cvg çimlenmenin zaman içinde aynı olduğu anlamına gelir.

$$cvg = \left(\frac{\sqrt{vgt}}{mgt} \right) \times 100$$

Gözlemler sekiz gün boyunca sürdürülmüş ve bu süre zarfında çimlenen tohum sayısı belirli aralıklarla kaydedilmiştir. Elde edilen veriler kullanılarak toplam çimlenme yüzdesi (%) hesaplanmıştır. Bu veriler, mutajen türü, konsantrasyonu ve uygulama süresi gibi faktörlerin çimlenme üzerindeki etkilerini karşılaştırmak amacıyla istatistiksel analizlere tabi tutulmuştur. Kontrol grubunda çimlenme oranlarıyla karşılaştırılarak mutajenik etkiler

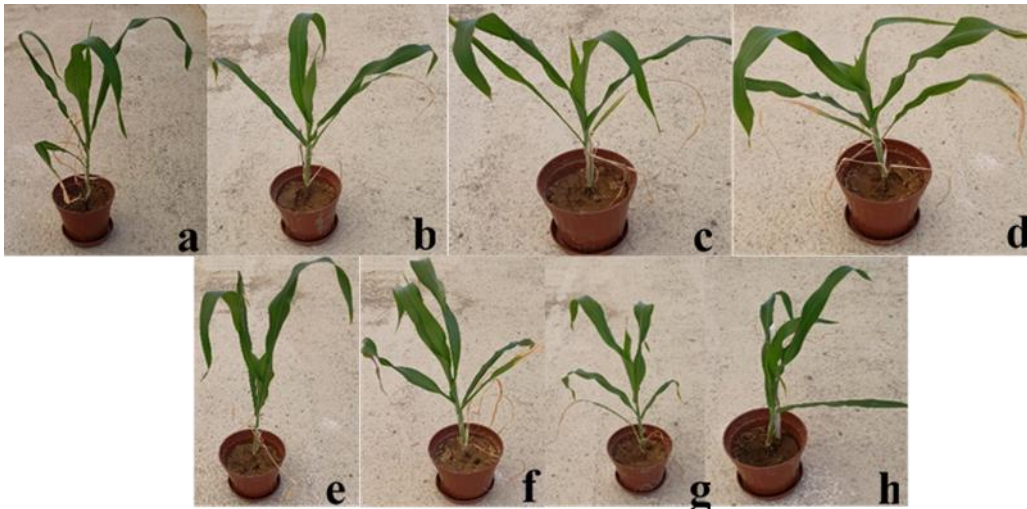
değerlendirilmiştir.

Çimlenme sonrası gelişim, her biri bireysel olarak hazırlanmış çimlenme kaplarında izlenmiştir. Tohumlar, uygun şekilde hazırlanmış torf ve perlit karışımı içeren bu kaplara ekilmiş ve kontrollü çevresel koşullar altında takip edilmiştir (Resim 3.3).

Ortam koşullarının baskılayıcı etkisi bitki gelişimlerini olumsuz etkilemesine karşın moleküler çalışmalar için yeterli örnek alınmış ve bitkiler tekrar gelişimlerini tamamen gerçekleştirebilmeleri için daha büyük saksılara dikimi gerçekleştirilerek Sivas Bilim ve Teknoloji Üniversitesine ait seraya aktarılmıştır (Resim 3.4.).



Resim 3.3. Doku kültüründe çimlenen tohumların yetiştirme kaplarına alınması



Resim 3.4. Gelişen fidelerin daha geniş saksılara alınması a) 1 EMS 2h b) 1 EMS 6h c) 2 EMS 2h d) 2 EMS 6h e) 3 EMS 6h f) 2 NaN₃ 2h g) 2 NaN₃ 4h h) Kontrol

3.8. Antioksidan ve Biyokimyasal Analizler

Biyoaktivite analizleri için yöntem (Martins ve ark. 2015) kısmen değiştirilerek kuru yaprak örnekleri toz haline getirilmiştir. Karışım, 0,1 g kuru yaprak örneğine 5 ml %70 etanol/su eklenerek karışım, 25 °C’de, 150 rpm’de, gece boyunca çalkalayıcı inkübatörde homojenize edilmiştir. Ardından 10 dakika boyunca 10000 g’de santrifüj edilmiş ve süpernatant (üst sıvı), toplam antioksidan kapasitesi (AOx), toplam fenolik madde içeriği (TPC), toplam flavonoid içeriği (TFC) ve DPPH radikal süpürme aktivitesi (inhibisyon %) analizleri için mikrosantrifüj (Eppendorf) tüplerine alınmıştır.

DPPH ile belirlenen antioksidan aktivitesi için, 100 µl bitki ekstresi ile 3900 µl 0.1 mM DPPH (Sigma, ABD) radikal çözeltisi metanol ile karıştırılmış ve ardından vortex cihazıyla karıştırılarak iyice homojenize edilmiştir. Örnekler oda sıcaklığında 30 dakika boyunca karanlık ortamda inkübe edilmiştir. Analiz için 517 nm absorbans dalga boyu kullanılmıştır. DPPH ile belirlenen antioksidan aktivitesine ait inhibisyon (%) hesaplamasında aşağıdaki denklem kullanılmıştır.

$$\% \text{ İnhibisyon} = \frac{\text{Abs}_{\text{kontrol}} - \text{Abs}_{\text{örnek}}}{\text{Abs}_{\text{kontrol}}} \times 100$$

Örneklerin toplam fenolik madde içerikleri, bazı değişikliklerle Singleton ve Rossi (1965) tarafından geliştirilen protokole göre belirlenmiştir. 2000 µl (2 ml) hacminde numune, 200 µl bitki ekstresi ve 1800 µl distile su eklenerek hazırlanmıştır. Daha sonra örneklerle, 2 ml %2 (ağırlık/hacim) sodyum karbonat çözeltisi ve 1 ml 1/10 oranında seyreltilmiş Folin-Ciocalteu reaktifi (Merck, Almanya) ilave edilmiştir. Karışım, reaksiyonun gerçekleşmesi için oda sıcaklığında ve karanlık ortamda iki saat bekletilmiştir. TPC (Toplam Fenolik Madde İçeriği) değerleri, 765 nm dalga boyunda çalışan bir spektrofotometre (UV1800 Shimadzu, Japonya) ile ölçülmüştür. Toplam fenolik içerik (mg GAE/g), daha önce oluşturulmuş olan standart gallik asit eğrisi üzerinden elde edilen denkleme göre hesaplanmıştır. Çalışma, iki paralel deney ve dört tekrar olarak gerçekleştirilmiştir.

TFC (Toplam Flavonoid İçeriği) analizi için, Zhishen ve ark. (1999) tarafından geliştirilen yöntem bazı değişikliklerle uygulanmıştır. 0.5 ml örnek, 2 ml distile su ve 150 µl %5 sodyum

nitrit (NaNO_2) ile karıştırılmıştır. Örnekler 5 dakika bekletildikten sonra, 150 μl %5 AlCl_3 (alüminyum klorür) eklenmiş ve 6 dakika daha beklenmiştir. Ardından 1 ml 1 M NaOH (sodyum hidroksit) ve 1.2 ml distile su ilave edilerek vortexlenmiş ve 510 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapılmıştır. TFC değeri, mg kateşin eşdeğeri (CE)/g kuru örnek cinsinden hesaplanmıştır.

Prolin içeriğinin belirlenmesi için, Karabal ve ark. (2003) tarafından geliştirilen protokol bazı değişikliklerle ve kuru örnekler kullanılarak uygulanmıştır. 0,1 g ağırlığında kuru örnekler, laboratuvar havanı, ezici uç ve sıvı azot kullanılarak ezilmiş ve toz haline getirilmiştir. Ardından örnekler 3 ml %3'lük sülfosalisilik asit ($\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_6\text{S}$) çözeltisi eklenmiştir. Bu karışım, oda sıcaklığında 15000 g'de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant elde edilmiştir. İki paralel çalışmada, süpernatandan 2 ml alınmış ve her birine 2 ml buzlu asetik asit, asetik asit (CH_3COOH), fosforik asit (H_3PO_4) ve ninhidrin ($\text{C}_9\text{H}_6\text{O}_4$) çözeltisi ilave edilmiştir. Tüpler, 2 saat boyunca kaynatılmış ve ardından hızlıca buzlu suya alınarak soğutulmuştur. Bu aşamada, karışıma 4 ml tolüen (metil benzen- $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$) eklenmiş ve 30 saniye vortexlenmiştir. Üst kısımda oluşan pembe fazın absorbansı, 520 nm dalga boyunda bir spektrofotometre ile ölçülmüş ve prolin içeriği, daha önce oluşturulmuş standart eğrinin denklemi kullanılarak hesaplanmıştır.

3.8. İstatiksel Analiz

Hem temel ANOVA hem de yeni bir istatistiksel model kullanarak, çimlenme süreci üzerinde hangi faktörün en büyük etkiye sahip olduğunu bulmak için çeşitli süreler boyunca farklı EMS seviyelerine maruz kalmış tohumlara bakılmıştır. Bu çalışmada verilerin analizinde iki farklı istatistiksel program kullanılmıştır. Tek yönlü ANOVA ve yanıt optimizasyonu analizleri Minitab® 21 İstatistik programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.2.).

Çizelge 3.2. Mutajen dozajı ve uygulama süresine yönelik yanıt yüzeyi analizinde kullanılan tepki yüzey metodolojisi (RSM) düzeni

Central Composite Design

Design Summary

Factors: 2 Replicates: 1
Base runs: 14 Total runs: 14
Base blocks: 2 Total blocks: 2

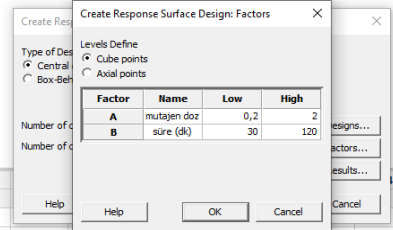
$\alpha = 1,41421$

Two-level factorial: Full factorial

Point Types

Cube points: 4
Center points in cube: 3
Axial points: 4
Center points in axial: 3

#	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7
	StdOrder	RunOrder	PtType	Blocks	mutajen dozu	süre (dk)	
1	10	1	-1	2	0,60000	11,360	
2	8	2	-1	2	0,03431	75,000	
3	12	3	0	2	0,60000	75,000	
4	11	4	-1	2	0,60000	138,640	
5	13	5	0	2	0,60000	75,000	
6	14	6	0	2	0,60000	75,000	
7	9	7	-1	2	1,16569	75,000	
8	5	8	0	1	0,60000	75,000	
9	1	9	1	1	0,20000	30,000	
10	7	10	0	1	0,60000	75,000	
11	3	11	1	1	0,20000	120,000	
12	2	12	1	1	1,00000	30,000	
13	6	13	0	1	0,60000	75,000	
14	4	14	1	1	1,00000	120,000	



Deneysel veriler, bireysel faktörlerin ve etkileşimlerinin gözlenen sonuçlar üzerindeki etkisini belirlemek için Deney Tasarımı (DOE) metodolojisi kullanılarak incelenmiştir. Konsantrasyon ve tedavi süresi gibi bağımsız faktörler ile çimlenme, morfolojik ve biyokimyasal parametreleri içeren bağımlı değişkenler arasındaki ilişkiyi ölçmek için faktöriyel regresyon analizi (FRA) gerçekleştirilmiştir. Analizde Minitab® 21 kullanılmış ve istatistiksel anlamlılık %95 güven düzeyinde ($p < 0,05$) değerlendirilmiştir. Bu yöntem hem birincil etkilerin hem de etkileşim etkilerinin keşfedilmesini kolaylaştırarak, faktörlerin deneysel sonuçlara katkılarının kapsamlı bir şekilde anlaşılmasını sağlamıştır.

3.9. Moleküler Çalışmalar

Hem işlenmiş hem de kontrol bitki örneklerine bakmak için moleküler belirteçler kullanılmıştır ve kimyasal mutajen işlemlerinin (EMS ve NaN_3) DNA düzeyindeki genetik etkilerinin ne olduğunu gösterilmiştir. *In vitro* yetiştirilen bitkilerden yaprak dokuları alındı ve bunları daha sonraki polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) testleri için genomik DNA çıkarmak için kullandık.

3.9.1. DNA izolasyonu

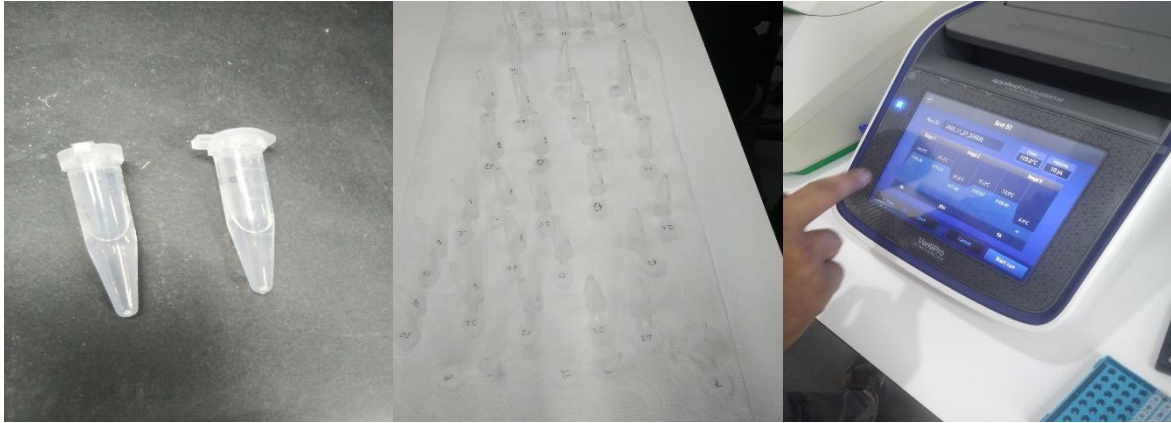
Sorghum bicolor'un genç ve sağlıklı yaprak dokularından genomik DNA elde etmek için modifiye edilmiş bir CTAB (setiltrimetilamonyum bromür) yaklaşımı kullandık. Bu yöntem, polisakkaritler ve polifenolik kimyasallar açısından zengin bitki dokularından yüksek kaliteli DNA elde etmek için çoğunlukla kullanılmaktadır.

Önceden soğutulmuş bir havan ve tokmak kullanılarak, yaklaşık 100 mg yaprak örneği sıvı nitrojende ince bir toz haline getirildi. Toz haline getirilmiş bitki dokusu, önceden ısıtılmış ve %2 CTAB (w/v), 1,4 M NaCl, 100 mM Tris-HCl (pH 8,0), 20 mM EDTA ve %0,2 β -merkaptoetanol içeren 700 μ l CTAB ekstraksiyon tamponu ile hızlıca karıştırılmıştır. β -merkaptoetanol, tampon karışımına kullanılmadan hemen önce eklenmiştir. Örnekleri 30 dakika boyunca 65 °C'de bir inkübatöre koyduk ve hücrelerin parçalanmasına ve çekirdek içeriklerinin salınmasına yardımcı olmak için ara sıra yavaşça karıştırılmıştır.

İnkübasyon süresinden sonra, her tüpe aynı miktarda (700 μ l) kloroform:izoamil alkol (24:1, v/v) konularak tüpler 5-10 dakika ters çevrilerek yavaş ama homojen olacak şekilde karıştırılmıştır. Daha sonra, oda sıcaklığında, fazları ayırmak için karışımlar 12000 rpm'de 10 dakika boyunca bir santrifüjde döndürülmüş, DNA, üst sulu fazdan dikkatlice yeni bir steril mikro santrifüj tüpüne taşınmıştır.

DNA çökelmesinin gerçekleşmesi için geri kazanılan sulu faza buz gibi soğuk izopropanol eklenerek tüpler ters çevrilmiş ve yavaşça karıştırılmıştır. 12000 rpm'de 10 dakika santrifüjleme DNA peletleri oluşturmuştur. Peleti 500 μ l %70 etanol ile durulanmış ve tekrar döndürülerek oda sıcaklığında havada kurumaya bırakılmıştır. Sonra tekrar 50 μ l TE tamponuna (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8, 0) konulmuştur.

İzole edilen DNA'nın konsantrasyonunu ve saflığını 260/280 nm ve 260/230 nm absorban oranlarında kontrol etmek için bir spektrofotometre (NanoDrop) kullanılmıştır. DNA'nın bütünlüğünü, etidyum bromür (veya SYBR Safe) ile boyanmış %1'lik bir agar jel üzerinde çalıştırarak ve UV ışığı altında inceleyerek kontrol edilmiştir. Ayrılan DNA örnekleri, SCoT ve iPBS işaretleyici analizi için ihtiyaç duyulana kadar -20 °C'de tutulmuştur (Resim 3.5).



Resim 3.5. DNA izolasyon ve PZR çalışmaları

3.9.2. DNA analizi ve moleküler işaretleyici seçimi

Deney için 10 μ l'lik bir PZR reaksiyonu hazırlamak üzere Çizelge 3.3'te verilen bileşenleri kullanıldı.

Çizelge 3.3. PZR gerçekleştirmek için kullanılan bileşikler ve miktarları

Bileşen	Hacim (μ l)	Final Konsantrasyon
Genomik DNA	2.5	~20–50 ng
10X PZR tamponu (Buffer)	1.0	1X
MgCl ₂ (25 mM)	1.0	1.5 mM
dNTP karışımı (10 mM)	1.0	0.2 mM (her nükleotid)
Primer (10 μ M)	1.5	0.4 μ M
Taq DNA Polimeraz (5 U/ μ l)	0.15	1 U
Steril distile su	2.85	—
Toplam	10.0	—

PZR gerçekleştirmek için, 2.5 μ l genomik DNA, toplam reaksiyon hacmi 10 μ l olan polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) kullanılarak çoğaltılmıştır. Reaksiyonu başlatmak için her reaksiyon tüpüne 2,5 μ l genomik DNA veya yaklaşık 20-50 ng DNA konsantrasyonu eklenmiştir. Bu hem etkili hem de seçici çoğaltma elde etmek için ideal DNA miktarı olarak bilinmektedir. Reaksiyonun son konsantrasyonu, enzim aktivitesi için uygun iyonik güç ve tamponlama kapasitesi sağlamak üzere 1,0 μ l 10X PZR tamponu eklendikten sonra 1X olmuştur. Ayrıca, Taq DNA polimerazı için gerekli bir kofaktör olan magnezyum klorürün (MgCl₂) son konsantrasyonunu sağlamak için 25 mM MgCl₂ stok çözeltisinin 1,0 μ l'si eklenmiştir.

DNA polimerazının yeni DNA zincirlerini verimli bir şekilde oluşturabilmesini garantilemek için reaksiyona 1,0 µl 10 mM dNTP karışımı eklenmiştir. Bu, dört deoksिनुकлеотид trifosfatın (dATP, dTTP, dGTP ve dCTP) her biri için 0,2 mM'lik bir son konsantrasyon sağlamaktadır; bu da yaygın PZR işlemlerinin çoğunluğu için yeterlidir. 10 µM konsantrasyonda 1,5 µl primer eklenmesi, hedef DNA bölgesinin spesifik amplifikasyonuna izin veren 0,4 µM'lik bir son primer konsantrasyonu üretmiştir. *Thermus aquaticus*, bakterisi işlem başına bir birimlik son aktivitede kullanılan termostabil enzim Taq DNA polimerazının kaynağıdır. Bunu yapmak için, her reaksiyon tüpüne 0,15 µl enzim (5 U/µl) verilmiştir.

Son olarak, reaksiyon hacmini 10 µl'ye çıkarmak için 2,85 µl steril damıtılmış su eklenmiştir. Her bir bileşenin eklenmesinin ardından, reaksiyon karışımları, içerikleri tüpün dibinde toplamak için kısa bir süre santrifüj edilmiş ve homojenliği garantilemek için hafifçe vortekslenmiştir. Daha sonra, hedef DNA dizisi için optimize edilmiş bir termal döngü yazılımı kullanılarak PZR amplifikasyonu başlatılmış ve hazırlanan reaksiyon tüpleri bir termal döngü cihazına konulmuştur. Kontaminasyonu ve bozulmayı azaltmak için tüm bileşenler steril olarak ve buz üzerinde işlenmiştir.

Çizelge 3.4. Çalışmada kullanılan iPBS primerlerinin adları, dizileri ve eşleşme (annealing) sıcaklıkları

Moleküler İşaretleyici	DNA Dizisi	Eşleşme sıcaklığı (°C)
iPBS-2074	GCTCTGATACCA	50
iPBS-2245	GAGGTGGCTCTTATACCA	50
iPBS-2382	TGTTGGCTTCCA	50
iPBS-2385	CCATTGGGTCCA	50
iPBS-2389	ACATCCTTCCCA	48

iPBS-PZR (inter-Primer Binding Site – Polimeraz Zincir Reaksiyonu), retrotranspozon bölgelerine özgü primerler kullanılarak gerçekleştirilen ve genetik çeşitliliğin belirlenmesinde etkili bir yöntemdir. Çalışmada kullanılan iPBS primerlerine ait isimler, diziler ve özgül eşleşme sıcaklıkları Çizelge 3.4.'te verilmiştir. Bu çalışmada, genetik analizlerin yürütülmesinde kullanılan iPBS-PZR protokolü, literatürde sıkça başvuru Retro50 termal döngüsüne göre optimize edilmiştir. Reaksiyonun başarılı bir şekilde gerçekleşebilmesi için PZR cihazında uygulanan sıcaklık ve süre değerleri Çizelge 3.5.'te verilmiştir.

Çizelge 3.5. iPBS-PZR için kullanılan termal döngü protokolü (Retro50)

Aşama	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
Başlangıç denatürasyonu	94	3 dakika	1
Denatürasyon	94	30 saniye	
Tavlama (Annealing)	50	1 dakika	35
Uzama	72	1 dakika	
Final uzama	72	5 dakika	1
Saklama	4	Süresiz (∞)	–

Örneklerin genetik çeşitliliğine bakmak için ilk kez Başlangıç Kodonu Hedefli (SCoT) belirteçleri kullanılmıştır. SCoT primerlerini ne kadar iyi çalıştıklarına ve ne kadar iyi çoğaldıklarına göre seçtik. Her primer için PZR reaksiyonlarını ayarlanarak ampliconları ayırmak için agar jel elektroforezi kullanılmıştır. İkili bir formatta (varlık için 1, yokluk için 0), net ve belirgin bantlar derecelendirilmiştir.



Resim 3.6. Primer ve DNA analizi çalışmaları

SCoT ve iPBS markörler

SCoT ve iPBS analizlerinde kullanılmak üzere hazırlanan örnekler, EMS ve NaN_3 mutajenlerinin farklı konsantrasyon ve uygulama sürelerine göre oluşturulmuştur. Bu örnek gruplarına ait detaylı dağılım Çizelge 3.6.'da verilmiştir.

Bu çalışmada, *Sorghum bicolor* örnekleri arasındaki genetik çeşitliliği değerlendirmek için iki tür moleküler belirteç kullanılmıştır: SCoT (Start Codon Targeted) ve iPBS (Inter-Primer Binding Site). SCoT belirteçleri, ATG başlangıç kodonunu çevreleyen kısa korunan bölgeleri hedef alarak genle ilişkili polimorfizmlerin tespitine olanak tanır. SCoT analizi için, ilgili çalışmalarda tekrarlanabilirlikleri ve net, polimorfik bantlama desenleri üretme yeteneklerine göre iki primer (SCoT1 ve SCoT4) seçilmiştir.

Çizelge 3.6. EMS ve NaN₃ mutajenleriyle farklı konsantrasyon ve sürelerde uygulanan örnek gruplarının dağılımı

Örnek no	Mutajen	Konsantrasyon (mg/L)	Süre (sa)	Örnek no	Mutajen	Konsantrasyon (mg/L)	Süre (sa)
1	EMS	1	2	28	NaN ₃	1	6
2	EMS	1	6	29	NaN ₃	2	2
3	EMS	2	2	30	EMS	1	6
4	EMS	2	6	31	EMS	1	6
5	EMS	3	6	32	EMS	1	2
6	NaN ₃	2	2	33	EMS	3	6
7	NaN ₃	2	4	34	NaN ₃	3	6
8	Kontrol	0	0	35	EMS	2	2
9	Kontrol	0	0	36	EMS	2	6
10	EMS	1	2	37	EMS	2	2
11	EMS	3	4	38	EMS	2	2
12	EMS	2	6	39	EMS	3	6
13	NaN ₃	1	4	40	NaN ₃	2	4
14	NaN ₃	2	4	41	NaN ₃	2	2
15	NaN ₃	3	4	42	EMS	2	4
16	EMS	1	4	43	EMS	2	4
17	EMS	1	4	44	EMS	2	4
18	NaN ₃	1	4	45	NaN ₃	2	4
19	NaN ₃	1	4	46	EMS	2	4
20	NaN ₃	2	4	47	Kontrol	0	0
21	NaN ₃	2	4	48	NaN ₃	3	2
22	EMS	2	4	49	NaN ₃	1	4
23	EMS	1	6	50	NaN ₃	2	4
24	EMS	1	6	51	NaN ₃	2	2
25	EMS	1	6	52	NaN ₃	2	6
26	NaN ₃	1	6	53	NaN ₃	3	4
27	NaN ₃	1	6	54	NaN ₃	3	6

NaN₃: Sodyum azid EMS: Etil metan sülfonat

iPBS analizinde beş primer kullanılmıştır: 2074, 2245, 2382, 2385 ve 2389. Bu primerler, retrotranspozon uzun terminal tekrarlarında (LTR'ler) bulunan korunan dizilere dayanmaktadır ve özellikle insersiyonel polimorfizmleri tespit etmek için faydalıdır. Seçilen iPBS primerleri yüksek ayırım gücü, tekrarlanabilirlik ve çeşitli bant profilleri üretme kapasiteleri nedeniyle seçilmiştir. Mümkün olan en iyi koşullar altında, PZR amplifikasyonu

yapılmış ve bantlama desenlerini kaydetmek için jel elektroforezi ve UV aydınlatması kullanılmıştır. (Resim 3.6).

3.10. Yapay Zekâ Analizleri

Makine öğrenmesi (ML) analizi için, veri doğrulama ve tahmin amacıyla karar ağacı tabanlı Random Forest (RF) ve Light Gradient Boosting Machines (LightGBM) algoritmaları kullanılmıştır. Random Forest modeli, çoklu karar ağaçlarının eş zamanlı olarak eğitilmesine dayanır (Aggarwal, 2018) ve bu süreç bagging (bootstrap birleştirme) yöntemiyle gerçekleştirilir (Pavlov, 2019). Bu yöntem aşağıda sunulmuştur.

$$y = \sum_{i=1}^n (\alpha_i - \alpha_i^*) k(x, x_i) + b$$

y = veri noktasının değeri; n = örnek büyüklüğü (sayısı)

Buna karşılık olarak, Light Gradient Boosting Machine (LightGBM), Microsoft tarafından geliştirilen ve gradyan artırma algoritmasına dayanan bir yöntemdir. Modelin avantajı, öğrenme süreci algoritmaları üzerinde ayarlamalar yapabilme yeteneğine sahip olmasıdır ve bu da modelin hızlı bir şekilde işlem yapmasına olanak tanır (Ke ve ark., 2017).

Veri seti ikiye bölünerek modellerin performansını değerlendirmek amacıyla, leave-one-out cross-validation (LOO-CV) yöntemi (Webb ve ark., 2011) kullanılmıştır. LOO-CV tekniğinde, veri集中的 örnek sayısı kadar kat (fold) oluşturulur ve her tekrar edilen işlemde bir örnek test verisi olarak ayrılırken, kalan örnekler öğrenme süreci için kullanılır. Bu yöntem, öğrenme sürecinde her bir örneğin sırasıyla test edilmesini ve kalanların eğitim için kullanılmasını sağlar. Yöntem, özellikle küçük örneklem (veri) boyutuna sahip çalışmalar için oldukça uygundur, çünkü her tekrarda daha fazla eğitim verisi kullanılmasını sağlar ve bu sayede modelin veriyi daha iyi öğrenmesine olanak tanır. En iyi modelin belirlenmesi için en uygun hiperparametrelerin bulunmasında grid search (ızgara arama) yöntemi kullanılmıştır. Kodlama sürecinde, Sklearn paketi (Pedregosa ve ark., 2011) ve açık kaynaklı Python programlama dili (Van Rossum ve Drake, 2009) kullanılmıştır. Modellerin

performansı, dört farklı performans ölçütü yardımıyla değerlendirilmiştir. Burada Y_i gözlenen (gerçek) değeri, $\hat{Y}_i$ model tarafından tahmin edilen değeri, n gözlem sayısını ifade etmektedir.

Determinasyon katsayısı (R^2), regresyon modelinin tahmin gücünü gösterir ve değeri 0 ile 1 arasında değişir. R^2 skorunun yüksek olması, modelin daha iyi bir tahmin performansına sahip olduğunu ifade eder. R^2 değerinin 1'e eşit veya 1'e çok yakın olması, bağımsız değişkenler ile bağımlı değişken arasındaki ilişkinin güçlü olduğunu gösterir.

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (Y_i - \hat{Y}_i)^2}{\sum_{i=1}^n (Y_i - \bar{Y})^2}$$

Root Mean Square Error (RMSE), bir modelin tahminlerinin doğruluğunu değerlendirmek için kullanılır ve tahmin edilen değerlerle gözlenen (gerçek) değerler arasındaki farklar esas alınarak hesaplanır. RMSE değeri ne kadar düşükse, modelin tahmin performansı o kadar yüksek kabul edilir; buna karşılık yüksek RMSE değerleri, zayıf bir tahmin başarısını gösterir.

$$RMSE = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (Y_i - \hat{Y}_i)^2}$$

Mean Absolute Error (MAE), tahmin edilen değerlerle gözlenen (gerçek) değerler arasındaki hataların ortalama büyüklüğünü nicel olarak ifade eder. RMSE'ye benzer şekilde, MAE değerinin düşük olması, modelin daha iyi bir tahmin performansına sahip olduğunu gösterir. Ancak en iyi modelin belirlenmesinde daha kapsamlı bir değerlendirme için üç performans metriğinin (R^2 , RMSE ve MAE) birlikte kullanılması önerilmektedir.

$$MAE = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n |Y_i - \hat{Y}_i|$$

Mean Absolute Percentage Error (MAPE), tahmin doğruluğunu değerlendirmek için kullanılan bir ölçüttür ve sonuçlar yüzde (%) cinsinden ifade edilir. MAPE değerinin yüksek olması, modelin hata oranının yüksek olduğunu; düşük olması ise daha doğru tahminler yapıldığını gösterir.

$$MAPE = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \left| \frac{Y_i - \hat{Y}_i}{Y_i} \right| \times 100$$

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

Araştırmada ilk önce sterilizasyon ve çimlenme optimizasyonları belirlenmiş *Sorghum bicolor* L. Tohumları 1, 2 ve 3 mg/L'lik konsantrasyonlarda 2, 4 ve 6 saatlik sürelerde iki farklı mutajen olan EMS ve NaN₃ mutajenlerine maruz bırakılmıştır. Deneme sonucunda elde edilen bitkilerin çimlenme durumlarına bakılmış daha sonrasında ise mutajeniteyi tespit etmek için moleküler işaretleyiciler kullanılmıştır.

4.1. Sterilizasyon Optimizasyon Sonuçları

Bu çalışmada, altı farklı *S. bicolor* genotipine ait tohumların *in vitro* yüzey sterilizasyonu optimize edilmiştir. Sterilizasyon sürecinde tohumlar önce %70 etanol ile 5 dakika süreyle muamele edilmiş, ardından %0,1 HgCl₂ çözeltisine 45 dakika daldırılmış ve her iki işlem sonrası saf distile su ile durulanmıştır. Deneysel tasarımda, Murashige ve Skoog (MS) besiyeri hem fungusit içeren (10 mg/L Bion MX 44 WG) hem de içermeyen koşullarda kullanılmıştır.

Sonuçlar, %70 etanol (5 dakika) ve %0,1 HgCl₂ (45 dakika) karışımına Bion fungusitinin eklenmesinin tüm kültürlerde kontaminasyonu önemli ölçüde azalttığını göstermiştir (Çizelge 4.1). En fazla azalma %11,67'den %1,67'ye düşerek C1 (Gustav)'de görülmüştür. Ancak, fungusitin birkaç kültürde ise çimlenmeyi yavaşlattığı da fark edildi. Fungisit olmadan dört gün yetiştirilen C4 (Vegga) kültürü en iyi çimlenmeyi üretti (%75'e kadar). Bu, kontaminasyonu kontrol etmek ve tohumların hızla çimlenmesini sağlamak arasında bir denge olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.1. Sterilizasyon sonrası her bir çeşide ait çimlenme oranı

Genotip		Ortalama (%)	Standart Sapma	%95 Güvenirlilik
C1	Gustav	55,62ab	19,25	(42,22; 69,03)
C2	Esthypan	43,75ab	20,05	(30,35; 57,15)
C3	Foehn	33,54ab	16,58	(20,14; 46,94)
C4	Vegga	60,63a	17,93	(47,22; 74,03)
C5	Danelik aday	37,92ab	19,39	(24,52; 51,32)
C6	Beydarı	31,04b	19,27	(17,64; 44,44)
<i>p</i> – değeri			0,013	

Bu sterilizasyon yöntemi çok iyi çalıştığı görülmektedir ve farklı genotiplerdeki sorgum tohumlarında kullanılabilirliğini test edilmiştir. Araştırmacılara mutajenezi ve DNA tabanlı moleküler belirteç çalışmaları gibi sonraki deneyler için temiz ve uygulanabilir bir başlangıç noktası sağlayabileceğini düşünüyoruz. Çimlenme performansı ayrıca antibakteriyel etkinlik ve eksplant yaşayabilirliği arasında doğru dengeyi bulmak için sterilizasyon tekniklerinde değişiklikler yapmanın ne kadar önemli olduğunu da göstermektedir.

4.2. Kimyasal Mutajen Uygulaması ve Çimlenme Sonuçları

Bu çalışmada, kimyasal mutajenler olarak EMS (etil metan sülfonat) ve NaN_3 (sodyum azid) kullanılarak *S. bicolor* tohumlarında çimlenme üzerine etkileri değerlendirilmiştir. Her iki mutajen için farklı sürelerde (2, 4 ve 6 saat) uygulamalar yapılmış ve 7. gün sonunda elde edilen çimlenme verileri karşılaştırmalı olarak analiz edilmiştir.

İkinci bir yaklaşım olarak, trietilen tetramin (TETA) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) kullanılmıştır. Bu bileşiklerin, oksidatif stresi azaltma, antioksidan sistemleri aktive etme ve fizyolojik dayanıklılığı artırma gibi etkileri literatürde bilinmektedir. Priming (ön işlem) uygulamalarının ardından, tohumlar üzerinde toplam antioksidan kapasitesi (AOx), toplam fenolik madde içeriği (TPC) ve toplam flavonoid içeriği (TFC) gibi biyokimyasal analizler gerçekleştirilmiştir.

4.2.1. EMS uygulaması

Farklı etil metan sülfonat (EMS) konsantrasyonlarının ve farklı maruz kalma sürelerinin *S. bicolor* tohumlarının çimlenme oranları üzerindeki etkileri Çizelge 4.2'de gösterilmiştir. Herhangi bir EMS uygulaması olmayan kontrol grubu (0 EMS, 0 saat), ortalama %55,0 çimlenme oranı gözlenmiştir. Bu oran, EMS'nin farklı durumlarda mutajenezi nasıl etkilediğini anlamak için bir başlangıç noktası olarak kullanılmıştır. 1 mg/L EMS uygulamasında Ortalama çimlenme oranı, 2 saatlik (%50,0) ve 4 saatlik (%45,0) uygulamalarda kontrol grubuna göre düştüğü gözlenmiştir. Bu da daha uzun süreli maruziyetin engelleyici etkilere sahip olabileceğini göstermektedir. Bununla birlikte 6 saatlik EMS uygulaması, düşük bir standart sapma (SS: 5,77) ile tüm tedavilerin en yüksek çimlenme oranına (%65,00) yol açtığı gözlenmiştir. Kontrole göre istatistiksel olarak

anlamlı bir iyileşme olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlar, kısa bir süre düşük EMS seviyelerine maruz kalmanın çimlenmeyi biraz yavaşlatabileceğini, ancak daha uzun süre (6 saat) maruz kalmanın çimlenmeye yardımcı olan mutasyonlara veya hazırlama etkilerine neden olabileceğini göstermektedir.

Çizelge 4.2. EMS konsantrasyonu ve uygulama süresine göre çimlenme oranları

EMS (mg/L)	Süre (saat)	Ortalama (%)	Standart Sapma	%95 Güven Aralığı
0	0	55,00ab	5.77	45,81; 64,19
1	2	50,00ab	11.55	31,63; 68,37
1	4	45,00ab	10.00	32,09; 57,91
1	6	65,00a	5.77	55,81; 74,19
2	2	55,00ab	5.77	45,81; 64,19
2	4	52,50ab	5.00	40,55; 60,45
2	6	55,00ab	5.77	45,81; 64,19
3	2	62,50a	5.00	54,55; 70,45
3	4	62,50a	5.00	54,55; 70,45
3	6	62,50a	5.00	54,55; 70,45

Diğer bir EMS (2 mg/L) uygulamasında İki saatlik maruziyetten sonra, yüksek güven aralığının (45,81-64,19) gösterdiği gibi, çok az varyasyon olmakla birlikte (SS: 5,77) çimlenme oranı tekrar yükselmiştir (ortalama: %55,0). Bu durum, uygulamalar arasında yanıtların birbirlerine yakın olabileceğini göstermiştir. 4 saatlik uygulama ortalama %52,5 çimlenme ile kontrol grubundan düşük göstermekle birlikte 6 saatlik uygulama sonrası ortalama bir çimlenme oranı (%55) görülmüştür.

Maksimum EMS konsantrasyon (3 mg/L) seviyesinde; 2 saatlik uygulama oldukça yüksek bir çimlenme oranına neden olmuştur (ortalama: %62,5) ve daha geniş dar bir aralıkta gerçekleşmiştir. (SS: 5,00, GA: %54,55-70,45). Çimlenme oranı 4 saat sonrada aynı ortalama ve standart sapma oluşmuştur. (%62,5). Altı saatlik maruziyet yine bildirilen en yüksek çimlenme oranını (%62,5) sahiptir. Bu durum altı saatlik 1 mg/L EMS'den biraz daha düşüktür. Ancak çok fazla varyasyon yoktu (SS: 5,00) ve güven aralığı (%54,55-70,45) olarak gerçekleşmiştir. Bu durumda yanıtın istikrarlı ve güvenilir olduğu anlamına gelmektedir.

Bu sonuçlar, daha uzun süreler boyunca daha yüksek dozda mutajen verilmesinin strese dayanıklı fenotiplerin gelişmesine veya olumlu genetik tepkilerin ortaya çıkmasına neden olabileceği anlamına gelmektedir. Daha yüksek konsantrasyonlarda daha kısa süreler, mutajenin iyi nüfuz etmemesi nedeniyle hafif çimlenmeye yol açma eğiliminde olabileceği düşünülmektedir. Bununla birlikte bu sonuçlar EMS konsantrasyonunun çimlenmeyi etkileyen tek şey olmadığını; maruz kalma süresinin uzunluğunun da bir etkisi olduğunu göstermektedir. EMS'nin mutajenik etkisi zamanla değişir ve bazı kombinasyonlar, mutasyonların neden olduğu onarım süreçlerini başlatarak veya aktive ederek, çimlenmeyi durdurmak yerine çimlenmeye yardımcı olabilir.

4.2.2 NaN₃ uygulaması

Sodyum azid (NaN₃) maruz kalmanın değişen miktarlarının ve sürelerinin *S. bicolor* tohumlarının çimlenme oranlarını nasıl etkilediğine dair tüm bilgileri Çizelge 4.3'te gösterilmektedir. İşlem görmemiş kontrol grubu (0 NaN₃, 0 saat) %57,5 ortalama çimlenme oranına sahiptir. Bu oran, diğer tüm işlem koşulları için referans noktası kabul edilmiştir.

Çizelge 4.3. NaN₃ konsantrasyonu ve uygulama süresine göre çimlenme oranları

NaN ₃ (mg/L)	Süre (saat)	Ortalama (%)	Standart Sapma	%95 Güven Aralığı
0	0	57,5ab	9,57	43,12; 61,88
1	2	50,0ab	11,55	38,68; 61,32
1	4	45,0b	10,00	35,20; 54,80
1	6	62,5a	9,54	53,12; 71,88
2	2	55,0ab	26,46	29,07; 80,93
2	4	45,0b	17,32	28,03; 61,97
2	6	50,0ab	8,16	41,00; 58,00
3	2	60,0a	8,16	51,00; 68,00
3	4	55,0ab	17,32	38,02; 71,97
3	6	62,5a	5,00	57,60; 68,40

En düşük NaN₃ konsantrasyonu olarak (1 mg/L) belirlenen konsantrasyonda, İki saat sonra ortalama çimlenme oranı %50,0 olmuştur. 4 saatlik işlem çimlenmeyi daha da düşürmüştü (ortalama: %45,0) ve 6 saatlik maruziyet bu konsantrasyon grubunda en yüksek çimlenme oranına (%62,5) yol açtığı görülmüştür. Bu, uzun süre 1 mg/L NaN₃ konsantrasyonunun,

mutasyona neden olma potansiyeli olsa bile tohumların çimlenmesine yardımcı olan pozitif fizyolojik veya moleküler reaksiyonlara neden olabileceğini göstermektedir.

NaN_3 konsantrasyonu 2 mg/L'ye çıkarıldığında, İki saat sonra çimlenme oranı orta düzeyde görülmüş (ortalama: %55,0), ancak %29,07-80,93'lük geniş güven aralığıyla gösterildiği gibi çok fazla değişiklik gözlenmiştir (SS: 26,46). Bu da tohumların tutarlı bir şekilde yanıt vermediği anlamına gelmektedir. 4 saatlik bir maruziyet, çimlenmede belirgin bir düşüşe neden olmuştur (ortalama: %45,0). 6 saatlik işlem çimlenme performansını küçük bir miktarda iyileştirdiği görülmekle birlikte (ortalama: %50,0) sonuçlar daha tutarlı (SS: 8,16) ve daha dar bir güven aralığına sahiptir (41,00-58,00). Bu veriler, 2 mg/L NaN_3 'nin bir eşik etkisine sahip olduğunu göstermektedir. Bu, kısa süreli maruziyetin sorun teşkil etmeyebileceği, ancak uzun süreli maruziyetin, tohumun ne kadar dayanabileceğine bağlı olarak, rastgele yararlı etkilere veya sitotoksik hasara neden olabileceği anlamına gelmektedir.

En yoğun seviyede 3 mg/L NaN_3 uygulaması; 2 saatlik maruziyetten sonra nispeten yüksek bir çimlenme oranı (ortalama: %60,0) ve minimum değişkenlik (SS: 8,16) gözlenmiştir. Çimlenme dört saat sonra biraz daha düşmüş (ortalama: %55,0) ve güven aralığı daha geniş olmuştur (38,02-71,97). Bu da tekrarların daha yayılmış olduğunu göstermektedir. 6 saatlik maruziyet, 1 mg/L grubunda olduğu gibi, tüm işlemler arasında en yüksek çimlenme oranına (%62,5) ve en düşük standart sapmaya (5,00) sahip olmuştur. Güven aralığı da oldukça dardır (57,60-68,40), bu da sonuçların tutarlı olduğunu ve tekrarlanabileceğini göstermektedir.

Veriler, sodyum azidin tohum çimlenmesi üzerindeki etkisinin sadece konsantrasyona bağlı olmadığını, aynı zamanda maruz kalma süresinin birlikte çalıştığı duruma bağlı olduğunu göstermiştir. En yüksek ve en istikrarlı çimlenme oranları (%62,5), 6 saatlik maruziyetten sonra 1 ve 3 mg/L konsantrasyonlarda görülmüştür. Birkaç durumda, bu oranlar kontrolden bile daha yüksekti. Öte yandan, 4 saatlik maruziyet genellikle tüm dozlarda daha düşük çimlenme oranlarına yol açmıştır. Bunun nedeni, bitkilerin öldürücü olmayan toksisite seviyelerine maruz kalması veya çimlenmeyi yavaşlatabilen stres tepkilerinin aktive olması olabileceği düşünülmektedir. Bazı işlemlerin (örneğin 2 saat boyunca 2 mg/L NaN_3) çok fazla değişkenliğe sahip olması, tohumların farklı tepki verdiğini, belki de farklı genlere veya gövdelere sahip oldukları veya mutajenin eşit şekilde alınmadığı için olduğunu

göstermektedir. Bu veriler, NaN_3 'nin muhtemelen antioksidan savunmaları baskılayarak veya aktive ederek çimlenmeye dahil olan yolları aktive eden düşük ila orta stres seviyelerine neden olduğu bir etkiyi göstermiştir.

EMS uygulamalarında çimlenme üzerindeki baskı daha belirgin olurken, NaN_3 ile yapılan uygulamalarda daha tutarlı ve yüksek çimlenme değerleri elde edilmiştir. Bu bulgular doğrultusunda, gelecekte yapılacak mutajenez çalışmalarında hem mutajen tipi hem de uygulama süresi dikkatle optimize edilmelidir. Özellikle 3 mg/L NaN_3 ve 6 saatlik uygulama, bu çalışma kapsamında optimum sonuç veren kombinasyon olarak değerlendirilebilir.

4.3 *In vitro* Koşullarda EMS'nin Çimlenme İndekslerine Etkileri

Çimlenme endeksleri (Çizelge 4.4) veya çimlenme indeksi, çimlenme süreci hakkında bilgi edinmek için farklı istatistiksel veya matematiksel yöntemler kullanılan analizler olarak bilinmektedir (Yang ve ark., 2021).

Çizelge 4.4. Yaygın kullanılan çimlenme indeksleri

Kısaltma	Açılımı (EN)	Açılımı (TR)	Açıklama
mgt	Mean Germination Time	Ortalama Çimlenme Süresi	Tohumların çimlenmesi için geçen ortalama süredir. Düşük olması hızlı çimlenmeyi gösterir.
grp	Germination Rate Percentage	Çimlenme Oranı (%)	Belirli bir süre sonunda çimlenen tohum yüzdesidir.
gsp	Germination Speed	Çimlenme Hızı	Tohumların ne kadar hızlı çimlendiğini gösterir.
mgr	Mean Germination Rate	Ortalama Çimlenme Hızı	Belirli bir süre içinde tohumların ortalama çimlenme hızını ifade eder. GRP'nin zamana bölünmesiyle hesaplanır.
sdg	Speed of Daily Germination	Günlük Çimlenme Hızı	Gün başına düşen çimlenme miktarını gösterir. Genellikle toplam çimlenme sayısının çimlenme süresine oranı ile hesaplanır.
cvg	Coefficient of Velocity of Germination	Çimlenme Hız Katsayısı	Çimlenme hızının yüzdelerle ifadesidir. Daha yüksek CVG, daha hızlı çimlenme anlamına gelir. Çimlenme hızındaki değişimi gösterir.
vgt	Vigour Index	Canlılık İndeksi	Tohumun çevresel stres altında çimlenme ve fide oluşturma kapasitesini gösterir.
unc	Uncertainty Index	Çimlenme Belirsizliği İndeksi	Çimlenmenin ne kadar düzensiz gerçekleştiğini gösterir. Düşük olması tercih edilir.
syn	Synchronization Index	Senkronizasyon İndeksi	Tohumların aynı anda çimlenme derecesini gösterir. Yüksek olması tercih edilir.

Bu yöntemler, bir tohumun farklı durumlarda ne kadar canlı, düzgün, hızlı ve güçlü olduğunu bulmak için çok yararlıdır. Bu, onları stres altında tohum performansının daha güvenilir göstergeleri haline getirir (Aasim ve ark., 2024). Araştırmacılar, çoğunlukla yaşlanma, kirlilik, kuraklık ve tuz stresi gibi çeşitli stres faktörlerine maruz kaldıklarında tohumların nasıl çimlendiğini incelemek için bu indeksleri kullanmışlardır (Aasim ve ark., 2023). Bu nedenle, bu indeksler çok yararlıdır ve daha derin bir içgörü sağlayan ve tohum seçimi, yetiştirme ve çevresel izleme konusunda yardımcı olan hassas, çok faktörlü ölçümler olarak hizmet eder (Ranal ve ark., 2006; Teixeira ve ark., 2021).

ANOVA ve yeni bir istatistiksel model kullanarak, çimlenme süreci üzerinde hangi faktörün en büyük etkiye sahip olduğunu bulmak için çeşitli süreler boyunca farklı EMS seviyelerine maruz kalmış tohumlara bakılmıştır. Çizelge 4.5., çimlenme indekslerine aitt varyans analizi sonuçlarını göstermektedir.

Çimlenme indeksi verilerine göre, tohumların 6 saat boyunca 1 mg/L EMS ile muamele edildiğinde en yüksek çimlenme oranının gözlemlendiğini göstermiştir. Tohumların 2 saat boyunca 1 mg/L EMS ile muamele edilmesinin optimum olduğu, en düşük ortalama çimlenme süresini (mgt), belirsizlik katsayısını (unc) ve canlılık testini (vgt) sağladığı ve ayrıca yüksek çimlenme hızı yüzdesi (gsp) verdiği belirlenmiştir. Tohumların 2, 4 ve 6 saat boyunca 3 mg/L EMS ile muamele edilmesi %62,50'lik nispeten yüksek bir grp puanı üretmiştir. Bunun aksine, diğer parametreler için değerler yakından hizalanmış olup mgt için 3,88-4,79, gsp için 1,42-1,48, unc için 1,42-1,48, syn için 0,29-0,32 ve 57,86-60,49 olarak kaydedilmiştir. Genel olarak, 4 saat boyunca 3 mg/L EMS içeren tohum uygulaması en uygun yöntemdi. Çimlenme indeksine göre, en az etkili kombinasyon, 6 saat boyunca 3 mg/L EMS içeren tohum uygulaması olarak kaydedilmiştir.

Çizelge 4.5. Sorgumun çimlenme indekslerine ait varyans analizi (ANOVA) sonuçları

EMS (mg/L)	Süre (sa)	Ort	St.Sap.	Ort	St.Sap.	Ort	St.Sap.
		grp**		Mgt ^{ös}		Gsp ^{ös}	
0	0	55,00ab	5,77	4,133	0,625	0,246	0,039
1	2	50,00ab	11,55	3,625	0,725	0,283	0,050
1	4	45,00ab	10,00	4,625	0,854	0,222	0,045
1	6	65,00a	5,77	4,345	0,901	0,239	0,062
2	2	55,00ab	5,77	4,183	1,243	0,258	0,086
2	4	52,50ab	5,00	4,750	0,526	0,212	0,025
2	6	55,00ab	5,77	4,167	0,467	0,242	0,027
3	2	62,50a	5,00	3,929	0,992	0,268	0,076
3	4	62,50a	5,00	3,881	0,887	0,268	0,062
3	6	62,50a	5,00	4,786	0,362	0,209	0,016
EMS (mg/L)	Süre (sa)	Mgr ^{ös}		Unc ^{ös}		Syn ^{ös}	
0	0	24,64	3,96	1,639	0,338	0,216	0,145
1	2	28,33	5,02	1,172	0,358	0,350	0,159
1	4	22,24	4,53	1,605	0,209	0,158	0,016
1	6	23,98	6,25	1,678	0,454	0,216	0,124
2	2	25,81	8,67	1,366	0,417	0,316	0,159
2	4	21,27	2,57	1,683	0,280	0,183	0,088
2	6	24,23	2,79	1,522	0,221	0,250	0,100
3	2	26,88	7,63	1,466	0,601	0,317	0,252
3	4	26,82	6,24	1,424	0,332	0,290	0,097
3	6	20,98	1,62	1,483	0,480	0,297	0,160
EMS (mg/L)	Süre (sa)	Vgt ^{ös}		Sdg ^{ös}		Cvg ^{ös}	
0	0	6,36	2,12	2,495	0,429	60,25	2,58
1	2	5,15	1,42	2,254	0,302	62,75	3,84
1	4	8,07	2,48	2,814	0,448	61,09	2,21
1	6	6,83	2,57	2,569	0,560	58,99	1,54
2	2	6,80	3,42	2,530	0,728	60,58	3,51
2	4	8,08	1,43	2,835	0,263	59,77	1,41
2	6	6,07	1,32	2,454	0,270	58,91	1,45
3	2	5,72	2,58	2,343	0,559	59,89	2,50
3	4	5,87	2,62	2,372	0,568	60,94	2,97
3	6	7,66	0,90	2,765	0,164	57,86	2,23

Ort: ortalama, St.Sap: standart sapma, grp: çimlenme oranı, mgt: ortalama çimlenme süresi, gsp: çimlenme hızı, mgr: ortalama çimlenme hızı, unc: çimlenme belirsizliği indeksi, syn: sekrenizasyon indeksi, vgt: canlılık indeksi, sdg: günlük çimlenme hızı, cvg: çimlenme hız katsayısı ös: önemsiz

Taguchi tasarımı (TD), birçok faktörü S/N (sinyal/gürültü) oranına göre sıralayarak iyileştirmek için kullanışlı bir istatistiksel araçtır. Bu yaklaşım, araştırmacıların dış etkilerin çimlenme deneylerini nasıl etkilediğine bakmalarını sağlar (Awty-Carroll ve ark., 2021; Francis ve ark., 2024). TD modeli ayrıca en önemli unsurları bulmak için duyarlılık analizini

de içerir (Zaluski ve ark., 2022). Çizelge 4.6. ve Şekil 4.1., TD analizinin bulgularını göstermektedir. Grp söz konusu olduğunda, EMS 1,75'lik bir delta puanı ile en iyi faktör olmuştur, zaman ise 1,29'luk bir delta puanı ile takip etmiştir. S/N oranı puanı EMS için 34,11–35,86 ve uygulama süresi için 34,29–35,58 aralığında ölçülmüştür. Mgt sonuçları hem EMS konsantrasyonu hem de uygulama süresi için negatif bir S/N oranı göstermiştir; EMS için -12,40 ile -12,91 ve tedavi süresi için -12,04 ile -12,98 arasında değerler kaydedilmiştir. Delta puanı tedavi süresini birinci, EMS'yi ikinci sıraya koydu. Gsp için S/N oranı skoru EMS için 27,06 ile 27,60 arasında ve tedavi süresi için 27,02 ile 27,96 arasındaydı. Delta puanı mgt skoruyla aynı örüntüyü izledi ve tedavi süresi EMS'den daha önemliydi. mgt gibi mgr da negatif bir S/N oranı skoruna sahipti ve EMS-12,40 ile -12,91 arasında ve tedavi süresi -12,04 ile -12,98 arasındaydı.

Delta puanı, tedavi süresi ve EMS'nin en iyi ve ikinci en iyi olduğunu göstermiştir. Genel bulgular S/N oranı için de kötüydü; EMS skorları -3,611 ile -4,426 arasında ve tedavi süresi skorları -2,838 ile -4,426 arasında değişiyordu. S/N oranının delta puanı, zamanın EMS'den daha önemli olduğunu göstermiştir. Syn'nin S/N oranı da aynı şekilde negatifti; EMS için -13,43 ile -17,41 arasında ve tedavi süresi için -13,80 ile -17,41 arasında değişiyordu; EMS önde geliyordu. Vgt'nin S/N oranı, tedavi süresinin EMS'ye (0,74) kıyasla anlamlı bir delta puanı (1,67) sahip olduğunu göstermiştir. Öte yandan, S/N oranı da aynı derecede kötüydü; EMS -16,49 ile -17,16 arasında ve tedavi süresi -15,88 ile 16,90 arasında değişiyordu. Cvg metriği için S/N oranı EMS için -35,50 ile -35,70 ve tedavi süresi için -35,36 ile -35,72 idi. Zaman için delta skoru EMS'den (0,20) daha yüksekti (0,37).

Delta puanı, tedavi süresi ve EMS'nin sırasıyla birinci ve ikinci olduğunu göstermiştir. UNC (çimlenme belirsizliği) indeksi için S/N oranı negatif bulunmuş olup; EMS skorları -3,611 ile -4,426 arasında ve tedavi süresi skorları -2,838 ile -4,426 arasında değişmiştir. S/N oranının delta puanı, Uygulama süresinin EMS konsantrasyonundan daha önemli olduğunu göstermiştir. Syn'nin S/N oranı da aynı şekilde negatif bulunmuştur; EMS için -13,43 ile -17,41 arasında ve tedavi süresi için -13,80 ile -17,41 arasında değişiyordu; EMS önde geliyordu. Vgt'nin S/N oranı, uygulama süresinin EMS'ye (0,74) kıyasla anlamlı bir delta skoruna (1,67) sahip olduğunu göstermiştir. Öte yandan, S/N oranı da aynı negatif olarak; EMS -16,49 ile -17,16 arasında ve tedavi süresi -15,88 ile 16,90 arasında değişiyordu. Cvg

metriği için S/N oranı EMS için -35,50 ila -35,70 ve tedavi süresi için -35,36 ila -35,72 idi. Zaman için delta puanı EMS'den (0,20) daha yüksek olmuştur (0,37).

Çizelge 4.6: Sorgumda çimlenme indeksleri için taguchi yöntemine göre sinyal/gürültü S/N oranı sonuçları

	grp		mgt		gsp	
Düzy	EMS (%)	Süre (sa)	EMS (%)	Süre (sa)	EMS (%)	Süre (sa)
1	34,70	34,70	-12,40	-12,40	27,60	27,60
2	34,11	34,67	-12,54	-12,04	27,46	27,96
3	34,57	34,29	-12,91	-12,98	27,09	27,02
4	35,86	35,58	-12,55	-12,98	27,45	27,02
Delta	1,75	1,29	0,51	0,95	0,51	0,95
Rank	1	2	2	1	2	1
	mgr		unc		syn	
Düzy	EMS (%)	Süre (sa)	EMS (%)	Süre (sa)	EMS (%)	Süre (sa)
1	-12,40	-12,40	-4,426	-4,426	-17,41	-17,41
2	-12,54	-12,04	-3,521	-2,838	-14,40	-13,80
3	-12,91	-12,98	-3,777	-4,006	-14,91	-14,87
4	-12,55	-12,98	-3,611	-4,064	-13,43	-14,08
Delta	0,51	0,95	0,905	1,588	3,98	3,61
Rank	2	1	2	1	1	2
	vgt		sdg		cvg	
Düzy	EMS (%)	Süre (sa)	EMS (%)	Süre (sa)	EMS (%)	Süre (sa)
1	-16,42	-16,42	7,638	7,638	-35,61	-35,61
2	-16,68	-15,88	7,722	6,893	-35,70	-35,72
3	-17,16	-17,55	7,875	8,171	-35,53	-35,65
4	-16,49	-16,90	7,476	8,009	-35,50	-35,36
Delta	0,74	1,67	0,399	1,278	0,20	0,37
Rank	2	1	2	1	2	1

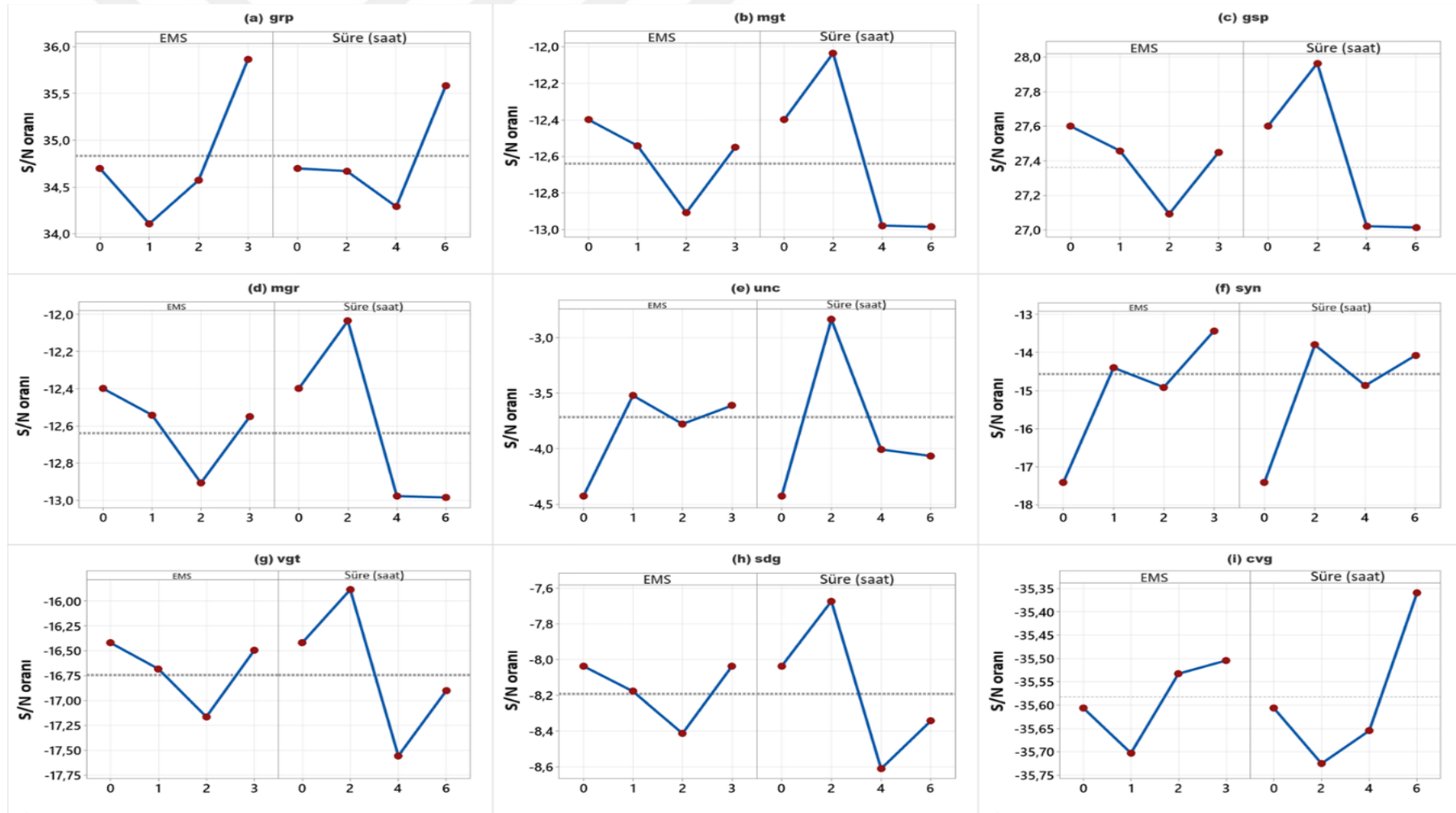
EMS: Düzy 1:0, Düzy 2= 1 mg/L EMS, Düzy 3= 2 mg/L EMS, Düzy 3= 3 mg/L EMS; Süre: Düzy 1 = 0 sa, Düzy 2 = 2 sa, Düzy 3 = 4sa, Düzy 4 = 6 sa, Ort: ortalama, St.Sap: standart sapma, grp: çimlenme oranı, ortalama çimlenme süresi, gsp: çimlenme hızı, mgr: ortalama çimlenme hızı, unc: çimlenme belirsiliği indeksi, syn: senkronizasyon indeksi, ös: önemsiz

TD çalışması bize EMS konsantrasyonunun ve onu uygulama süresinin temel çimlenme metriklerini nasıl etkilediğine bakmamız için güçlü bir yol sağlamıştır. Sonuçlar, özellik-spesifik baskınlığın mevcut olduğunu ve EMS'nin grp ve syn endeksleri için daha önemli olduğunu göstermiştir. Diğer taraftan, mgt, mgr ve unc gibi zamana dayalı ölçümler için uygulama süresi daha önemli olduğu belirlenmiştir. Bu modeller, parametrelerin biyolojik doğallığını göstermektedir. Çünkü EMS çimlenme sürecini kontrol eden genetik ve

fizyolojik değişiklikleri kontrol etmektedir (Bagheri ve ark., 2016; Habib ve ark., 2021). Öte yandan, uygulama süresi bu biyolojik bileşenlerin derinliğini ve uzunluğunu değiştirir. Veriler, özelliklerin çoğunun negatif S/N oranlarına sahip olduğunu ve bu da EMS'nin ne kadar stres oluşturan bir etkiye olduğunu göstermektedir.

Sonuçlar mgt ve mgr'nin negatif S/N oranları sergilediğini, bunun da değişkenliği ve fizyolojik stres olasılığını gösterdiğini ortaya koymuştur. Tedavi süresi her iki özellik için de daha yüksek delta puanı sergilemiş ve bu da EMS'ye daha uzun süre maruz kalmanın hücrel stres veya toksisite nedeniyle gecikmiş veya azalmış çimlenmeye yol açabileceğini göstermiştir. Sonuçlar, fide canlılığından ödün vermeden etkili mutagenizin büyük bir zorluk olduğunu ortaya koymuştur. Aksine, gsp için pozitif ancak dar S/N oranı aralığı, her iki faktörün de maksimum hız için birlikte optimize edilebileceğini ortaya koydu. Taguchi tasarımının bitki bilimlerinde kullanımı özellikle çimlenme için sınırlı olsa da ghaf tohumlarında ZnO nanopartiküllerine yanıt olarak çimlenmeyi araştırma (Awty-Carroll ve ark., 2020), arpada tohum çimlenmesini düzenleyen faktörleri optimize etme (Teixeira ve ark., 2021) ve Taguchi tasarımını kullanarak kimyasal priming tekniklerinin etkisini (Yaldagard ve ark., 2008) inceleyen çalışmalar belgelenmiştir.

Her iki istatistiksel model de EMS konsantrasyonunun ve işlem süresinin çimlenme endeksleri üzerindeki önemli etkisini ortaya koymuştur. Daha kısa süre için düşük EMS konsantrasyonunun tohum canlılığı veya yaşayabilirliği olmadan mutasyona neden olabileceği sonucuna varılmıştır. TD modeli, EMS'nin çimlenme özellikleri üzerindeki önemini artırmaktadır. Çalışma, kimyasal mutajenlere verilen karmaşık biyolojik tepkileri daha iyi anlamak için çimlenme endekslerini gelişmiş istatistiksel araçlarla birleştirmenin önemini vurgulamaktadır.



Şekil 4.1. Taguchi tasarımı kullanılarak farklı çimlenme indekslerinin sinyal/gürültü (S/N) oranı analizi

(S/N: sinyal/gürültü, grp: çimlenme oranı, mgt: ortalama çimlenme süresi, gsp: çimlenme hızı, mgr: ortalama çimlenme hızı, unc: çimlenme belirsizliği indeksi, syn: sekrenizasyon indeksi, vgt: canlılık indeksi, sdg: günlük çimlenme hızı, cvg: çimlenme hız katsayısı)

4.4. Trietilen tetraamin (TETA) ve Hidrojen Peroksit (H₂O₂) Uygulamasının Bitki Büyüme Üzerindeki Etkileri

ANOVA analizinin sonuçları Çizelge 4.7.'de sunulmuştur. Sonuçlar, A(mutajen) × C(konsantrasyon) × T(süre) etkileşiminin çimlenme ($p = 0,000$), sürgün uzunluğu ($p = 0,008$), kök uzunluğu ($p = 0,024$), yaprak uzunluğu ($p = 0,008$) ve genişliği ($p = 0,006$), kuru ağırlık ($p = 0,038$) üzerindeki istatistiksel olarak anlamlı etkisini ortaya koymuştur. Yaprak alanı ve taze ağırlığın A × C × T tarafından etkilenmediği bulunmuştur.

Sonuçlar, tohumlar hem H₂O₂ hem de TETA ile muamele edildiğinde kontrol uygulamasına kıyasla daha iyi çimlenme, sürgün uzunluğu, kök uzunluğu, yaprak uzunluğu ve genişliği ve yaprak alanı ortaya koymuştur. Çimlenme, H₂O₂ uygulamasında %55,57-70,39 ve TETA uygulamasında %55,57-75,33 olarak kaydedilmiştir. Maksimum çimlenme, 4 saat boyunca %1,0 TETA uygulamasından kaydedilmiştir. Maksimum sürgün uzunluğu, kök uzunluğu, yaprak uzunluğu ve kuru ağırlık hem H₂O₂ hem de TETA için 6 saatlik muamele ile %3,0'lük konsantrasyondan kaydedildi. Oysa her iki kimyasalla 4 saatlik tohum muamelesi nispeten yüksek yaprak genişliğiyle sonuçlandı.

Çizelge 4.7. H₂O₂ ve TETA'nın sorgumun *in vitro* çimlenme ve büyüme özellikleri üzerindeki etkisi

A	C (%)	T (sa)	G (%)	RL (cm)	SL (cm)	LSL (cm)	LSW (cm)	LA (cm ²)	FW (g)	DW (g)
0	0	0	50,63h	7,97e	5,47f	10,50e	0,193cde	2,27	0,387a	0,070abc
H ₂ O ₂	1	4	60,51cde	8,87cde	6,63bcdef	15,70abcde	0,227abc	3,57	0,311abcd	0,060abc
	1	6	70,39b	11,77abc	7,17abc	15,07abcde	0,163e	2,46	0,226	0,054bc
	2	4	59,28def	8,20e	5,87def	15,97abcde	0,243a	3,89	0,230	0,42c
	2	6	70,39b	10,67abcde	7,00abcd	19,83a	0,203bcd	4,42	0,275abcd	0,082abc
	3	4	55,57fg	9,57bcde	6,73bcdef	15,17abcde	0,207abcd	2,79	0,349ab	0,066abc
	3	6	54,34gh	12,83a	7,77ab	19,07a	0,203bcd	3,80	0,302abcd	0,83ab
TETA	1	4	75,33a	11,27abcd	6,87abcde	17,07abcd	2,33ab	4,26	0,303abcd	0,073abc
	1	6	61,75cd	10,70abcde	7,27abc	14,50bcde	0,174de	2,76	0,234bcd	0,051bc
	2	4	64,22c	9,37bcde	5,63ef	13,17cde	0,231ab	3,08	0,222cd	0,042c
	2	6	55,57fg	11,83abc	6,87abcde	17,53abc	0,198bcde	3,80	0,274abcd	0,071abc
	3	4	56,81efg	8,6de	6,33bcdef	12,23de	0,200bcd	2,41	0,187d	0,042c
	3	6	56,81efg	12,23ab	8,03a	19,87a	0,203bcd	3,56	0,326abc	0,092a
<i>p</i> - değeri			0,000**	0,024*	0,008**	0,028*	0,006**	0,126	0,099*	0,038*

A: mutajen ajan, C: konsantrasyon, T: uygulama süresi, G: Çimlenme (%), RL: kök uzunluğu, SL: sürgün uzunluğu, LSL: yaprak uzunluğu, LSW: yaprak genişliği, LA: yaprak alanı
FW: yaş ağırlık, DW: kuru ağırlık

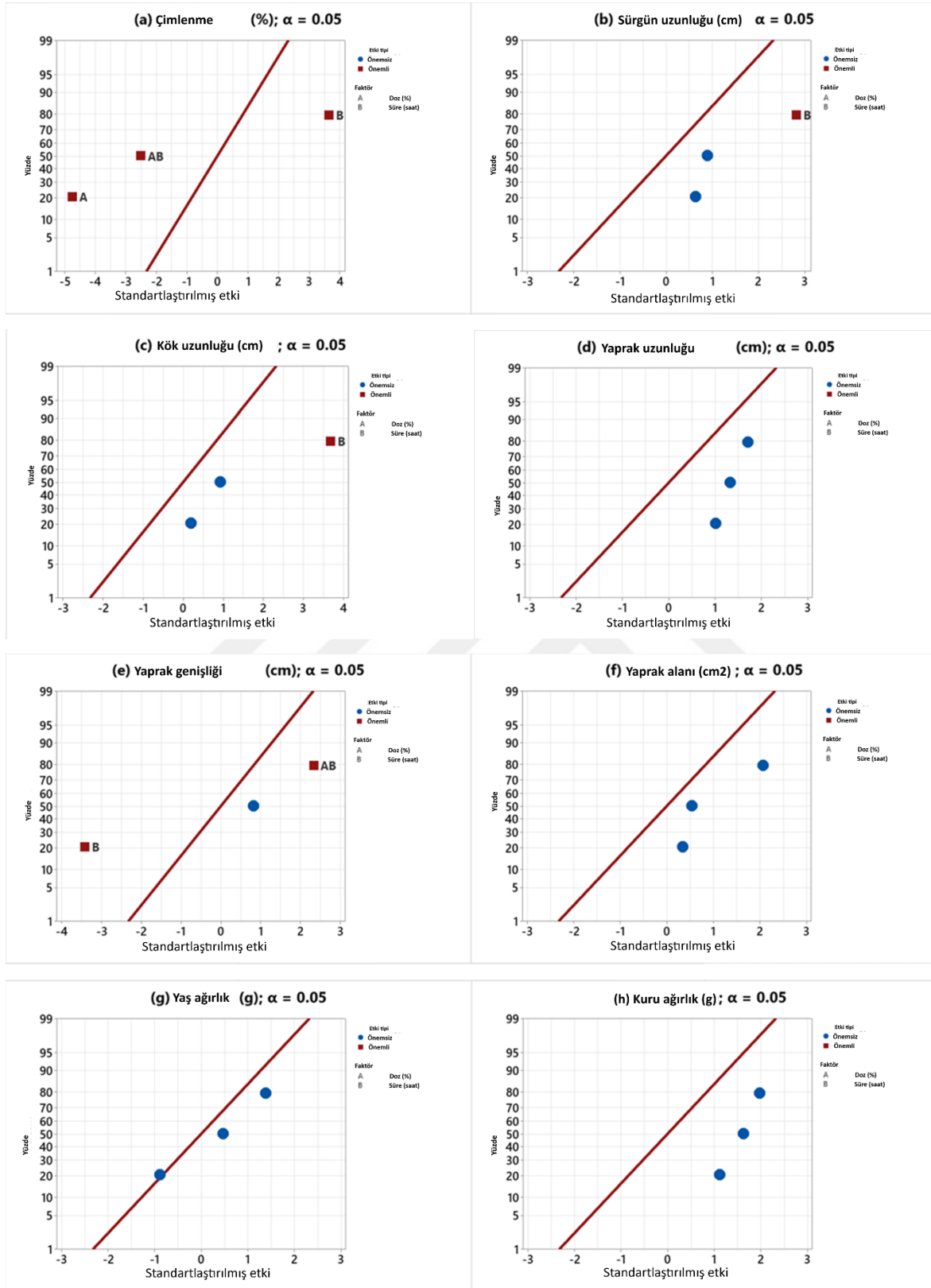
4.4.1. Deney tasarımının (DOE) faktöriyel regresyon analizi (FRA)

Kullanılan mutajenlerin, optimum konsantrasyon ve işlem süresini optimize etmek için Faktöriyel Regresyon Analizi (FRA) yapılmıştır. FRA'dan elde edilen H₂O₂ ve TETA'nın *p* değeri Çizelge 4.8.'de sunulmuştur. Sonuçlar, H₂O₂ için çimlenme, yaprak genişliği (*p* = 0,001) ve kök uzunluğu (*p* = 0,005) için modelin önemini göstermiştir. Oysa çimlenme ve yaprak uzunluğu (*p* = 0,001), kök uzunluğu ve kuru ağırlığı (*p* = 0,005) TETA için önemlidir. Modelin kalan parametrelerdeki performansı önemsiz olarak kaydedildi. Giriş parametreleri dikkate alındığında, çimlenme (*p* = 0,001) hariç her iki kimyasal için konsantrasyon için önemsiz etki gözlemlendi. İşlem süresi, H₂O₂ ile astarlandığında çimlenme (*p* = 0,001), kök uzunluğu (*p* = 0,001), yaprak kılıfı genişliği (*p* = 0,001) ve sürgün uzunluğu (*p* = 0,005) üzerinde önemli etki göstermiştir. Aksine, TETA bir kimyasal priming maddesi olarak kullanıldığında sadece çimlenmenin konsantrasyon için önemli olduğu bulunmuştur (*p* = 0,001). H₂O₂ 'nin C × T'sinin etkileşimi sadece çimlenme ve yaprak genişliği üzerinde önemli etki gösterdi (*p*0,005). TETA'nın C × T'sinin uygulanması sürgün uzunluğu hariç tüm parametreler üzerinde önemli etki göstermiştir. (Çizelge 4.8.).

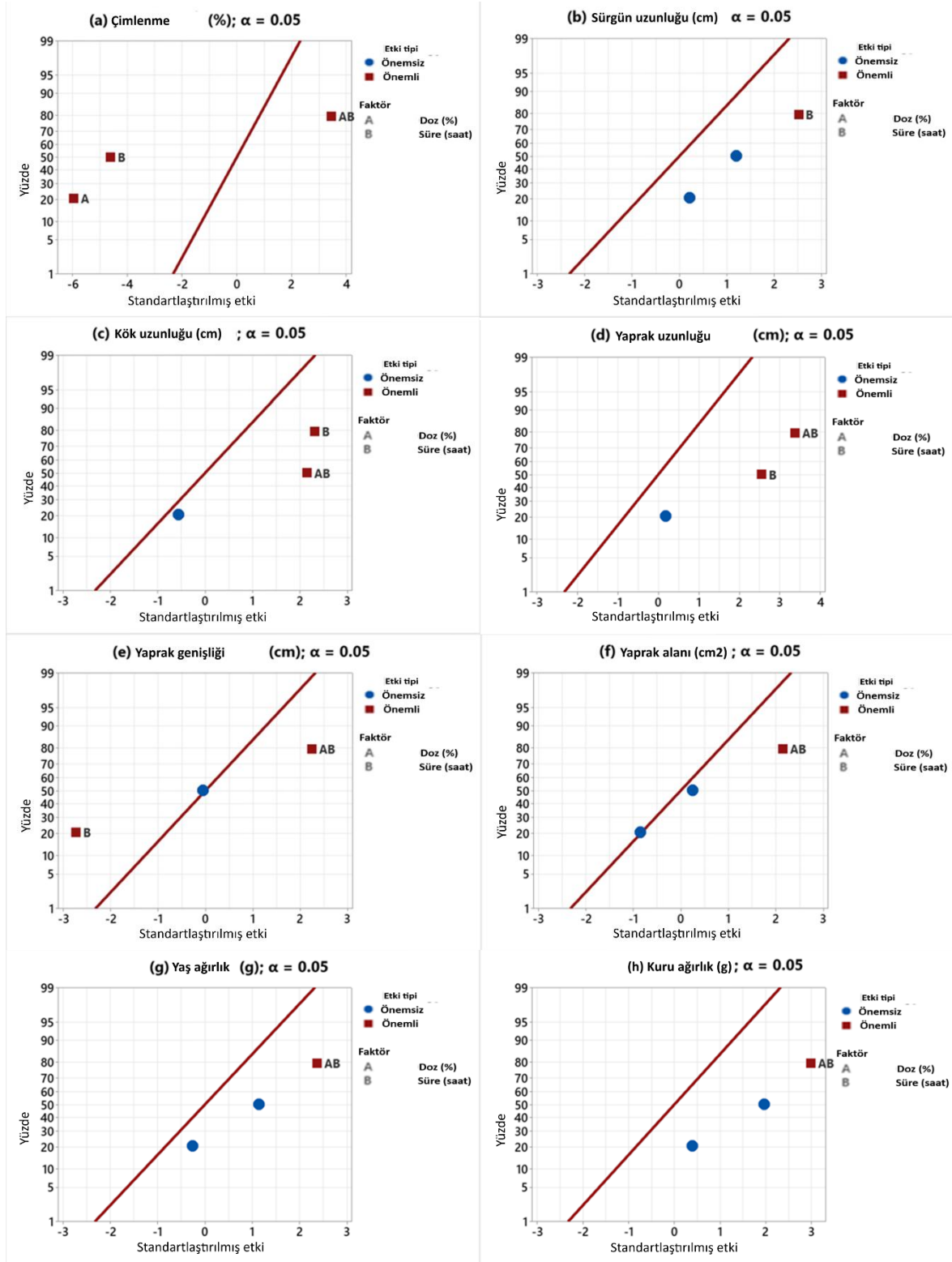
Çizelge 4.8. Sorgum'un *in vitro* çimlenme ve büyüme özelliklerinin faktöriyel regresyon analizi

H ₂ O ₂	G (%)	SL (cm)	RL (cm)	LSL (cm)	LSW (cm)	LA (cm ²)	FW (g)	DW (g)
Model	0,000**	0,064 ^{ös}	0,017*	0,176 ^{ös}	0,008**	0,244 ^{ös}	0,433 ^{ös}	0,094 ^{ös}
Linear	0,000**	0,033*	0,007**	0,176 ^{ös}	0,012*	0,818 ^{ös}	0,291 ^{ös}	0,068 ^{ös}
C (%)	0,000**	0,386 ^{ös}	0,372 ^{ös}	0,327 ^{ös}	0,426 ^{ös}	0,596 ^{ös}	0,188 ^{ös}	0,126 ^{ös}
T (h)	0,003**	0,014*	0,002**	0,110 ^{ös}	0,004**	0,740 ^{ös}	0,390 ^{ös}	0,069 ^{ös}
C × T	0,025*	0,533 ^{ös}	0,851 ^{ös}	0,205 ^{ös}	0,035*	0,058 ^{ös}	0,648 ^{ös}	0,283 ^{ös}
Uyumsuzluk	0,002**	0,145 ^{ös}	0,278 ^{ös}	0,434 ^{ös}	0,104 ^{ös}	0,051 ^{ös}	0,132 ^{ös}	0,146 ^{ös}
TETA	G (%)	SL (cm)	RL (cm)	LSL (cm)	LSW (cm)	LA (cm ²)	FW (g)	DW (g)
Model	0,000**	0,093 ^{ös}	0,047*	0,008**	0,026*	0,192 ^{ös}	0,119 ^{ös}	0,024*
Linear	0,000**	0,072 ^{ös}	0,092 ^{ös}	0,068 ^{ös}	0,050*	0,682 ^{ös}	0,522 ^{ös}	0,170 ^{ös}
C (%)	0,000**	0,832 ^{ös}	0,580 ^{ös}	0,862 ^{ös}	0,961 ^{ös}	0,409 ^{ös}	0,794 ^{ös}	0,698 ^{ös}
T (h)	0,000**	0,025*	0,036*	0,023*	0,016*	0,804 ^{ös}	0,275 ^{ös}	0,069 ^{ös}
C × T	0,004**	0,249 ^{ös}	0,050*	0,005**	0,041*	0,049*	0,033*	0,010**
Uyumsuzluk	0,240 ^{ös}	0,175 ^{ös}	0,864 ^{ös}	0,742 ^{ös}	0,490 ^{ös}	0,687 ^{ös}	0,922 ^{ös}	0,620 ^{ös}

p < 0,001 düzeyinde anlamlıdır (**), *p* < 0,005 düzeyinde anlamlıdır (*), ^{ös}: önemsiz; C: konsantrasyon, T: uygulama süresi, G: çimlenme (%), RL: kök uzunluğu, SL: gövde uzunluğu, LSL: yaprak uzunluğu, LSW: yaprak genişliği, LA: yaprak alanı, FW: yaş ağırlık, DW: kuru ağırlık



Şekil 4.2. H₂O₂ uygulamasının sorgum bitkisinde *in vitro* çimlenme ve büyüme özelliklerine etkisinin normal dağılım grafiği analizi



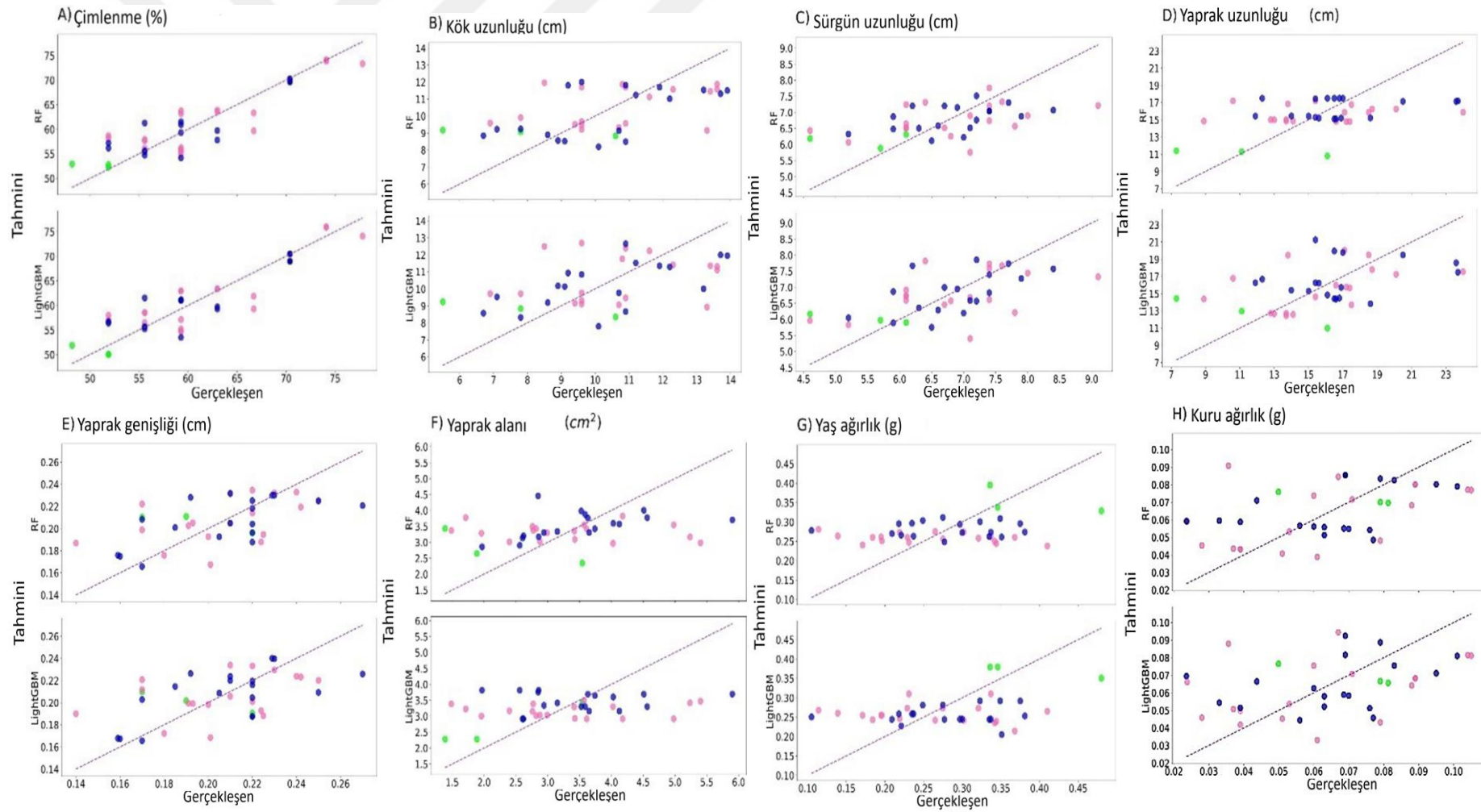
Şekil 4.3. TETA uygulamasının sorgum bitkisinde *in vitro* çimlenme ve büyüme özelliklerine etkisinin normal dağılım grafiği analizi

Sonuçlar hem TETA'nın hem de H₂O₂'nin bitki büyüme özellikleri üzerinde konsantrasyona ve uygulama süresine bağlı olan olumlu etkisini göstermiştir. Her iki kimyasalın

karşılaştırılması, optimum konsantrasyon ve işlem süresinde ve bunların etkileşiminde çimlenme ve canlılık açısından TETA'nın H_2O_2 'ye kıyasla daha iyi performans gösterdiğini ortaya koymuştur. Sonuçlar ayrıca, her iki kimyasaldaki daha fazla artışın tüm özellikler üzerinde olumsuz etkiye yol açabileceğini ortaya koymaktadır.

4.4.2. Makine öğrenmesi analizi

R^2 puanlarının sonuçları, karar ağaçları aracılığıyla karmaşık, doğrusal olmayan ilişkileri yakalaması nedeniyle, çoğu parametre için RF modelinin LightGBM'ye kıyasla daha iyi performans gösterdiğini ortaya koymuştur. R^2 puanlarının sonuçları, her iki modelde de çimlenme için maksimum bulundu; en yüksek RF modelinde (0,796) LightGBM modeline (0,619) kıyasla bulunmuştur. Benzer şekilde, RF modeli kök uzunluğu, sürgün uzunluğu, yaprak uzunluğu, yaprak genişliği, taze ağırlık ve kuru ağırlık için nispeten yüksek R^2 puanları üretmiştir. Oysa LightGBM, yaprak alanı için daha iyi tahminde bulunmuştu ve RF modeline (0,020) kıyasla 0,093'lük R^2 puanı olarak gözlenmiştir. Nispeten düşük R^2 puanları, veri kümesinin karmaşık ilişkisini yansıtır ve her iki model de özelliklerin çoğundaki varyansı açıklamada başarısız olmuştur. Aksine, düşük R^2 puanları modelin daha iyi tahminini ortaya koymasına rağmen RMSE puanları da düşüktü. Minimum RMSE puanı hem RF hem de LightGBM modeli tarafından yaprak genişliği için gözlenmiştir. LightGBM modeli kuru ağırlık için yüksek RMSE puanı öngörürken R^2 puanı ile uyumludur. MAE sonuçları RF modeli için RMSE ile uyumlu olmuştur. Minimum ve maksimum puan RF modeli için yaprak genişliği ve çimlenme için kaydedilmiştir. LightGBM modelinden en yüksek MAE puanı yaprak uzunluğu için kaydedilmiştir. MAPE sonuçları kuru ağırlık için en yüksek hatayı ortaya koymuş, bunu her iki model için de sırasıyla taze ağırlık ve kuru ağırlık yakından takip etmiştir. Gerçek ve öngörülen puanların sonuçları Şekil 4.4'de sunulmuştur. Sonuçlar her iki modelin de tüm parametreler için benzer performansını göstermiş ve 1:1 çizgisinin her iki tarafındaki öngörülen puanları kontrol ederek görselleştirilebilmektedir.



Şekil 4.4. Farklı makine öğrenme modellerinin (ML) gerçek ve tahmin edilen değerler

Kimyasal ön işlem uygulamaları, iklim değişikliği çağında kuraklık, tuzluluk ve patojen saldırıları gibi çeşitli çevresel streslere karşı bitki dayanıklılığı için bir adaptasyon stratejisini belirlemek için yapılmaktadır (Margay ve Hassan, 2024). Kimyasallarla tohum uygulaması, fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler yolları düzenler ve bitkilerin stresi hafifletmesine ve bitki büyümesini ve verimini artırmasına yardımcı olur (Aasim ve ark., 2024b). Bitkilerdeki abiyotik streslerin azaltılması antioksidan enzim aktivitelerini düzenler, su kullanım verimliliğini iyileştirir ve daha iyi bitki büyüme özellikleri sağlar (Nair ve ark., 2022). Ön işlem için kullanılan kimyasallar arasında hidrojen peroksit (H_2O_2), stres toleransını, büyümeyi ve üretkenliği artırmak için bitki araştırmalarında umut verici bir ajandır. H_2O_2 ayrıca reaktif oksijen türlerinin üretimini düzenleyerek ve metabolik yolları aktive ederek çimlenme oranlarını ve fide büyümesini iyileştirir ve savunma ile ilgili genleri aktive ederek sistemik edinilmiş direnci (SAR) indükler (Aasim ve ark., 2024b). Trietilen tetramin (TETA), bugüne kadar uygulanmış kimyasal maddeler olarak bildirilmemiş bir poliamindir. Stresler sırasında oksidatif hasarı önlemeye yardımcı olabilen klemasyon yeteneği nedeniyle metal iyonu kullanılabilirliğini düzenler (Lu, 2010).

Çizelge 4.9. Sorgum bitkisinin in vitro çimlenme ve büyüme özellikleri için makine öğrenme (ML) modellerine ait performans ölçütleri

	RF			
	R^2	RMSE	MAE	MAPE
Çimlenme (%)	0,796	4,296	3,425	6,124
Kök uzunluğu (cm)	0,253	1,850	1,539	16,203
Sürgün ucunluğu(cm)	0,250	0,835	0,686	10,628
Yaprak uzunluğu (cm)	0,211	3,190	2,499	17,677
Yaprak genişliği (cm)	0,266	0,024	0,020	10,073
Yaprak alanı (cm ²)	0,020	1,041	0,797	29,064
Yaş ağırlık (g)	0,042	0,080	0,067	29,311
Kuru ağırlık (g)	0,168	0,020	0,017	33,43
	LightGBM			
	R^2	RMSE	MAE	MAPE
Çimlenme (%)	0,619	1,966	1,647	9,581
Kök uzunluğu (cm)	0,153	1,970	1,663	17,270
Sürgün ucunluğu(cm)	0,278	0,819	0,649	10,041
Yaprak uzunluğu (cm)	0,070	3,463	2,777	19,422
Yaprak genişliği (cm)	0,198	0,025	0,021	10,415
Yaprak alanı (cm ²)	0,093	1,001	0,778	26,784
Yaş ağırlık (g)	0,021	0,081	0,068	28,417
Kuru ağırlık (g)	0,007	0,001	0,019	37,254

R^2 : belileme katsayısı, RMSE: ortalama kare hata kökü, MAE: ortalama mutlak hata, MAPE: ortalama mutlak yüzde hata

Kimyasallar uygulama sonrası verilerin etkilerini anlamak için birden fazla istatistiksel araca tabi tutulmuştur. ANOVA analizi, aralarındaki istatistiksel olarak anlamlı farklılıklara dayalı olarak ortalamaları karşılaştırmak için kullanılan bir istatistiksel tekniktir. İşlem etkilerini, birden fazla bağımsız değişken arasındaki etkileşimi ve deneysel kararlar almayı belirlemeye yardımcı olur (Connelly, 2021). Tohumlarda kimyasal priming (ön uygulama) gibi tarım ve bitki bilimlerinde yaygın olarak kullanılan bir istatistiksel araçtır (Aasim ve ark., 2024b). Kimyasal priming sonuçları, tohum canlılığını ve erken bitki büyümesini iyileştirdiğini ancak yüksek konsantrasyon ve işlem süresi gerektirdiğini ortaya koymuştur. Sonuçlar, kimyasal priming ile stresi azaltma ve fide performansını artırma konusundaki önceki bulgularla uyumludur (Razzaq ve ark., 2013; Yıldırım ve ark., 2023).

ANOVA güçlü bir istatistiksel araç olmasına rağmen, varyans ve normallik homojenliği varsayımı, ilişkilere ilişkin içgörü eksikliği ve doğrusal olmayan ilişkileri modelleme yetersizliği ve etkileşim karmaşıklığı gibi çeşitli sınırlamalara da sahiptir. Bu tür sorunlar, Deney Tasarımı (DOE) (Anderson ve McLean, 2018) gibi gelişmiş istatistiksel araçlar kullanılarak aşılabılır. DOE hem sürekli hem de kategorik değişkenleri ele alma yeteneğine sahiptir, deneysel tasarımlarda esneklik sağlar ve optimizasyon için kullanılan polinom denklemleri kullanarak doğrusal olmayan ilişkileri modeller (Godara ve ark., 2024). DOE, yanıt yüzey regresyon analizi (RSRA) ve faktöriyel regresyon analizi (FRA) sunar. FRA, özellikle birden fazla faktöre sahip karmaşık sistemleri anlamak için bağımsız ve bağımlı değişkenler arasındaki ilişkiyi optimize etmek için kritik öneme sahiptir (Aasim ve ark., 2023). FRA'nın diğer avantajları arasında tahmin için görsel sunumlar, koşulları optimize etme ve deneyi gerçekleştirmek için daha az çalışma ile deneysel maliyetleri azaltma yer alır. Tarım ve biyoteknolojide, DOE, deneysel testler için gereken kaynakları ve zamanı en aza indirmek için oldukça değerli bir araçtır (Anderson ve McLean, 2018). DOE modeli, tohum priming çalışmalarında oldukça etkilidir ve etkileşim etkilerini belirlemeye ve optimum konsantrasyonları tahmin etmeye yardımcı olur.

Bu çalışmada, en önemli faktörü ve ilgili çıktı parametresi üzerindeki etkisini anlamak için normal grafikler oluşturmak amacıyla FRA kullanılmıştır. Normal olasılık grafiği (Q-Q grafiği) ve gözlenen veri noktaları normal grafiklerde normal dağılım çizgisinin sol ve sağ tarafına çizilir. Giriş parametresinin sağ üstte yer alması, o parametre için pozitif korelasyona sahip en baskın faktörü ifade eder ve tam tersi sol altta yer alması, en yüksek

etkiye sahip negatif faktörü ifade eder. Kırmızı renkli (kare) istatistiksel olarak önemli faktör anlamına gelir ve mavi (yuvarlak) giriş faktörünün önemsiz etkisine işaret eder (Aasim ve ark., 2024b). Normal grafik analizi, istatistiksel çıkarımların doğrulanması için önemli bir araçtır ve regresyon analizinden sonra normal dağılımı takip eder (Moretti, 2011). Bitki bilimlerinde, normal grafikler gizli örüntüleri belirlemede yardımcı olur ve büyüme modellerinin sağlamlığını önemli ölçüde iyileştirir. Varsayımları doğrulama, model doğruluğunu iyileştirme ve güvenilir deneysel sonuçları sağlama yeteneği belgelenmiştir (Aasim ve ark., 2024b, 2023).

ANOVA ve RSRA'dan sonra ML modellerinin entegre edilmesi, veri analizinin derinliğini, doğruluğunu ve öngörü yeteneklerini önemli ölçüde artırabilir. ML modelleri, gelişmiş desen tespiti, öngörü ve gizli verilere genelleme yoluyla karar vermeyi iyileştirmek için faydalıdır (Aasim ve ark., 2024a). ML modelleri, eğitim verilerinden öğrenerek ve görülmemiş test kümelerine karşı doğrulama yaparak genellemeyi geliştirerek doğrulukla daha iyi tahminler tahmin edebilir ve çeşitli koşullar altında sağlam öngörü yetenekleri sağlayabilir (Soltis ve ark., 2020). Her iki modelin sonuçları, muhtemelen karmaşık biyolojik verileri açıklamadaki başarısızlıktan kaynaklanan düşük öngörü yeteneği ile orta düzeyde hatayı göstermiştir (Alsharaiah ve ark., 2022). Her iki modelin düşük öngörü yeteneğinin nedenleri, yetersiz örneklem büyüklüğü, yüksek değişkenlik ve özellik türü olabilir. Genel olarak, bitkilerin morfolojik özellikleri genetik ve çevresel faktörler tarafından düzenlenen karmaşık ve doğrusal olmayan ilişkiler sergileyebilir. Bu tür özellikler genellikle klasik ML modelleri tarafından standartlaştırılmaz ve daha gelişmiş ML modelleri veya kuantum makine öğrenme modelleri gerektirebilir (Katırcı ve ark., 2024). Ek olarak, veri toplamada gürültü (Yan ve ark., 2020) ve sınırlı özellik seçimi (Ye ve Ouyang, 2024) diğer olası nedenlerdir ve istenen sonuçlara ve optimizasyona ulaşmak için optimize edilmesi gerekir (Whitmire ve ark., 2021). Tüm çıktı parametrelerinin gerçek ve öngörülen puanları Şekil 4.4'te sunulmuştur. Sonuçlar, modellerin parametreye bağlı performansını ortaya koymuştur (Tamilmani ve ark., 2023).

Çalışma, farklı konsantrasyonlarda H_2O_2 ve TETA ile kimyasal priming etkisini araştırmaktadır ve *in vitro* koşullarda sorgumun çimlenmesi, canlılığı ve erken büyüme özellikleri üzerinde tedavi süresi; FRA'nın ML modelleriyle bütünleştirilmesi, ürün dayanıklılığı ve üretkenliğini iyileştirmek için tohum kimyasal priming protokolünü

optimize etmek için tüm girdi faktörlerinin doğrusal ve etkileşimlerine dair kapsamlı içgörüler sağlamıştır. Sonuçlar, özellikle daha düşük konsantrasyon ve tedavi süresinde TETA'nın H_2O_2 'ye kıyasla üstün performans gösterdiğini gösterdi. Sonuçlar, yüksek konsantrasyon ve uzun tedavi süresinin belirli özellikler üzerindeki olumsuz etkisini daha da göstermiş ve ML modellerinin uygulanması, sonuçları makul bir şekilde daha da doğrulamıştır.

4.5. Trietilen tetramin (TETA) ve Hidrojen Peroksit (H_2O_2) Uygulamasının Biyokimyasal ve Antioksidant Üzerindeki Etkileri

4.5.1. ANOVA analizi

Çalışmada farklı kimyasal ajanlarının çeşitli konsantrasyonlarda ve farklı sürelerdeki etkisi sunulmuştur. Sonuçlar H_2O_2 ve TETA'nın sorgumun biyokimyasal dinamikleri üzerindeki etkilerinde önemli farklılıklar olduğunu göstermiştir. 6 saat boyunca %1 H_2O_2 uygulaması, ölçülen tüm parametreler için dikkate değer değerlerle sonuçlanmıştır. Bunlara AOx için 28,57 mg AAE/g, TPC için 17,49 mg GAE/g, TFC için 2,50 mg CE/g ve prolin için 4,18 mg/g dahildir. Oysa en yüksek DPPH inhibisyon seviyesi (%40,29), 6 saat boyunca %2 H_2O_2 uygulamasıyla gözlemlenmiştir. TFC için, %2 H_2O_2 ve 4 saatin kombinasyonu, gözlenen en yüksek konsantrasyonu temsil eden 2,59 mg CE/g değerini verdi. Bu sonuçlar H_2O_2 'nin antioksidan kapasiteyi artırmadaki etkinliğini göstermektedir. Ancak TETA uygulaması, 4 saatlik bir süre boyunca %3,0 TETA kullanılmasına rağmen H_2O_2 'ye kıyasla daha düşük genel değerler vermiş ve AOx için 22,37 mg AAE/g ile sonuçlanmıştır. Diğer parametreler için de dikkate değer sonuçlar elde edilmiştir; örneğin TPC için 15,04 mg GAE/g ve TFC için 3,22 mg CE/g. En yüksek prolin (4,31 mg/g) değerleri, 3 saatlik bir işlem süresi için %2,0 TETA'dan kaydedilmiştir. Sonuçlar, TETA ile karşılaştırıldığında fenolik ve flavonoid bileşiklerin antioksidan kapasitesini artırmada ön uygulama maddesi olarak H_2O_2 'nin daha iyi performans gösterdiğini göstermiştir. TETA uygulaması, uygulama süresine ve konsantrasyona bağlı değişkenlik gösterirken, sürecin optimizasyonunun önemini vurgulamaktadır. Her iki kimyasal maddenin de bitkilerin çevresel strese karşı dayanıklılığını arttırmada etkili kimyasal priming maddeleri olarak hizmet edebileceği sonucuna varılmıştır.

4.5.2. Tepki yüzeyi regresyon analizi

ANOVA analizi genellikle girdi faktörünün bağımlı veya çıktı parametreleri üzerindeki anlamlı düzeyini belirler. Ancak, ANOVA analizinde etki türü ve en anlamlı faktör net değildir. Bu tür yanıtlar, RSRA gibi modern hesaplamalı modeller kullanılarak çizilebilir. RSRA, bağımsız değişkenlerin kombinasyonlarının bağımlı değişkenler üzerindeki etkilerini anlamak için kullanılan değerli bir yöntemdir ve biyolojik sistemlerdeki karmaşık ilişkileri analiz etmek için oldukça değerlidir (Aasim ve ark., 2023). Bu çalışmada RSRA, kimyasal ajanların, konsantrasyonlarının ve maruz kalma süresinin sorgum üzerindeki etkisini anlamak ve optimize etmek için kullanılmıştır. Tüm çıktı parametrelerinin kodlanmış denklemleri Çizelge 4.10.'da sunulmuştur.

Çizelge 4.10. TETA ve H₂O₂ ile kimyasal ön işlemeye karşılık olarak *Sorghum bicolor*'un fide ve biyokimyasal dinamiklerine ait kodlanmış denklemler

Çıktı	Kodlanmış denklemler
Kontrol Aox (mgAAE/g)	$10,45 - 7,12 \text{ Doz (\%)} + 4,19 \text{ Süre (sa)}$ $+ 3,45 \text{ Doz (\%)} \times \text{Doz (\%)} - 1,167 \text{ Doz (\%)} \times \text{Süre (sa)}$
H ₂ O ₂ Aox (mgAAE/g)	$10,61 - 7,12 \text{ Doz (\%)} + 4,19 \text{ Süre (h)}$ $+ 3,45 \text{ Doz (\%)} \times \text{Doz (\%)} - 1,167 \text{ Doz (\%)} \times \text{Süre (sa)}$
TETA Aox (mgAAE/g)	$8,97 - 7,12 \text{ Doz (\%)} + 4,19 \text{ Süre (sa)}$ $+ 3,45 \text{ Doz (\%)} \times \text{Doz (\%)} - 1,167 \text{ Doz (\%)} \times \text{Süre (sa)}$
Kontrol TPC (mgGAE/g)	$14,13 + 1,14 \text{ Doz (\%)} + 2,476 \text{ Süre (sa)}$ $+ 0,680 \text{ Doz (\%)} \times \text{Doz (\%)} - 0,599 \text{ Doz (\%)} \times \text{Süre (sa)}$
H ₂ O ₂ TPC (mgGAE/g)	$2,39 + 1,14 \text{ Doz (\%)} + 2,476 \text{ Süre (sa)}$ $+ 0,680 \text{ Doz (\%)} \times \text{Doz (\%)} - 0,599 \text{ Doz (\%)} \times \text{Süre (sa)}$
TETA TPC (mgGAE/g)	$1,66 + 1,14 \text{ Doz (\%)} + 2,476 \text{ Süre (sa)}$ $+ 0,680 \text{ Doz (\%)} \times \text{Doz (\%)} - 0,599 \text{ Doz (\%)} \times \text{Süre (sa)}$
Kontrol TFC (mgCE/g)	$1,778 + 0,80 \text{ Doz (\%)} + 0,898 \text{ Süre (sa)}$ $+ 0,272 \text{ Doz (\%)} \times \text{Doz (\%)} - 0,291 \text{ Doz (\%)} \times \text{Süre (sa)}$
H ₂ O ₂ TFC (mgCE/g)	$-2,55 + 0,80 \text{ Doz (\%)} + 0,898 \text{ Süre (sa)}$ $+ 0,272 \text{ Doz (\%)} \times \text{Doz (\%)} - 0,291 \text{ Doz (\%)} \times \text{Süre (sa)}$
TETA TFC (mgCE/g)	$-2,81 + 0,80 \text{ Doz (\%)} + 0,898 \text{ Süre (sa)}$ $+ 0,272 \text{ Doz (\%)} \times \text{Doz (\%)} - 0,291 \text{ Doz (\%)} \times \text{Süre (sa)}$
Kontrol Prolin (mg/g)	$2,736 + 2,60 \text{ Doz (\%)} + 1,335 \text{ Süre (sa)}$ $- 0,182 \text{ Doz (\%)} \times \text{Doz (\%)} - 0,398 \text{ Doz (\%)} \times \text{Süre (sa)}$
H ₂ O ₂ Prolin (mg/g)	$-3,90 + 2,60 \text{ Doz (\%)} + 1,335 \text{ Süre (sa)}$ $- 0,182 \text{ Doz (\%)} \times \text{Doz (\%)} - 0,398 \text{ Doz (\%)} \times \text{Süre (sa)}$
TETA Prolin (mg/g)	$-3,66 + 2,60 \text{ Doz (\%)} + 1,335 \text{ Süre (sa)}$ $- 0,182 \text{ Doz (\%)} \times \text{Doz (\%)} - 0,398 \text{ Doz (\%)} \times \text{Süre (sa)}$
Kontrol DPPH (% inhibisyon)	$30,84 - 7,75 \text{ Doz (\%)} + 4,59 \text{ Süre (sa)}$ $+ 1,45 \text{ Doz (\%)} \times \text{Doz (\%)} + 0,452 \text{ Doz (\%)} \times \text{Süre (sa)}$
H ₂ O ₂ DPPH (% inhibisyon)	$11,3 - 7,75 \text{ Doz (\%)} + 4,59 \text{ Süre (sa)}$ $+ 1,45 \text{ Doz (\%)} \times \text{Doz (\%)} + 0,452 \text{ Doz (\%)} \times \text{Süre (sa)}$
TETA DPPH (% inhibisyon)	$10,0 - 7,75 \text{ Doz (\%)} + 4,59 \text{ Süre (sa)}$ $+ 1,45 \text{ Doz (\%)} \times \text{Doz (\%)} + 0,452 \text{ Doz (\%)} \times \text{Süre (sa)}$

(AOx: antioksidan aktivitesi, DPPH: serbest radikal inhibisyon kapasitesi, TPC: Toplam fenolik içeriği, TFC: Toplam Flavonoid içeriği)

Yanıt Yüzey regresyon analizi sonuçları Çizelge 4.11.'de sunulmuştur. Model, birkaç bağımsız değişkenin etkisinin eş zamanlı olarak değerlendirilmesine ve optimum koşulların belirlenmesine olanak tanımaktadır. ANOVA sonuçları (Çizelge 4.10), yüzey regresyon modelinin hassasiyetini ve anlamlılığını doğrulamıştır. Modelin genel anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak belirlendi. AOx için tedavi süresinin önemli bir etkisi olduğu ($F = 13,21$, $p = 0.001$), ancak ön uygulama maddesi, konsantrasyon ve tüm girdilerin etkileşiminin önemsiz bir etkisi olduğu gözlemlenmiştir. Prolin için tedavi süresi ($F = 23,92$, $p = 0.000$) ve uygulanan kimyasal madde ($F = 5,69$, $p = 0.008$) istatistiksel olarak önemlidir. Ayrıca, DPPH için tedavi süresinin önemli bir etkisi gözlenmiştir ($F = 32,68$, $p < 0.000$). Tedavi süresinin en önemli faktör olması, konsantrasyonun ise tüm parametreler üzerinde önemli bir etkisinin olmaması dikkat çekici olduğu görülmüştür.

Çizelge 4.11. TETA ve H₂O₂ ile kimyasal ön uygulamaya yanıt olarak *Sorghum bicolor*'un fide ve biyokimyasal dinamiklerinin Yanıt Yüzeyi Regresyon Analizi

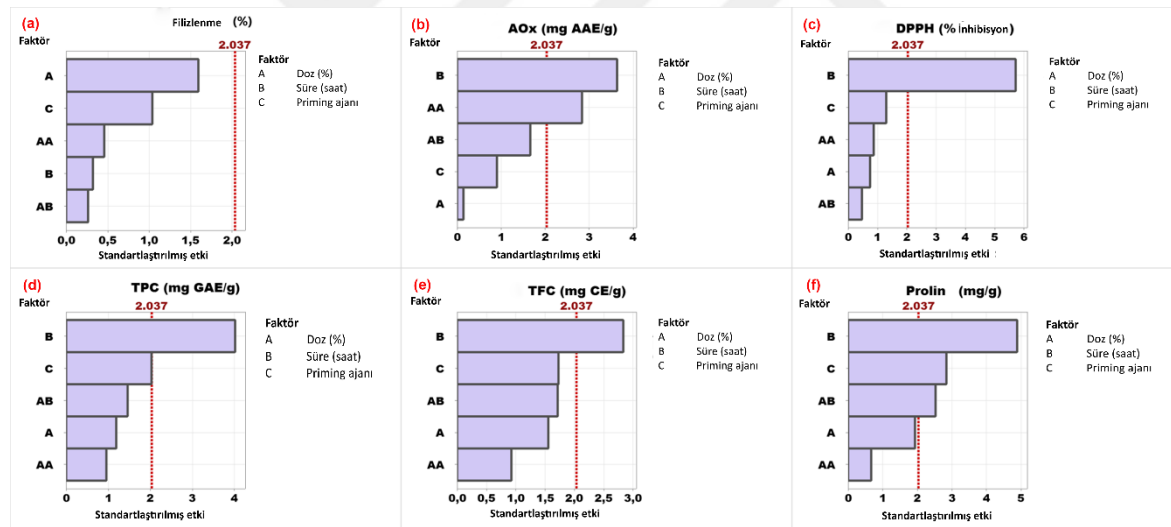
Source	Filizlenme (%)	AOx (mg AAE/g)	TPC (mg GAE/g)	TFC (mg CE/g)	DPPH (% İnhibition)	Proline (mg/g)
Model	0,000**	0,000**	0,005**	0,029*	0,002*	0,000**
Linear	0,471	0,000**	0,005**	0,059	0,001**	0,000**
Doz (%)	0,121	0,887	0,242	0,130	0,062	0,460
Süre (saat)	0,749	0,001**	0,000**	0,008*	0,000**	0,000**
Priming ajanı	0,307	0,372	0,051*	0,093	0,008**	0,203
Kare	0,649	0,008**	0,345	0,362	0,509	0,390
Doz (%) *Doz (%)	0,649	0,008**	0,345	0,362	0,509	0,390
2-yönlü etkileşim	0,793	0,106	0,153	0,096	0,017*	0,642
Doz (%) *Süre (saat)	0,793	0,106	0,153	0,096	0,017*	0,642
Uyumsuzluk	0,000**	0,000	0,000	0,000**	0,000*	0,000*

(AOx: antioksidan aktivitesi, DPPH: serbest radikal inhibisyon kapasitesi, TPC: Toplam fenolik içeriği, TFC: Toplam Flavonoid içeriği)

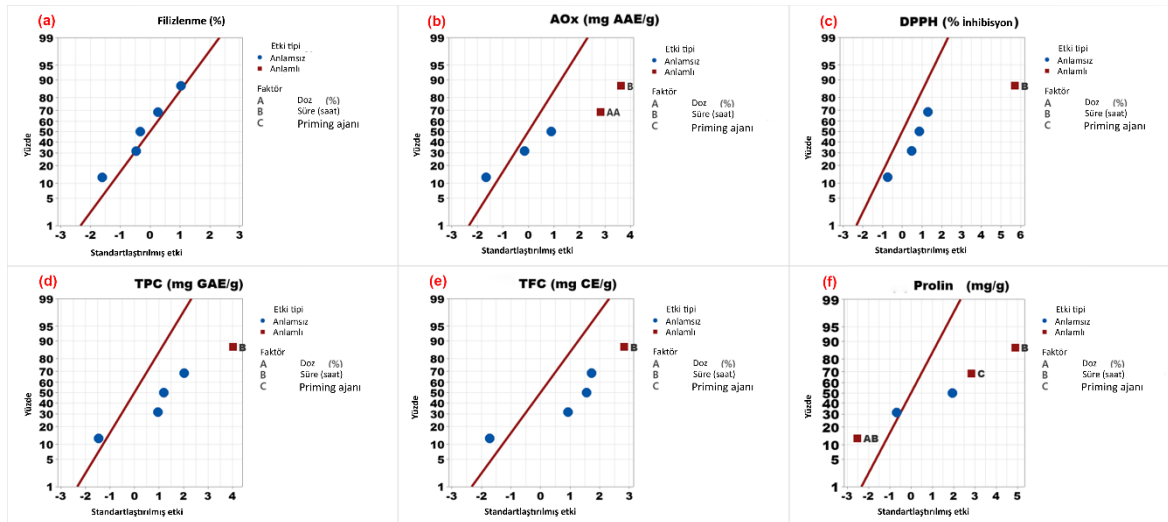
4.5.3. Pareto diyagramı ve normal grafik analizi

Şekil 4.5, yüzey regresyon analizinden türetilen Pareto grafiğinin bulgularını göstermektedir. Pareto diyagramları, girdileri önem sırasına göre azalan düzende düzenleyen, en etkili unsurun en üste, en az önemli unsurun ise büyüklüğe göre en alta yerleştirildiği temel araçlardır. Bu teknik, biyolojik süreçlerdeki en etkili unsurları belirlemek, karar alma sürecine ve süreç optimizasyonuna yardımcı olmak için kullanılır.

Pareto grafiklerinin sonuçları, tüm çıktı parametreleri için en önemli faktör olarak işlem süresini göstermiştir. Oysa kimyasal madde (C), AOx hariç tüm çıktılar için ikinci en önemli faktördü. Aksine, konsantrasyon (A), çoğu ölçüm üzerinde nispeten minimal bir etki göstermiştir. Veriler, işlem süresinin sorgum büyümesini ve gelişimini etkileyen birincil faktör olduğunu, diğer parametrelerin etkisinin ise nispeten sınırlı olduğunu göstermektedir. Sonuçlar, merkez çizgiye eğimli çıktı parametrelerinin normal dağılımı için normal grafikler (Şekil 4.6) oluşturularak daha fazla araştırılmıştır. Kalıntılar normal dağılım çizgisiyle yakından örtüşüyorsa, bu modeli doğrular ve genel güvenilirliğini artırmaktadır. Normal grafik analizi hem ölçülen nicelikleri hem de ortaya çıkan standart sapmalardaki hataları inceler. Sonuçlar, tedavi süresi (B) ile tüm çıktı parametreleri arasında pozitif bir korelasyon olduğunu ortaya koymuştur. Sonuçlar ayrıca, neredeyse hepsi normal dağılım çizgisinin sağ tarafına eğimli olduğundan tüm girdi ve çıktı parametreleri arasında pozitif bir ilişki olduğunu göstermiştir.



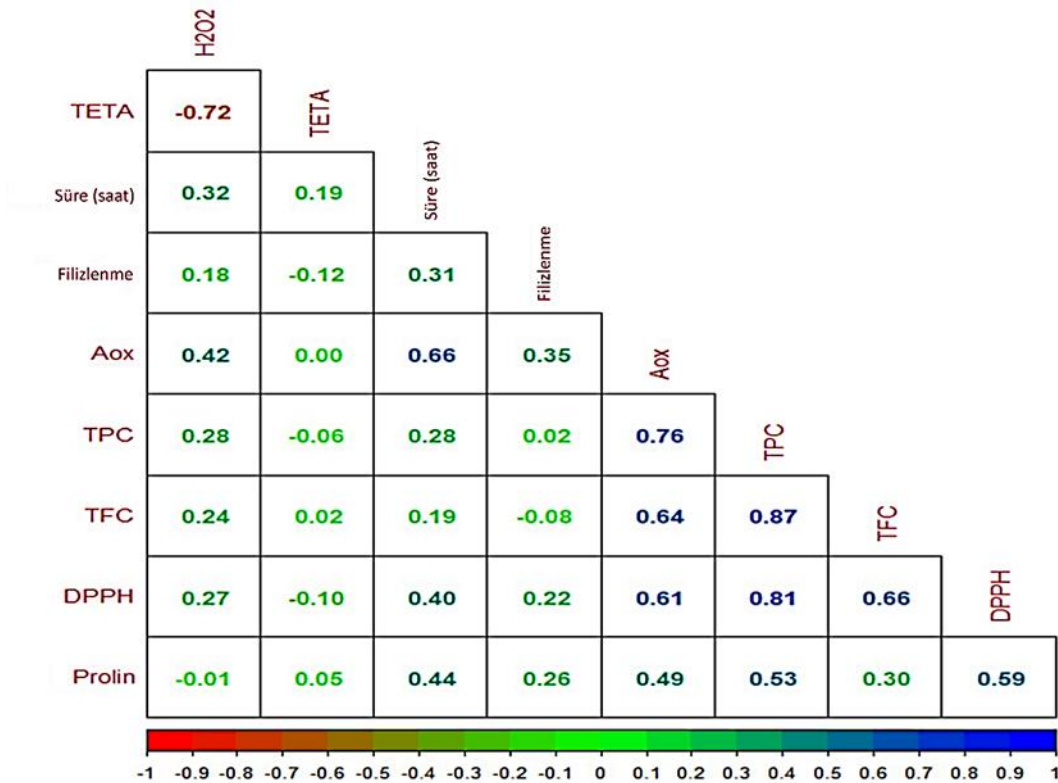
Şekil 4.5. H₂O₂ ve TETA ile muamele edilmiş bitkilerin biyokimyasal analizi için Pareto grafiği analizleri (AOx: antioksidan aktivitesi, DPPH: serbest radikal inhibisyon kapasitesi, TPC: Toplam fenolik içeriği, TFC: Toplam Flavonoid içeriği)



Şekil 4.6. H_2O_2 ve TETA ile muamele edilmiş bitkilerin biyokimyasal analizi için normal plot analizleri (AOx: antioksidan aktivitesi, DPPH: serbest radikal inhibisyon kapasitesi, TPC: Toplam fenolik içeriği, TFC: Toplam Flavonoid içeriği)

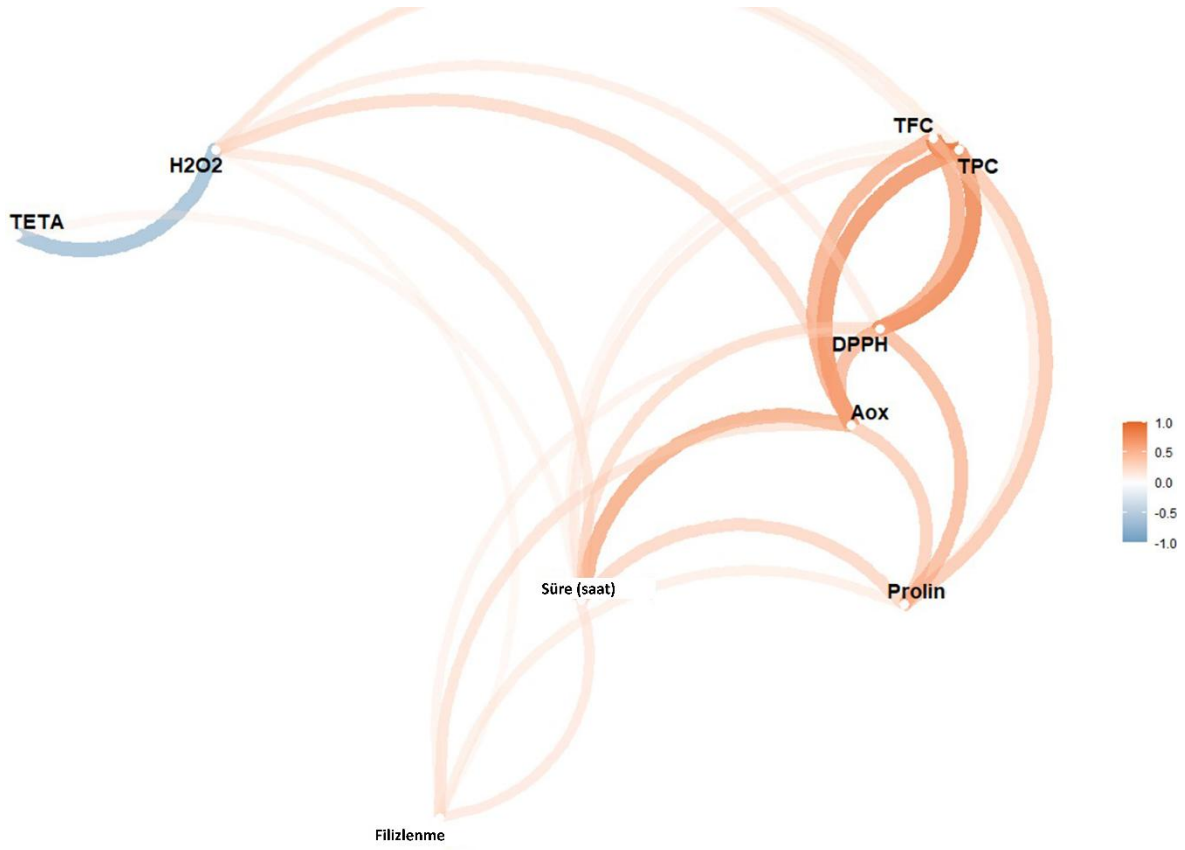
4.5.4. Isı haritası ve ağ grafik analizi

Isı haritasının sonuçları (Şekil 4.7), H_2O_2 ile TETA arasında ters bir ilişki olduğunu gösteren önemli bir negatif korelasyon bulmuştur. TPC ile TFC arasında güçlü bir pozitif korelasyon kaydedilmiştir. Bu, paylaşılan bir biyokimyasal yol veya karşılıklı etki olduğunu göstermektedir. Toplam fenolik içerik, antioksidan aktiviteye önemli ölçüde katkıda bulunurken, TPC, DPPH ve AOX ile güçlü korelasyonlar göstermiştir. Flavonoidler ayrıca antioksidan kapasitesini de artırmaktadır. Zamana bağlı eğilimler, AOX ve DPPH ile orta düzeyde pozitif korelasyonlar göstermiştir; bu, antioksidan aktivitenin deneysel süre boyunca arttığını göstermektedir. Prolin içeriği, AOX ile orta düzeyde korelasyon göstermiştir; bu, zaman içinde stres tepki mekanizmalarındaki rolünü göstermektedir. Prolin içeriği, AOX ile orta düzeyde korelasyon göstermiştir; bu, deneysel koşullar altında antioksidan aktiviteyi düzenlemedeki potansiyel rolünü göstermektedir. TETA ve AOX ile ise nispeten zayıf veya hiç korelasyon gözlemlenmemiştir. Fide büyümesi, zaman ve TPC gibi faktörlere zayıf bağımlılıklar göstermiştir.



Şekil 4.7. H₂O₂ ve TETA ile muamele edilmiş bitkilerin biyokimyasal analizi için ısı haritası (AOx: antioksidan aktivitesi, DPPH: serbest radikal inhibisyon kapasitesi, TPC: Toplam fenolik içeriği, TFC: Toplam Flavonoid içeriği)

Sonuçlar, H₂O₂ ve TETA arasında güçlü bir negatif ilişki olduğunu ortaya koyan ağ grafiği analizi (Şekil 4.8) ile daha fazla araştırılmış; mavi çizgi, H₂O₂ arttıkça TETA seviyelerinde bir azalma olduğunu göstermektedir. TPC ve TFC arasında, antioksidan aktivite ve bitki metabolizmasındaki birbirine bağlı rollerini vurgulayan güçlü bir pozitif korelasyon gözlemlenmiştir. Ağ grafiği ayrıca TPC, DPPH ve AOx arasında önemli bir pozitif ilişki göstermiştir. Sonuçlar, TPC'nin serbest radikal temizleme aktivitesini ve antioksidan enzim verimliliğini artırmadaki kritik rolünü doğrulamıştır. Zaman ve prolin arasındaki orta düzeyde pozitif bağlantı, stres adaptasyonundaki rolünü gösteren, uzatılmış süreyle prolin seviyelerinde kademeli bir artışı önermektedir. Fide büyümesi, diğer değişkenlere göre daha zayıf ve daha ince çizgiler göstermektedir ve bu, TETA ve H₂O₂ gibi faktörlerin fide parametreleri üzerindeki dolaylı etkilerini düşündürmektedir. Ağ gösterimi, değişkenler arasındaki karşılıklı bağımlılığa dair kapsamlı bir görünüm sunmaktadır.



Şekil 4.8. H₂O₂ ve TETA ile muamele edilmiş bitkilerin biyokimyasal analizi için network plot analizleri (AOx: antioksidan aktivitesi, DPPH: serbest radikal inhibisyon kapasitesi, TPC: Toplam fenolik içeriği, TFC: Toplam Flavonoid içeriği)

4.5.5. Makine öğrenme analizi

Üç farklı model ve metriğin kullanıldığı bireysel model analizinin karşılaştırması Çizelge 4.12.'de sunulmuştur. RF modeli, 0,935'lik bir R², 1,749'luk düşük bir RMSE ve 1,331'lik minimum bir MAE ile DPPH inhibisyonunu tahmin etmede en üstün modeldi. Oysa RF modeli tarafından TPC ve TFC için orta düzeyde bir R² değeri tahmin edilmiştir. RF modelinin prolin içeriği için performansı nispeten zayıftı ancak 737,867'lik yüksek bir RMSE ve 499,347'lik bir MAE ile 0,396'lık bir R² kaydedilmiş; bu da gözlenen ve tahmin edilen değerler arasında önemli sapmalar olduğunu göstermektedir. LightGBM modeli, DPPH inhibisyonu için RF modeline rekabetçi bir performans ve 1,807'lik biraz daha yüksek bir RMSE ve 1,437'lik bir MAE ile 0,931'lik yüksek bir R² puanı göstermiştir. Ancak, LightGBM modeli TPC ve TFC için sınırlı tahmin doğruluğu sergilemiş ve RF modelinden daha az bulmuştur. Aksine, LightGBM, 0,374'lük bir R² ve yüksek RMSE ve MAE puanlarıyla prolin içeriğini tahmin etmede RF'den daha iyi performans göstermiştir. Aksine,

SVR'nin performansı, çıktı modelinden bağımsız olarak diğer modellerle karşılaştırıldığında nispeten düşük gözlenmiştir. Prolinin R²'sinin yüksek RMSE (4,134) ve MAE (2,633) puanlarıyla negatif olması da dikkat çekici olmuştur. Modelin prolin içeriği için yüksek hata ölçütlerine sahip negatif R² değeri, modelin prolin içeriğini doğru bir şekilde tahmin edemediğini ortaya koymuştur. Çalışma, analiz edilen parametrelerin değişken tahmin doğruluğu bağımlılığı nedeniyle belirli veri kümeleri ve hedef değişkenler için model seçiminin önemini ortaya koymuştur. Şekil 4.9'daki tüm parametrelerin grafiksel sunumu, yüksek R² puanlarına sahip parametrelerin 1:çizgiye yakın olduğunu ve bunun tersinin de geçerli olduğunu gösteren R² puanlarını doğrulamıştır.

Çizelge 4.12. TETA ve H₂O₂ ile kimyasal ön uygulamaya yanıt olarak Sorghum bicolor'un fide ve biyokimyasal dinamiklerinin makine öğrenmesi analizi

Metrikler	R ²			RMSE			MAE		
Modeller	RF	Light GBM	SVR	RF	Light GBM	SVR	RF	Light GBM	SVR
Filizlenme (%)	0.513	0.495	0.194	6.635	6.762	8.537	5.449	5.535	5.760
Antioksidan (mg AAE/g)	0.702	0.696	0.469	2.726	2.755	3.640	1.816	1.937	2.566
TPC (mg GAE/g)	0.583	0.563	0.253	1.544	1.582	2.067	0.981	1.098	1.374
TFC (mg CE/g)	0.612	0.584	0.404	0.578	0.598	0.716	0.349	0.345	0.498
DPPH (% İnhibisyon)	0.935	0.931	0.638	1.749	1.807	4.134	1.331	1.437	2.631
Prolin (ppm = µg/g)	0.396	0.374	-0.137	737.867	751.191	1012.106	499.347	488.479	808.111

(AOx: antioksidan aktivitesi, DPPH: serbest radikal inhibisyon kapasitesi, TPC: Toplam fenolik içeriği, TFC: Toplam Flavonoid içeriği)

Kontrollü veya kontrolsüz koşullar altında bitki veya mahsullerin kurulması için düzgün çimlenme çok önemlidir. Çimlenme süreci çeşitli iç ve dış değişkenlerden etkilenir ve normalden herhangi bir sapma, düzensiz bitki gelişimine ve daha düşük mahsul üretimine yol açabilir. Kimyasal priming, optimum olmayan koşullar altında stres toleranslarını, çimlenmelerini ve büyümelerini iyileştirmek için tohumların veya bitkilerin kimyasal maddelerle işlenmesidir (Yıldırım ve ark., 2023; Margay ve Hassan, 2024). Gelişmiş stres

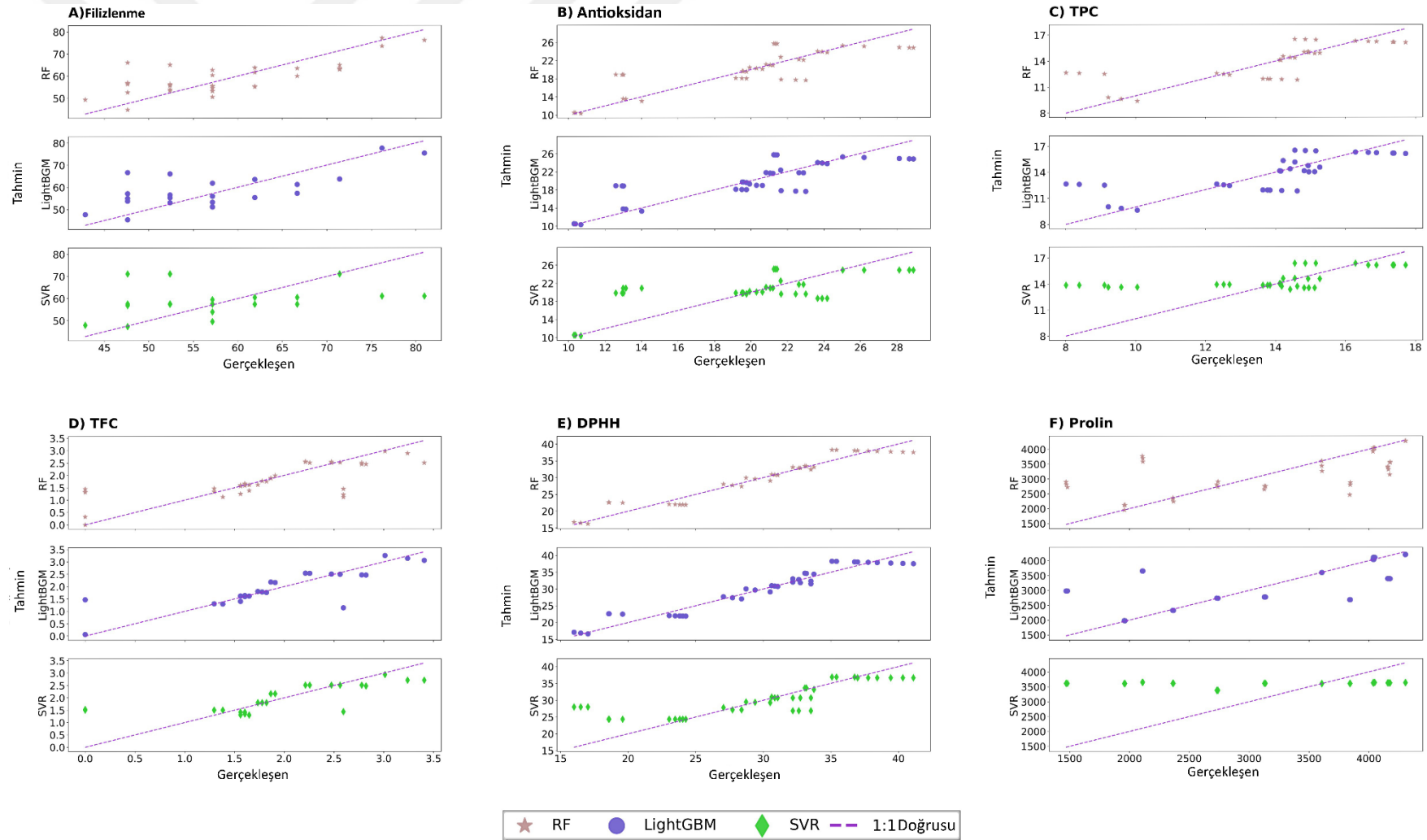
toleransı, iyileştirilmiş çimlenme, artan fide canlılığı, indüklenen sistemik edinilmiş direnç (SAR), iyileştirilmiş mahsul performansı, daha hızlı stresten kurtulma ve maliyet etkinliği dahil olmak üzere tarımsal üretkenliği ve dayanıklılığı önemli ölçüde artırır. Kimyasal priming, biyokimyasal ve moleküler düzeylerde koruyucu mekanizmaları harekete geçirerek bitkilerin kuraklık, tuzluluk, aşırı sıcaklıklar ve ağır metal toksisitesi gibi abiyotik streslerle daha iyi başa çıkmasını sağlar (Nair ve ark., 2022). Ayrıca, özellikle düşük veya düzensiz çimlenme oranlarına sahip tohumlar için su alımını ve enzim aktivasyonunu iyileştirerek çimlenmeyi hızlandırır. Kimyasal aşılama aynı zamanda daha iyi erken büyümeye, daha yüksek fotosentez verimliliğine ve daha iyi besin alımına yol açarak daha yüksek verim potansiyeline katkıda bulunur (Margay ve Hassan, 2024).

Hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi kimyasal priming uygulamaları, bitki büyümesi ve gelişimi üzerindeki olağanüstü etkisi nedeniyle dikkat çekmiştir. H_2O_2 , inatçı bitkilerin çimlenme sürecini hızlandırmak için bir kimyasal priming maddesi olarak kullanılır, ancak sterilizasyon, çimlenme artışı ve rejenerasyon oranları için bitki doku kültüründe kullanımı sınırlıdır. Ayrıca önemli ikincil metabolitler için bir uyarıcı görevi görür (Liu ve ark. 2021; Nik Muhammad Nasir ve ark. 2021). Bitkiler ve H_2O_2 arasındaki etkileşim karmaşıktır, ancak bitki metabolizması ve büyümesi için çok önemlidir. H_2O_2 'yi doğrudan veya dolaylı olarak bitkilere uygularken uygun dozun ve maruz kalma süresinin seçimi esastır. Aksine, TETA, onu endüstriyel ve tıbbi uygulamaları için çekici kılan güçlü şelatlama özellikleri gösteren umut verici bir kimyasal bileşiktir. TETA'nın bitki bilimindeki potansiyeli henüz araştırılmamış olsa da bitkilerde metal iyonu bulunabilirliğini, besin alımını ve stres tepkilerini düzenleyebileceği varsayılmaktadır. Dahası, antioksidan özellikleri oksidatif stresi hafifletebilir ve mahsullerde daha iyi büyüme ve dayanıklılığı teşvik edebilir.

Bu çalışma, *in vitro* yetiştirilen sorgum fideleri için biyokimyasal ve fizyolojik tepkileri düzenlemede iki farklı kimyasal priming maddesinin (H_2O_2 ve TETA) potansiyelini araştırmaktadır. H_2O_2 , bitkilerdeki antioksidan makinenin güçlü bir aktivatörüdür ve sonuçlar, H_2O_2 'nin hücresel yapıları stabilize ederek ve reaktif oksijen türlerini (ROS) temizleyerek stresi hafifletmede oldukça etkili olduğunu doğrulamıştır. 6 saat boyunca %2 H_2O_2 uygulaması en yüksek DPPH inhibisyonuyla sonuçlanmış, radikal temizleme aktivitesinde konsantrasyona bağlı bir artış olduğunu göstermektedir (Srivastava ve diğerleri, 2021). Aksine, TETA, H_2O_2 ile karşılaştırıldığında daha düşük etkinlik göstermiş

ve maksimum antioksidan aktivite 4 saat boyunca %3 TETA'da kaydedilmiştir. Değişkenlik, TETA'nın aşılama verimliliğinin, muhtemelen farklı kimyasal yapısı ve etki şekli nedeniyle uygulama koşullarındaki değişikliklere daha duyarlı olduğunu göstermektedir.

Sonuçlar ayrıca her iki etkenin etkinliğinde önemli farklılıklar göstermektedir, oksidatif stres toleransını artırmak için tohum aşılama sürecinin optimize edilmesinde konsantrasyon ve sürenin rolünü vurgulamaktadır. Kimyasal priming, oksidatif hasarı azaltmada ve bitki dayanıklılığını desteklemede önemli olan büyüme parametrelerini, antioksidan enzim aktivitelerini ve ikincil metabolit birikimini önemli ölçüde etkilemiştir (Yadav ve ark., 2024; Rawat ve ark., 2025). DPPH inhibisyon aktivitesi, TPC ve TFC hem H_2O_2 hem de TETA ile artmış olup hem enzimatik hem de enzimatik olmayan antioksidan mekanizmaları düzenleyen ROS aracılı sinyal yollarının neden olduğu gelişmiş bir antioksidan yanıtı göstermektedir (Shahzad ve ark., 2024). Benzer şekilde, artan DPPH inhibisyon seviyesi ve yukarı regüle edilmiş TPC ve TFC de oksidatif patlama yanıtına yol açmış ve bu da ROS'u temizlemek için fenolik ve flavonoid bileşiklerinin üretimini uyarmıştır (Hajam ve ark., 2023). Ayrıca, oksidatif stresi yönetmek için enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan savunmaların bir kombinasyonunun kullanılmasına yol açabilecek anahtar antioksidan enzimlerin H_2O_2 tarafından yukarı regüle edilmiş olması da olasıdır (Gill ve Tuteja 2010; Mittler, 2017).



Şekil 4.9. H₂O₂ ve TETA ile muamele edilmiş bitkilerin biyokimyasal analizi için makine öğrenmesi analizleri

(AOx: antioksidan aktivitesi, DPPH: serbest radikal inhibisyon kapasitesi, TPC: Toplam fenolik içeriği, TFC: Toplam Flavonoid içeriği)

Fidelerdeki H_2O_2 ve TETA tarafından artırılan TPC ve TFC seviyeleri, oksidatif strese karşı koymada ekstra metabolitler olarak önemli rollerini sergilemiştir. Fenolik ve flavonoid biyosentezi gibi aşırı metabolitlerin fenilpropanoid yoluyla düzenlendiği ve stres koşulları altında sıklıkla yukarıya doğru düzenlendiği iyi bilinmektedir (Iriti ve Faoro, 2009). Benzer şekilde, TPC ve TFC'deki bir artış, fenilpropanoid metabolizmasından sorumlu olan ve antioksidan açıdan zengin özelliklere sahip metabolitlerin dağılımına katkı fenilalanin amonyak-liyazın (PAL) aktivasyonunu düşündürmektedir. DPPH faaliyeti ile TPC/TFC seviyeleri arasındaki genel görünüm, fenoliklerin ve flavonoidlerin ROS detoksifikasyonunun rolünü sürdürmedeki rolü desteklenmektedir (Nikzad ve Parastar, 2021). Prolin içerikleri üzerindeki sonuçlar ayrıca H_2O_2 hem TETA tedavisinin rolünü göstermiştir. Prolinin oksidatif stres adaptasyonunda hem metabolik hem de koruyucu bir doğal olarak rolünü öne çıkarmaktadır (Ghaffari ve ark., 2019). Sonuçlar ayrıca, onun iki kimyasal ana maddesiyle antioksidan savunma sistemlerini güçlendirerek sorgulayarak gelişmiş büyüme ve biyokütle programını ortaya koymuştur. Bitkilerin daha iyi stres uyumu sağlamasını ve oksidatif strese rağmen daha yüksek metabolik aktiviteyi sürdürmesini sağlar. Büyüme artışını, ROS sinyali ve antioksidan metabolizmanın güçlendirilmesini, bitki karakteristik reaksiyonlarında oksidatif stres modülasyonunun arttırılmasını vurgulamaktadır.

Eğilimi ve tepkileri görüntülemek için geliştirilmiş ve programlamalı araçların entegre edilmesi, işlem kimyasal başlangıç öğelerinin öğrenilmesi reaksiyonlarının öğrenilmesi ve optimize edilmesi önemlidir. ANOVA ve RSRA'nın kullanımı, Kimyasal priming uygulamasının, gözeneklerin ve tedavi belirtilerinin temel biyokimyasal etkinin arttırılması gösterilmiştir. Birden fazla programlamalı modelin merkezinde, merkez stresin arttırılmasını arttırırken, kaynak girdilerini en az indirmek için birden fazla değişkeni ve bunların iletişimlerini analiz ederek, fide gelişimleri gibi optimum koşulları tahmin etmek için bir çerçeve sağlar (Godara ve ark., 2024). RSRA, Pareto grafikleri ve normal kalıplar gibi birden fazla grafik ve taşıma muhafazası ve etkiyi seçenekleri tanınır. Pareto grafik analizinin sonuçları, tüm çıkan parametreler için etkili faktör olarak işlem süresinin ortaya çıkması, çiçek özellikleri ve biyokimyasal süreçlerin iyileştirilmesinde zamansal olarak görülmesinin rolünü yeniden teyit etmektedir (Alkiayat, 2021). Ön uygulama maddesinin türünün, belirli bitki reaksiyonlarının düzenlenmesine katkısını daha da doğrulayan ikinci en önemli faktördü (Aox hariç). Dolayısıyla normal grafik analizi, ortaya çıkan normal durumu doğrulayarak modelin sağlamlığını ve tahmin doğruluğunu teyit etmiştir (Ali ve Aasim,

2024). Pareto grafikleri ile normal grafiklerin birlikte kullanılması, süreç gidişatına yönelik sistematik bir yaklaşımın ortaya çıkması, karmaşık biyolojik sistemlerde bunların kullanılabilirliği pekiştirilmektedir.

Değişkenler arasındaki korelasyonlar ısı haritası ve ağ grafikleri ile ölçülmüştür. Isı haritası sayısal değerleri görüntüler ve ilişkilerin büyüklüğünü ve yönünü vurgulamak için bir renk gradyanı kullanılmaktadır (Ali ve ark., 2024). Isı haritası analizinin sonuçları, biyokimyasal ve fizyolojik parametreler arasında önemli ilişkiler ortaya koymuş, H_2O_2 ve TETA arasında güçlü ancak negatif korelasyonlar göstermiştir. Oksidatif stres belirteçleri ve belirli metabolitler arasında ters bir ilişki olduğunu göstermiştir. Öte yandan, TPC, TFC, DPPH ve AOx için artan antioksidan kapasitesi ve serbest radikal temizleme aktivitesine katkıda bulunması, fenolik ve flavonoid bileşiklerin sinerjik etkisini göstermektedir. Isı haritası ayrıca AOx ve DPPH üzerinde zamana bağlı etkiyi göstermiş, artan antioksidan aktivite ve stres tepki mekanizmalarıyla sonuçlanmıştır (Sakinah ve ark., 2021; Ali ve ark., 2024).

Ağ grafiğinde, faktörler arasındaki bağlantı ve ilişkilerin gücü, birbirine bağlı çizgilerin kalınlığı ve rengi ile gösterilir, bu nedenle ilişkiler hakkında sezgisel bir anlayış sağlar ancak belirli sayısal kesinlikten yoksundur (Moretti, 2011; Mohamad-Matrol ve ark., 2018). Ağ grafiğine dayalı sonuçların analizi hem H_2O_2 hem de TETA için biyokimyasal ve fizyolojik parametreler arasında karmaşık ancak ters bir korelasyon olduğunu ortaya koymuştur. TPC, TFC, DPPH ve AOx için pozitif kenarlar, TPC ve TFC'nin antioksidan kapasitesini ve serbest radikal temizleme aktivitesini artırmadaki önemini ortaya koymuştur. Oysa zaman, AOx, DPPH ve prolin içeriği üzerinde orta düzeyde bir etki göstermiştir. Prolinin AOx ile bağlantısı, stres koşulları altında antioksidan yanıtları düzenlemedeki rolünü göstermiştir. Hem ısı haritasının hem de ağ grafiğinin sonuçları, oksidatif stres belirteçleri, antioksidan bileşikler ve fizyolojik yanıtlar arasındaki dinamik etkileşimi vurgular. Bitki bilimlerindeki karmaşık ilişkiyi anlamak, çok sayıda biyokimyasal ve çevresel faktörün manipülasyonu nedeniyle oldukça önemlidir ve genellikle ML modelleri (Türkoğlu ve ark., 2023; İslam ve ark., 2024) tarafından desteklenen modern hesaplamalı ve istatistiksel araçların uygulanmasıyla çözülebilir. Son yıllarda, bu modeller tuz stresi (Aasim ve ark., 2023) veya kimyasal priming (Aasim ve ark., 2024) altında çimlenme oranlarını ve büyüme modellerini tahmin etmek için kullanılmıştır. Benzer şekilde, derin öğrenme kontrollü koşullar altında fide oluşumunu kolaylaştırmış ve çimlenmenin tespiti ve izlenmesi için etkili olmuştur (Peng

ve ark., 2022). Bu çalışmada, üç performans metriğinin yardımıyla üç farklı ML'nin tahmin doğruluğu hesaplanmıştır. Her model, farklı biyokimyasal parametreler için değişen başarı dereceleri göstermiş, biyolojik veri tahmininde modellerin güçlü ve zayıf yönlerini sergilemiştir.

Sonuçlar, yüksek R^2 puanları ve düşük RMSE ve MAE değerleri ile RF modelinin DPPH inhibisyonu için en sağlam öngörücü olduğunu ortaya koymuş ve modelin oksidatif stres metabolizmasındaki doğrusal olmayan ilişkileri yakalamadaki etkinliğini göstermiştir. RF modelinin DPPH inhibisyonu için yüksek öngörü gücü, topluluk öğrenme modelleri tarafından iyi yakalanan enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan tepkilerle güçlü bir korelasyon olduğunu öne sürmektedir (Mittler, 2017). Ancak, RF modeli TPC için orta düzeyde performans ve prolin için zayıf öngörü yetenekleri sergilemiştir. Prolin için nispeten düşük öngörü doğruluğu, RF modelinin hem ozmotik dengeyi hem de oksidatif stres sinyallemesini içeren prolin biyosentezinin karmaşık, çok yollu düzenlenmesi nedeniyle biyokimyasal değişkenlikle mücadele ettiğini göstermektedir (Szabados ve Saviouré, 2010).

Öte yandan, LightGBM modeli DPPH inhibisyonu için karşılaştırılabilir performans göstermiş, ancak RF modeliyle karşılaştırıldığında TPC ve TFC için düşük tahmin etme yeteneği göstermiştir (Fadil ve ark., 2024). Modelin TPC ve TFC için zayıf performansı, minör metabolitlerdeki değişikliklere karşı daha fazla duyarlılığa atfedilebilir ve fenilpropanoid yolu aracılığıyla karmaşık metabolik düzenleme tarafından düzenlenebilir (Iriti ve Faoro, 2009). İlginç bir şekilde, LightGBM, daha düşük bir R^2 değerine ve daha yüksek bir RMSE'ye sahip olmasına rağmen, muhtemelen RF'nin topluluk tabanlı yapısı tarafından yakalanmayan prolin biyosentezindeki bazı doğrusal olmayan kalıpları yakalaması nedeniyle prolin tahmini için daha iyi performans gözlenmiştir. Bu gözlemler, LightGBM modeli için hiperparametrenin daha fazla ayarlanması gerektiğini göstermektedir. Bu, etkileşim terimleri, polinom özellikleri, biyokimyasal yol tabanlı değişken dönüşümleri (Ye ve Ouyang, 2024) ve biyokimyasal parametreler için ağırlık ataması (Katırcı ve ark., 2021) gibi özellik seçimi tekniklerini optimize etmeye yardımcı olabilir.

Test edilen modeller arasında SVR en zayıf olanıydı ve ayrıca nispeten yüksek RMSE ve MAE puanlarıyla negatif bir R^2 puanı sergiledi (Ghasemi ve ark., 2022). Ayrıca SVR

modelinin, çekirdek tabanlı bir yöntem bağımlılığı nedeniyle, DPPH inhibisyonu, TPC, TFC ve prolin seviyeleri için veri eğilimlerini etkili bir şekilde yakalayamadığı da kaydedilmiştir (Han ve ark., 2012). Bu, SVR modelinin biyokimyasal veri setinde bulunan karmaşık, doğrusal olmayan etkileşimleri yakalamak için uygun olmayabileceğini göstermektedir. ML modellerinin genel sonucu, antioksidan aktivite tahminleri için RF ve LightGBM modellerinin daha iyi performans gösterdiğini, ancak prolini tahmin etmede bunu başaramadığını ortaya koymuştur. SVR modeli sürekli olarak geride kalmaktadır ve bu da karmaşık doğrusal olmayan ilişkiler için uygun olmadığını göstermektedir (Tamilmani ve ark., 2023). Gelecekteki çalışmalar, özellik seçimi veya hiperparametre ayarı kullanarak TPC ve TFC tahmini için RF ve LightGBM modellerini optimize etmelidir (Katırcı ve ark., 2021; Wang ve ark., 2024). Prolin için zayıf performans ise veri yapısı incelemesi, normalizasyon veya ek özellikler kullanma ihtiyacını göstermektedir.

TETA'nın bitki büyümesini ve biyokimyasal tepkileri geliştirmek için umut vadeden bir kimyasal priming olarak potansiyeli ve geleneksel H_2O_2 ile karşılaştırılması. Hem TETA hem de H_2O_2 antioksidan aktiviteyi, TPC'yi ve prolin birikimini önemli ölçüde etkiler. Her iki kimyasal priming maddesinin karşılaştırılması, H_2O_2 'nin antioksidan kapasite ve DPPH inhibisyonu için üstün etkinliğini ortaya koymuştur. Bununla birlikte, TETA ayrıca prolin birikimi ve stres adaptasyonu üzerinde umut vadeden etkiler göstermiştir. TETA'nın benzersiz şelatlama özellikleri, besin alımını düzenlemek ve abiyotik strese karşı dayanıklılığı artırmak için yeni bir yol sunarak, bitki kimyasal ön uygulama stratejilerine değerli bir katkı olarak potansiyelini vurgulamaktadır. RSRA ve ML'nin entegrasyonu, bu maddelerin uygulama koşullarını optimize etmek için kapsamlı bir çerçeve sağlamıştır. Bulgular, TETA'nın H_2O_2 'ye tamamlayıcı bir yaklaşım sunan bir kimyasal priming maddesi olarak dönüştürücü potansiyelini vurgulamaktadır. TETA'nın bir kimyasal priming maddesi olarak tanıtılması, bitki metabolizması üzerindeki uzun vadeli etkileri ve daha geniş bir ürün yelpazesinde uygulanması için diğer kimyasal veya biyolojik uyarıcılarla birlikte kullanımı da dahil olmak üzere araştırma için yeni yollar açmaktadır. Gelecekteki araştırmalar, uygulama koşullarını optimize etmeye, bu maddelerin sinerjik etkilerini keşfetmeye ve çeşitli ürünler ve çevresel stres senaryoları genelinde bitki büyümesi, metabolizması ve dayanıklılığı üzerindeki uzun vadeli etkilerini araştırmaya odaklanmalıdır.

4.6. Mutajen Uygulaması ve Moleküler Analizler

Bu çalışmada, EMS ve NaN₃ gibi kimyasal mutajenlerin uygulanmasının ardından oluşan genetik değişimlerin tespit edilmesi amacıyla moleküler düzeyde analizler gerçekleştirilmiştir. Bitkisel materyalde meydana gelen mutasyonların sadece fenotipik değil, aynı zamanda genomik düzeyde değerlendirilmesi, mutajen uygulamalarının etkinliğini ve kalıcılığını ortaya koymak açısından önemlidir.

Bu kapsamda, mutajen uygulaması sonrasında seçilen örneklerde DNA izolasyonu gerçekleştirilmiş ve moleküler markör teknikleri ile analiz yapılmıştır. İlk olarak SCoT (Start Codon Targeted) primerleri kullanılarak genetik polimorfizm düzeyleri değerlendirilmiş, ardından daha derinlemesine bir analiz amacıyla iPBS (inter-Primer Binding Site) retrotranspozon esaslı markör sistemi uygulanmıştır.

4.6.1. DNA izolasyonu

Kimyasal mutajenler uygulandıktan sonra, genomik DNA, CTAB prosedürü kullanılarak *Sorghum bicolor* yaprak dokularından başarıyla elde edilmiştir.

Örneklerin çoğu, agaroz jel elektroforezinde güçlü, sağlam ve yüksek moleküler ağırlıklı DNA bantlarına sahipti ve çok az bulaşma veya RNA kontaminasyonu vardı. Bu, DNA özütlerinin hala sağlam olduğunu kanıtlamıştır. NanoDrop spektrofotometresi ile yapılan kantitatif testler, A260/A280 absorbans oranlarının 1,80 ile 2,00 arasında olduğunu göstermiş; bu, örneğin çok saf olduğu ve çok az protein kontaminasyonuna sahip olduğu anlamına gelmektedir. DNA konsantrasyonları 5 ila 25 ng/μL arasında değişiyordu. Daha genç yaprak dokularından alınan örnekler genellikle daha büyük verimler vermiştir.

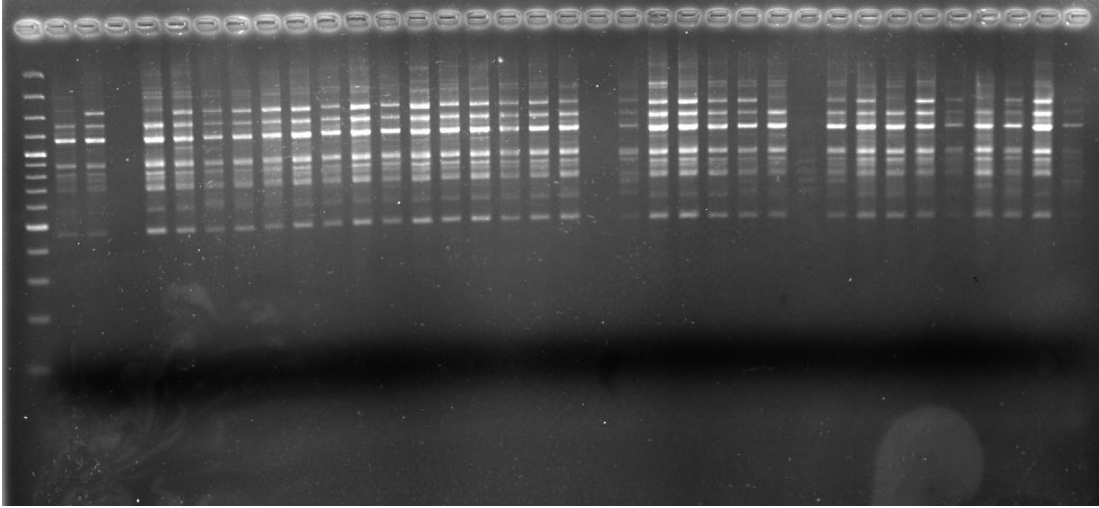
Genel olarak, DNA izolasyon işlemi iyi çalıştı ve tüm işlemler için aynı olmuştur. Toplanan DNA, daha sonraki SCoT ve iPBS belirteç testlerinde etkili bir şekilde kullanılmış ve bu da mutajenlerin neden olduğu genetik varyasyonu doğru bir şekilde ölçmeyi mümkün kılmıştır.

4.6.2. SCoT analizleri

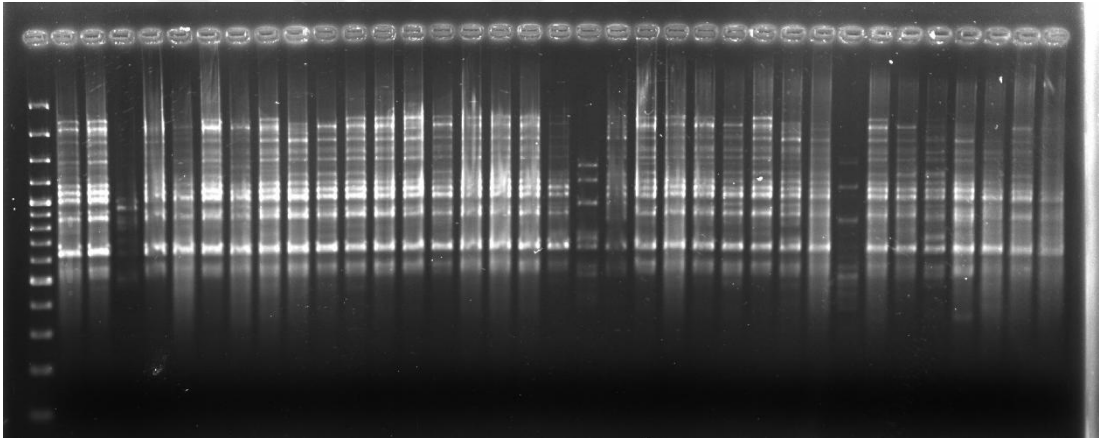
İki kimyasal mutajenle tedavi edilen *S. bicolor* genotipleri üzerinde yapılan SCoT (Başlangıç Kodonu Hedefli) işaretleyici çalışmasının gösterilen sonuçlarına göre etil metan sülfonat (EMS) ve sodyum azid (NaN_3) DNA amplifikasyon profilleri çoğu örnekte belirgin ve tutarlı bantlama desenleri göstermektedir. Bu, genomik DNA'nın yeterince iyi olduğu ve SCoT primerlerinin hedef bölgeleri çoğaltmak için iyi çalıştığı anlamına gelir. Bantlar belirgin ve güçlüdür, bu da PZR koşullarının iyi optimize edildiği anlamına gelir. Jel resminde ayrıca önemli bir bozulma veya inhibisyon belirtisi görülmemektedir.

Farklı örneklerin bantlama desenlerinde, özellikle kontrol grubu ile mutajenlere maruz kalan grup arasında belirgin farklılıklar vardır. Bu farklılıklardan bazıları yeni bantların ortaya çıkması, bazı bantların yokluğu ve bantların görünürlüğündeki değişikliklerdir (Resim 4.1). Bu tür değişiklikler, polimorfik lokusların mutajenik tedavilerle oluşturulduğunu göstermektedir. EMS ve sodyum azidin nokta mutasyonlarına veya genomda küçük ölçekli değişikliklere neden olabileceği bilinmektedir. Başlangıç kodonu (ATG) yakınındaki gen açısından zengin alanlara odaklanan SCoT yaklaşımı bu tür mutasyonlara karşı hassastır. Bu nedenle, görülen polimorfizmler kimyasal işlemlerden kaynaklanan genlerdeki değişikliklerden kaynaklanmaktadır.

Jeldeki polimorfizm miktarı, SCoT belirteç yönteminin EMS ve NaN_3 'nin neden olduğu genotip değişikliklerini bulmak için iyi çalıştığını göstermektedir. Bu, mutagenezi sürecinin işe yaradığını ve bu ajanların mutant yetiştirme çalışmaları için önemli olan genetik çeşitliliği destekleyebileceğini göstermektedir. Çok bantlı profiller oluşturmak için birden fazla SCoT primeri kullanmak, tedavi edilen örnekler arasındaki genetik çeşitliliği görmeyi daha da kolaylaştırır.



Resim 4.1. EMS (etil metan sülfonat) ve sodyum azid (NaN_3) ile muamele edilmiş *Sorghum bicolor* örneklerine ait SCoT 1 analiz sonuçları



Resim 4.2. EMS (etil metan sülfonat) ve sodyum azid (NaN_3) ile muamele edilmiş *Sorghum bicolor* örneklerine ait SCoT 4 analiz sonuçları.

Daha yüksek konsantrasyonlarda veya daha uzun süreler boyunca tedavi edilen örnekler daha fazla polimorfik bant veya bantlama desenlerinde daha belirgin değişiklikler göstermektedir (Resim 4.2). Bu değişiklikler daha yüksek bir mutasyon sıklığına bağlanabilir. Bu tür görsel karşılaştırmalar, gelecekteki üreme prosedürleri için en iyi mutajen dozlarını seçmek için yararlı olduğu düşünülmektedir.

Bu SCoT jel elektroforezi resmi hem EMS'nin hem de sodyum azidin *Sorghum bicolor* genomunda görülebilen değişikliklere neden olabildiğini göstermektedir. Sonuçlar, SCoT belirteçlerinin mutajenlere maruz kalmış popülasyonlarda genetik çeşitliliği parmak izi çıkarmak ve ölçmek için yararlı ve güvenilir bir yol olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlar

bize, çiftçilik için önemli olabilecek yeni veya daha iyi özelliklere sahip olabilecek farklı mutant hatları bulmak için moleküler bir temel sağlar.

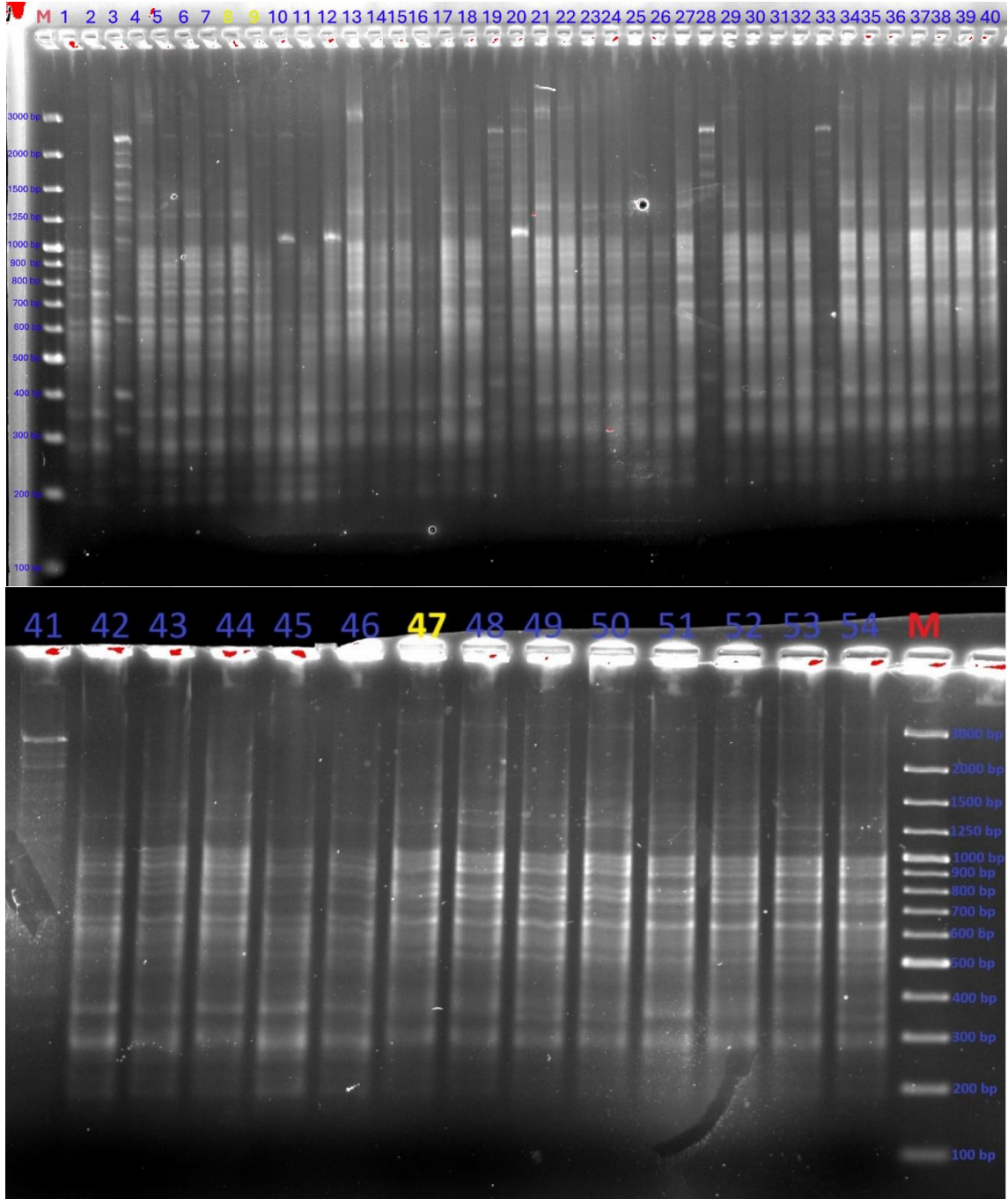
4.6.3 İBPS analizleri

Jel elektroforezi fotoğrafları, kimyasal mutajenlerle, Sorghum bicolor numuneleri üzerinde yapılan bir iPBS (Inter-Primer Binding Site) işaretleyici testinin sonuçlarına göre çoğu şeritte, bantlama desenleri net olarak görülmüştür, bu da amplifikasyonun işe yaradığı ve DNA şablonunun iyi kalitede olduğu anlamına gelir. Her jelin, polimorfizm seviyelerini belirlemek için boyut referansı olarak kullanılabilen tekdüze bir moleküler ağırlık merdiveni vardır.

iPBS primer 2074 ile üretilen bantlama deseni analizi

iPBS 2074 amplifikasyonu, farklı kimyasal mutajenlerle muamele edilmiş 54 Sorghum bicolor örneği arasında önemli genetik çeşitlilik olduğunu göstermiştir (Resim 4.3). Kontrol örneğinin (şerit 8, 9 ve 47) aksine, ağırlıklı olarak 700 ila 1000 bp arasında tekdüze ve belirgin bantlama desenleri gösteren diğer muamele edilmiş örnekler, bantlama desenlerinde önemli değişiklikler sergilemiştir. Yeni bantların ortaya çıkması, kontrole özgü bantların olmaması ve bant yoğunluğundaki değişiklikler, muhtemelen retrotranspozon mobilizasyonu yoluyla mutajen kaynaklı genomik varyasyonu göstermektedir.

EMS ile muamele edilmiş örneklerin (yani 1-5, 10-12, 16-17, 22-25, 30-33, 35-37, 42-44 ve 46 numaralı örnekler) derinlemesine bir analizi, minimum konsantrasyonların (1 mg/L) ve kısa maruz kalma sürelerinin (2 saat) bile önemli genomik değişikliklere yol açabileceğini ortaya koymaktadır. 3. numune (2 mg/L EMS, 2 saat) ve 33. numune (3 mg/L EMS, 6 saat), kontrollerde bulunmayan 1250-2000 bp bant seviyesinde varyasyon gösterdi. Benzer şekilde, 37-39. numuneler (sırasıyla EMS, 2-3 mg/L, 2-6 saat), karmaşık bir kromozomal yeniden düzenlenme modelini gösteren, artan sayıda bant ve daha dağınık profiller sergiledi. 3. numune, önemli bir mutajenik etkiye işaret eden kalın ve çeşitli bantlar sergiledi.



Resim 4.3. iPBS2074 primeri ile elde edilen *Sorghum bicolor* örneklerinin %1,5 agaroz jelde PZR bant profilleri. M: DNA marker; 1–54: farklı mutajen uygulamalarına ait örnekler

NaN₃ ile muamele edilen numuneler (6-7, 13-15, 18-21, 26-29, 34, 40, 45 ve 48-54 dahil) benzersiz bant desenleri sergiledi. 41. numune (NaN₃ 2 mg/L, 2 saat), yaklaşık 1250 ve 3000 bp'de belirgin ve yoğun bantlar sergilerken, 52. numune (NaN₃ 2 mg/L, 6 saat), 600 ila 900 bp aralığında birkaç ek bant gösterdi. 49, 51 ve 53 numaralı numuneler, sodyum azidin mutajenik potansiyelini daha da doğrulayan çeşitli profiller sergiledi.

Ayrıca, 5 ve 18 numaralı numuneler de dahil olmak üzere birden fazla numunede yayma veya yaygın bantların görülmesi, kısmi DNA bozulması veya artan retrotranspozon aktivitesinden kaynaklanan önemli genomik yeniden düzenlemeyi düşündürülebilir. Bu durum, mutajenik yanıtın, mutajenin türüne ve konsantrasyonuna, maruz kalma süresine ve numunenin doğal genetik geçmişine bağlı olarak dalgalanabileceğini göstermektedir.

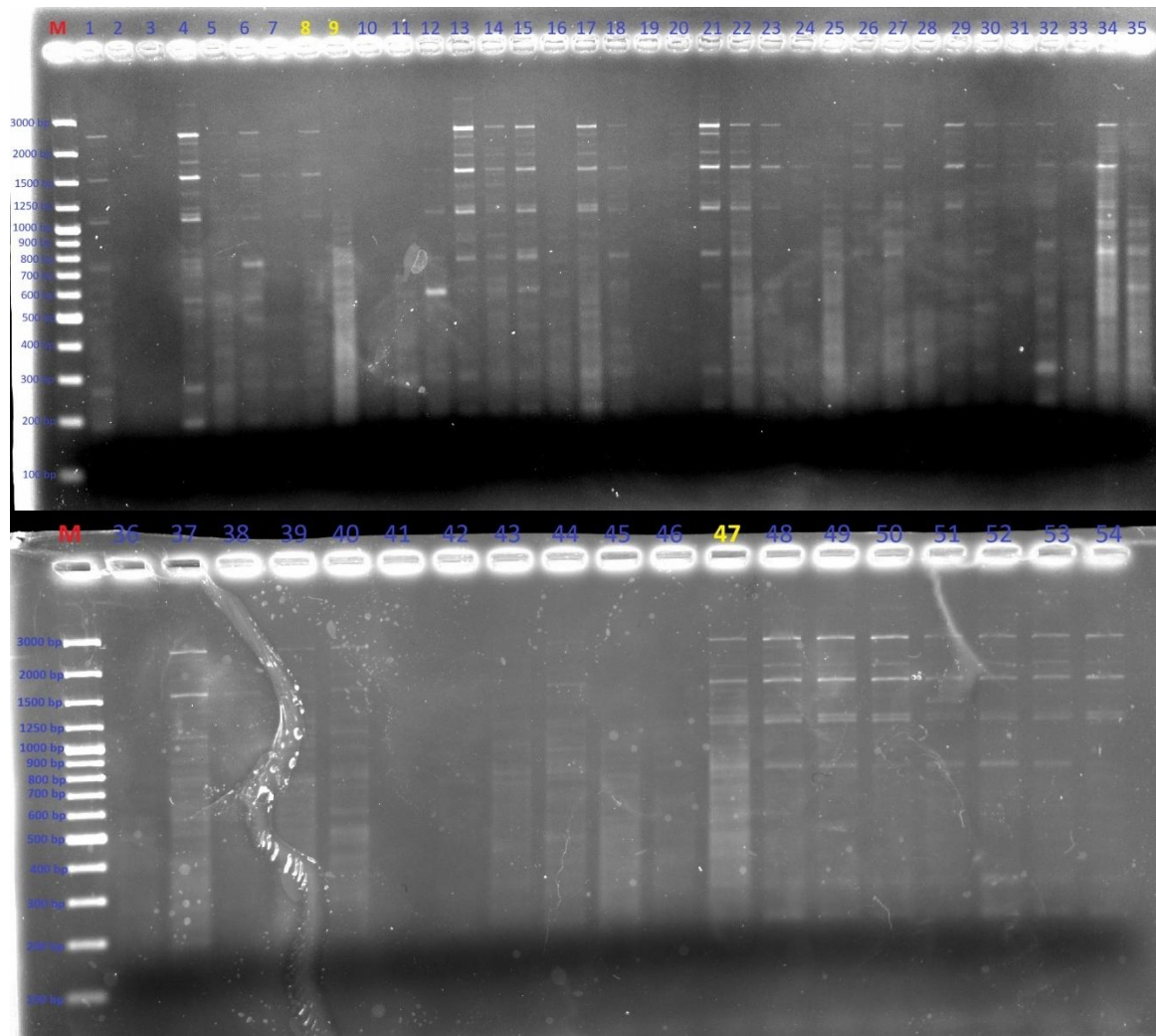
iPBS 2074 primerinden elde edilen bulgular hem EMS hem de NaN_3 uygulamalarının sorgum genomunda bant değişikliklerini etkili bir şekilde indüklediğini göstermektedir. Bant kazanımları ve kayıpları, bant yoğunluğundaki değişiklikler ve yayma desenlerini kapsayan gözlemlenen varyans, kimyasal mutageneze karşı dinamik genomik tepkiyi vurgulamaktadır. Sonuç olarak, iPBS 2074, bu çalışmada incelenen 54 örnekte de görüldüğü gibi, özellikle geniş bir uygulama yelpazesinde, mutagenize edilmiş bitki popülasyonlarında retrotranspozon aracılı genetik çeşitliliği değerlendirmek için güvenilir ve bilgilendirici bir primer gibi görünmektedir.

iPBS primer 2245 ile üretilen bantlama deseni analiz

iPBS 2245 primeri kullanılarak yapılan jel elektroforezi sonuçları, EMS ve sodyum azit (NaN_3) dahil olmak üzere kimyasal mutajenlere tabi tutulan *Sorghum bicolor* örneklerinde önemli genetik çeşitlilik göstermiştir (Resim 4.4). Toplam 54 örnek incelenmiştir. Kontrol örnekleri (şerit 8, 9 ve 47), mutajene edilmemiş bitkilerdeki başlangıç retrotranspozon aktivitesini gösteren, ağırlıklı olarak 600 ila 1250 bp arasında değişen, belirgin ve kararlı bant desenleri sergilemiştir.

Tersine, çok sayıda işlenmiş örnek, bant profillerinde yeni bantların ortaya çıkması ve kontrollerde gözlenen bantların yokluğu ile karakterize edilen önemli değişiklikler sergilemiştir. EMS işlemine tabi tutulan örnekler, 4 (2 mg/L EMS, 6 saat), 12 (2 mg/L EMS, 6 saat), 22-25 (1-2 mg/L EMS, 4-6 saat) ve 35 (2 mg/L EMS, 2 saat) dahil olmak üzere, kontrol örneklerinde bulunmayan 700-1200 bp aralığında yeni bantlar sergiledi. Bu değişiklikler, EMS'nin retrotranspozon mobilizasyonunu ve genomik yeniden düzenlemeleri indüklediğini göstermektedir. 35 numaralı örnek, yoğun ve karmaşık bir bant deseni sergilemiş olup, bu da potansiyel olarak önemli derecede mutajen kaynaklı kromozomal değişikliklere işaret etmektedir.

Benzer şekilde, 6-7, 13, 21, 26-29, 34, 40, 45 ve 48-54 numaralı örnekler de dahil olmak üzere sodyum azide (NaN_3) tabi tutulan örneklerde bant desenlerinde değişiklikler görülmüştür. 50-54 numaralı örnekler, 1000-3000 bp aralığında yüksek bant sayıları ve yoğunlukları sergilemiştir. Bu durum, NaN_3 'nin retrotranspozon aracılı genomik polimorfizmleri tetiklediğini göstermektedir. 48 numaralı örnek (3 mg/L NaN_3 , 2 saat), kontrollerden daha belirgin ve çeşitli bantlar sergilemiş ve bu da NaN_3 'nin bir mutajen olarak etkinliğini doğrulamıştır.



Resim 4.4. iPBS2245 primeri ile elde edilen *Sorghum bicolor* örneklerinin %1,5 agaroz jelde PZR bant profilleri. M: DNA Marker; 1–54: farklı mutajen uygulamalarına ait örnekler

İkinci jel (36-54 numaralı şeritler), özellikle 36-41 numaralı şeritlerde, muhtemelen jel döküm sorunları veya elektroforez sırasında oluşan hava kabarcıklarından kaynaklanan kısmi teknik bozulmalar göstermiştir. Bu hatalar, belirli bantların keskinliğini ve

çözünürlüğünü bozmuştur. Bu şeritlerden elde edilen veriler dikkatli bir şekilde incelenebilse de doğru bir karşılaştırma gerekiyorsa bu örneklerin tekrarlanması ihtiyatlı bir yaklaşım olacaktır. Bu teknolojik kısıtlama çalışmada kaydedilmelidir.

Ayrıca, bazı örnekler (örneğin, 5, 18, 31), düzensiz amplifikasyon, retrotranspozon hiperaktivitesi veya olası DNA degradasyonunu işaret edebilecek şekilde yayılmış veya dağınık bantlar sergilemiştir. Bu bulgular, kimyasal mutajenlerin karmaşık ve çeşitli genomik tepkilere yol açabileceği fikrini daha da desteklemektedir.

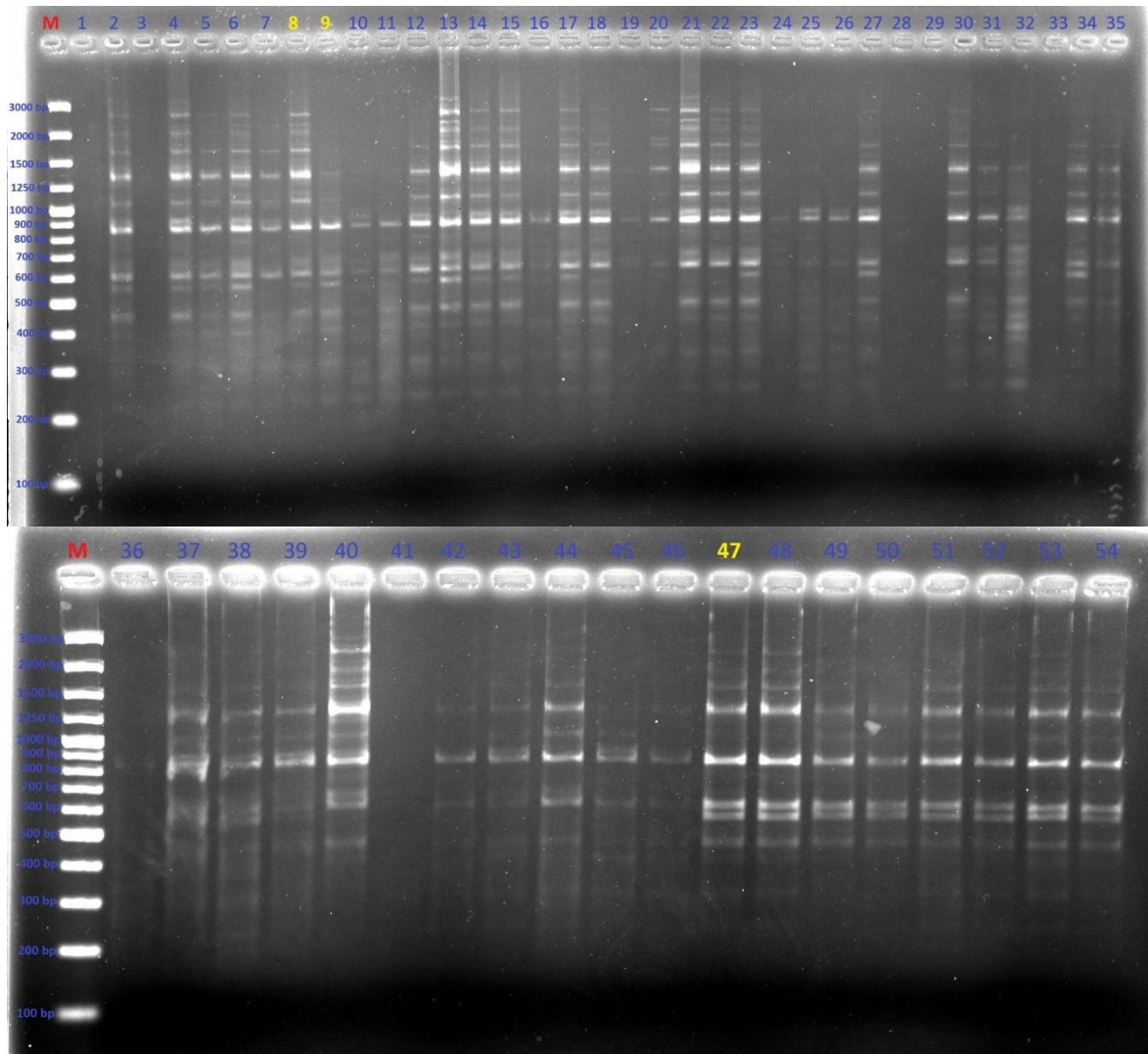
Sonuç olarak, iPBS 2245 primeri, *Sorghum bicolor*'da mutajen kaynaklı genetik varyasyonu belirlemede bir belirteç olarak etkililiğini göstermiştir. Hem bantların edinilmesini hem de kaybını ve yoğunluktaki değişimleri kapsayan tespit edilen bant polimorfizmleri hem EMS'nin hem de NaN_3 'nin, konsantrasyona ve maruz kalma süresine bağlı olarak retrotranspozonla ilişkili genomik modifikasyonları indüklediğini göstermektedir. Jelin bir bölümündeki küçük teknik hatalara rağmen, kapsamlı veriler, iPBS 2245'in kimyasal olarak mutajenize edilmiş bitki popülasyonlarında retrotranspozon bazlı polimorfizmi değerlendirmek için uygunluğunu doğrulamaktadır.

iPBS primer 2382 ile üretilen bantlama deseni analizi

iPBS 2382 primeri için agaroz jel elektroforezi, EMS (etil metansülfonat) ve sodyum azit (NaN_3) ile kimyasal mutajen uygulamalarının, *Sorghum bicolor* örneklerinde önemli retrotranspozon aracılı genetik polimorfizm ortaya çıkardığını göstermiştir (Resim 4.5). Her iki mutajenin farklı konsantrasyonlarını ve maruz kalma sürelerini kapsayan toplam 54 örnek değerlendirilmiştir. Mutajenik uygulama yapılmayan kontrol örnekleri (şerit 8, 9 ve 47), çoğunlukla 500-900 bp aralığında, tekdüze, tekrarlanabilir ve belirgin bant desenleri sergilemiştir. Bu bantlar, uygulama yapılmamış *Sorghum* genomunun doğal retrotranspozon yapısını göstermekte ve mutajen uygulanmış örneklerle karşılaştırma için bir referans sağlamaktadır.

EMS uygulanan grupta, çok sayıda örnek kontrol profillerinden önemli ölçüde sapmalar göstermiştir. Örneğin, örnek 4 (2 mg/L EMS, 6 saat) bant deseninde belirgin farklılıklar gösterdi; bunlardan bazıları, kontrol örneklerinde çoğunlukla belirgin olmayan bir bölge

olan 800-1200 bp'de ortaya çıktı. Oluşturulan bantlar, EMS'nin retrotranspozon mobilizasyonunu veya genomik yeniden düzenlemeyi tetiklemiş olabileceğini ve bu da yeni amplifikasyon ürünlerinin ortaya çıkmasına yol açmış olabileceğini göstermektedir. Örnek 32 (1 mg/L EMS, 2 saat), kontrol profilinden belirgin şekilde farklı ve yaygın olan yoğun bant sayısının yüksek olması nedeniyle dikkat çekiciydi. Bu örnek, muhtemelen EMS uygulamalarındaki en yüksek mutasyon yoğunluklarından birine örnek teşkil etmektedir. Benzer şekilde, NaN₃ ile tedavi edilen örnek 13, mutajen türünden bağımsız olarak güçlü bir genomik tepkiyi gösteren karşılaştırılabilir amplifikasyon karmaşıklığı sergiledi.



Resim 4.5. iPBS2382 primeri ile elde edilen *Sorghum bicolor* örneklerinin %1,5 agaroz jelde PZR bant profilleri. M: DNA Marker; 1–54: farklı mutajen uygulamalarına ait örnekler

NaN₃ ile tedavi edilen grup, önemli polimorfizm gösterdi. 6 numaralı örnek (2 mg/L NaN₃, 2 saat) belirgin güçlü bantlar gösterirken 7 numaralı örnekte (4 mg/L NaN₃, 4 saat) ise belirgin bant kayıpları gözlenmiştir. Kontrol örneklerinde bantlar yoktu ve bu da aktif mutajen kaynaklı modifikasyonları gösteriyordu. 53 numaralı örnek (3 mg/L NaN₃, 4 saat) 900-1000bp aralığında benzersiz bant içeriyordu ve önemli moleküler farklılaşma gösteriyordu. Bu örneklerde tespit edilen bantların artan miktarı ve yoğunluğu, EMS'ye benzer şekilde sodyum azidin retrotranspozon dizilerini etkili bir şekilde aktive ettiğini veya primer bağlanma bölgelerini etkileyen nokta mutasyonları üreterek farklı amplifikasyon modellerine yol açtığını göstermektedir.

Her iki örnek setinin (1-35 ve 36-54) jel görüntüleri, karşılaştırmalı analiz için yeterli bant çözünürlüğüyle yüksek kalite sergiledi. 40 ve 48 numaralı şeritler, kalın ve katmanlı bantlar sergileyerek, potansiyel olarak artmış retrotranspozon amplifikasyonunu veya çok sayıda insersiyon olayını gösteriyordu. Bu karmaşık profiller, artan genomik bozulma ile ilişkili olup, uygulanan tedavilerin mutajenik kapasitesini daha da vurgulamaktadır.

Sonuç olarak, iPBS 2382 primeri, *S. bicolor*'da mutajen kaynaklı genomik değişiklikleri belirlemede moleküler bir belirteç olarak olağanüstü duyarlılık ve etkinlik göstermiştir. 54 örnekteki bant sayısı, kuvveti ve lokasyonundaki farklılıklar, uygulanan mutajenin türünü, konsantrasyonunu ve süresini göstermektedir. Hem EMS hem de NaN₃ uygulamaları, retrotranspozon aracılı yollar aracılığıyla genomik çeşitlilik oluşturmadaki etkinliklerini vurgulayan önemli polimorfizmler üretmiştir. Sonuç olarak, iPBS 2382, mutajenize edilmiş bitki popülasyonlarında genom çapındaki değişiklikleri değerlendirmek için güçlü bir araç görevi görerek, özellikle sorgum ve muhtemelen diğer bitki türlerinde mutasyon ıslahı ve genetik çeşitlilik araştırmaları için faydalı olduğunu kanıtlamıştır.

iPBS primer 2385 ile üretilen bantlama deseni analizi

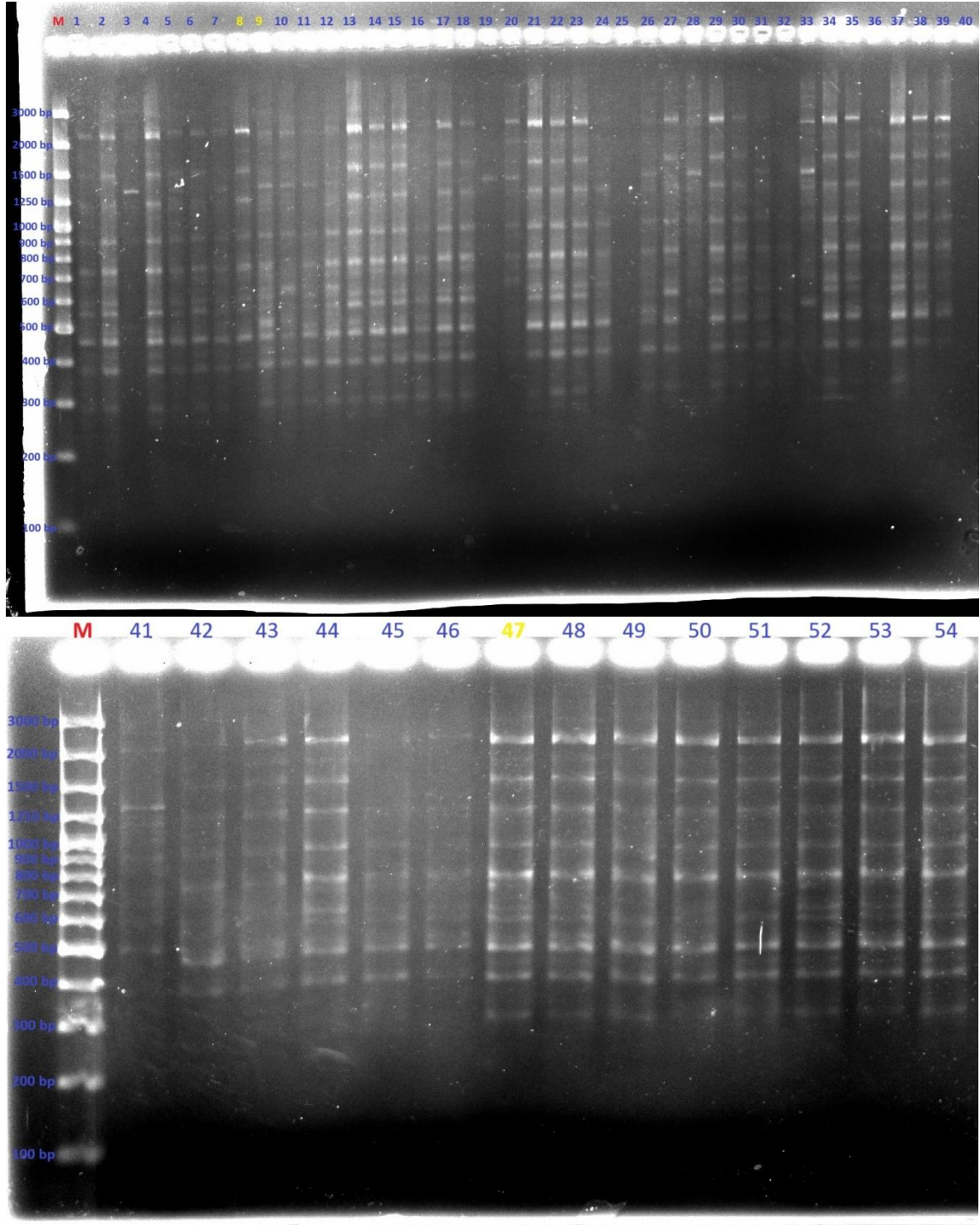
iPBS 2385 primeri kullanılarak yapılan agaroz jel elektroforezi çalışması, kimyasal mutajenler EMS ve NaN₃'ye tabi tutulan *S. bicolor* örnekleri arasında önemli retrotranspozon kaynaklı genetik polimorfizm göstermiştir (Resim 4.6). Her iki mutajenin farklı dozları ve maruz kalma süreleri de dahil olmak üzere çeşitli uygulama koşullarını kapsayan toplam 54 örnek incelenmiştir. Kontrol örneklerinin 8, 9 ve 47. bantları, ağırlıklı olarak 600 ila 1000

bp arasında değişen tutarlı ve tekrarlanabilir bantlama desenleri sergilemiştir. Bu bantlar, uygulama yapılmamış Sorgum bitkilerindeki temel retrotranspozon aktivitesini göstermekte ve mutajenik uygulamaların etkisini değerlendirmek için bir karşılaştırma ölçütü işlevi görmüştür.

EMS ile uygulanan örneklerde kontrol desenlerinden önemli sapmalar gözlemlenmiştir. Birçok örnekte, kontrol profillerinde bulunmayan yeni bantların ortaya çıktığı, beklenen bantların kaybolduğu ve bazı durumlarda bant yoğunluğunun ve karmaşıklığının arttığı görülmüştür. Örnek 4 (2 mg/L EMS, 6 saat), örnek 20 (1 mg/L EMS, 6 saat) ve örnek 37 (2 mg/L EMS, 6 saat), belirgin şekilde değiştirilmiş bantlama profilleri göstermiştir. Örnek 37, 800-1100 bp aralığında birden fazla yoğun kümelenmiş bantla dikkat çekici bir şekilde sıra dışıydı ve bu da EMS maruziyetine bağlı önemli retrotranspozon aktivasyonu veya yapısal genomik değişikliklere işaret ediyordu. Bu veriler, EMS'nin retrotranspozon bölgelerinde muhtemelen insersiyon, delesyon veya yeniden düzenleme olayları da dahil olmak üzere bölgeye özgü genomik değişikliklere yol açtığını göstermektedir.

Benzer şekilde, NaN_3 ile muamele edilen örnekler önemli genetik çeşitlilik göstermiştir. Örnek 6-7, 14-15, 18-21, 26-29, 34, 40, 45 ve özellikle 48-54, kontrollerden belirgin şekilde farklılaşan bantlama desenlerine sahipti. 54 numaralı örnekte, kontrollerde bulunmayan veya zar zor tespit edilebilen 600-900 bp aralığındaki yeni bantlar belirgin bir şekilde ortaya çıktı. 53 numaralı örnek (3 mg/L NaN_3 , 4 saat), NaN_3 'ye karşı dikkate değer bir genomik tepkiyi 600-700 bp aralığında tanımlanabilir bant sergiledi. Bu, sodyum azidin düşük konsantrasyonlarda ve kısa pozlama sürelerinde bile mutajenik potansiyelini vurgulamaktadır.

Her iki fotoğraftaki jel kalitesi (1-40 numaralı şeritler ve 41-54 numaralı şeritler), geçerli bir karşılaştırma için yeterince yüksekti. Bantların netliği ve gücü, amplifikasyon modellerinin hassas bir şekilde değerlendirilmesini kolaylaştırdı. Bazı örnekler (özellikle 48, 50 ve 52 numaralı örnekler), 600-1000 bp aralığında belirgin, iyi tanımlanmış bantlar sergiledi ve bu da mutagenез uygulamalarının kontrol koşulları altında genellikle sessiz veya stabil olan genomik bölgelerin aktivasyonunu tetiklediği fikrini güçlendirdi. EMS ile muamele edilen örnekler, özellikle 4 ve 33, şiddetli retrotranspozon aktivitesi ve karmaşık genomik yeniden yapılanmanın göstergesi olan yoğun bantlama profilleri sergilemiştir.



Resim 4.6. iPBS2385 primeri ile elde edilen *Sorghum bicolor* örneklerinin %1,5 agaroz jelde PZR bant profilleri. M: DNA Marker; 1–54: farklı mutajen uygulamalarına ait örnekler

Sonuç olarak, iPBS 2385 primeri, *Sorghum bicolor*'da mutajen kaynaklı genetik varyasyonu belirlemede bir belirteç olarak önemli bir etkinlik göstermiştir. Bantların edinilmesi ve yok edilmesi ile bant yoğunluğu ve dağılımındaki dalgalanmaları kapsayan tespit edilen

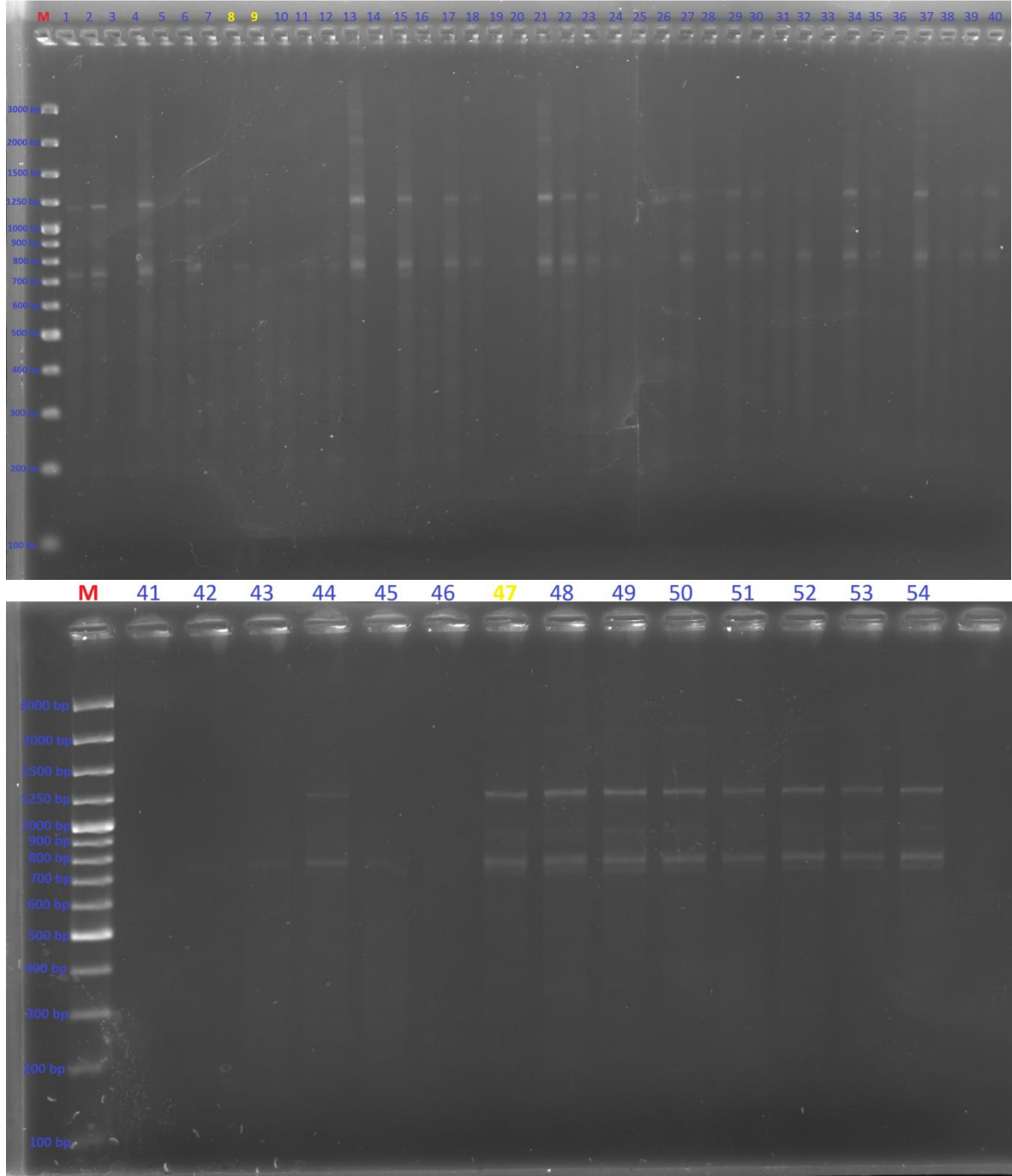
polimorfik değişiklikler, EMS ve NaN_3 uygulamalarının retrotranspozon yoğun genomik alanlar üzerindeki benzersiz etkilerini ortaya koymaktadır. Bulgular, her iki mutajenin de tedaviye bağlı olarak genomik modifikasyonlara yol açtığını ve iPBS 2385'in bu değişiklikleri izlemek için güvenilir bir araç görevi gördüğünü açıkça göstermektedir.

iPBS primer 2389 ile üretilen bantlama deseni analizi

iPBS 2389 primeri kullanılarak elde edilen jel elektroforez görüntüsü, farklı mutajen uygulamalarına tabi tutulan örnekler arasında önemli polimorfizm ortaya koymuştur (Resim 4.7). Kontrol örnekleriyle (şerit 8, 9 ve 47) karşılaştırıldığında, esas olarak 700 bp civarında tutarlı bant desenleri ve 1000-1250 bp aralığında daha zayıf bantlar sergileyen bu örnekler, bant sayısı ve yoğunluğunda belirgin bir farklılık göstermiştir. Bu farklılıklar, potansiyel olarak retrotranspozon aktivasyonu veya baskılanmasından kaynaklanan mutajen kaynaklı genetik değişikliklerin göstergesidir.

4, 22, 23, 25 ve özellikle 33 gibi EMS ile uygulanan örneklerin bant profillerinde değişiklikler gözlenmiştir. Özellikle 33. örnek (3 mg/L EMS, 6 saat), 900-1000 bp civarında belirgin bantların görüldüğü yüksek düzeyde polimorfizm göstermiştir; bu da bu uygulamanın önemli genomik varyasyonlara neden olduğunu düşündürmektedir. Benzer şekilde, 28, 29 ve 40 gibi NaN_3 ile muamele edilmiş numuneler, özellikle 700 ila 1000 bp arasında, kontrol numunelerinde bulunmayan benzersiz bantlar göstermiştir. Bunlar arasında, 21 numaralı numune (2 mg/L NaN_3 , 4 saat), hem ek bant oluşumu hem de artan bant yoğunluğu göstermesiyle dikkat çekmiş ve belirgin bir mutajenik etkiyi vurgulamıştır.

Ayrıca, 44 numaralı numune (2 mg/L EMS, 4 saat), 800-900 bp civarında ekstra bantların ortaya çıkmasıyla orta düzeyde bant çeşitliliği göstermiştir. Bu bulgular toplu olarak hem EMS hem de NaN_3 muamelelerinin *S. bicolor*'da tespit edilebilir genetik varyasyona neden olduğunu ve iPBS 2389 primerinin retrotranspozon bazlı polimorfizm yoluyla bu tür değişiklikleri ortaya çıkarmada etkili olduğunu doğrulamaktadır. Muamele edilmiş numunelerde gözlemlenen bantlama desenlerindeki değişiklikler, genomik modifikasyonlara dair güçlü kanıtlar sunmakta ve kimyasal mutajenlerin yeni genetik çeşitlilik oluşturmadaki faydasını desteklemektedir.



Resim 4.7. iPBS2389 primeri ile elde edilen *Sorghum bicolor* örneklerinin %1,5 agaroz jelde PZR bant profilleri. M: DNA Marker; 1–54: farklı mutajen uygulamalarına ait örnekler

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmanın amacı, kimyasal mutajenlerin *Sorghum bicolor*'ı nasıl etkilediğine bakmak için *in vitro* kültür tekniklerini ve moleküler belirteç tabanlı yöntemleri kullanmaktır. Ana araştırma konusu, çeşitli sürelerde kullanılan etil metansülfonat (EMS) ve sodyum azidin (NaN_3), sorgumda görülebilen ve gelecek nesillere aktarılabilen genetik değişikliklere neden olup olamayacağıydı. Ayrıca, bu değişiklikleri takip etmek için DNA parmak izi tekniklerinin nasıl kullanılabileceği de incelenmiştir. Bu çalışmanın nedeni, çok fazla biyokütleyle sahip kuraklığa dayanıklı bir C4 tahılı olan cins sorgumu mutasyona uğratmak için hızlı, tekrarlanabilir ve uygun maliyetli yollar bulmaktır, böylece daha geniş bir genetik temele sahip olacaktır.

Çalışma, *in vitro* bitki yetiştiriciliğinin önemli bir parçası olan tohum sterilizasyonunun optimizasyonu ile başlamıştır. Mikrobiyal kontaminasyonu azaltırken tohumları canlı tutmak için farklı kimyasal sterilizasyon yöntemleri ve zaman uzunlukları araştırılmıştır. Sterilize etmenin en iyi yolu, alanı kısa bir süre %70 etanol ile, ardından sodyum hipoklorit (NaOCl) solüsyonu ile işlemek olduğu gözlemlenmiştir. Bu adımı optimize etmek, yalnızca tohumlarda kontaminasyonu önlemekle kalmamış, aynı zamanda daha sonraki mutajenezi süreçleri için gerekli olan aseptik kültürlerin güvenilir bir şekilde geliştirilmesi için de zemin hazırlamıştır.

Sterilize edildikten sonra, tohumlar üç farklı süre boyunca iki kimyasal mutajene, EMS ve NaN_3 'ye tabi tutulmuş: 2, 4 ve 6 saat. Mutajenlerle tedavi edilen tohumlar kontrollü bir *in vitro* ortamda büyütülmüş ve çimlenme oranı, hızı ve tekdüzeliği bir hafta boyunca ölçülmüştür. Her iki mutajenin de zamanla değişen çimlenme üzerinde bir etkisi olduğu kaydedilmiştir. EMS tedavileri, özellikle uzun süre uygulandığında, çimlenme oranlarını düşürmüş ve çimlenmenin başlamasını daha uzun sürdü. NaN_3 , daha uzun maruziyetlerde çimlenmeyi durdurmuştur. Ancak daha kısa maruziyetlerde EMS kadar kötü değildi. Bu çalışmalar kimyasal mutajenlerin fizyolojik strese ve belki de bitkilerin büyümesinin erken dönemlerinde ortaya çıkan genetik değişikliklere neden olduğunu göstermektedir. Sonuçlar, kimyasal mutajenlerle uzun süreli maruz kalmanın DNA hasarını ve hücre arızasını daha olası hale getirdiğini ve bunun da çimlenme yeteneğini düşürdüğü gözlemlenmiştir.

Ayrıca çalışmamızda ikinci yaklaşım olarak H_2O_2 ve TETA'nın farklı konsantrasyonlarda ve işlem sürelerinde kullanılarak yapılan kimyasal priming sorgumun in vitro çimlenme, canlılık ve erken büyüme özellikleri üzerindeki etkilerini incelenmek istenmiştir. FRA'nın ML modelleriyle entegrasyonu, ürün dayanıklılığını ve verimliliğini artırmak için tohum ön hazırlama protokolünü optimize etmek amacıyla tüm girdi elemanları arasındaki doğrusal ilişkiler ve etkileşimler hakkında eksiksiz bilgiler sağlamıştır. Sonuçlar, TETA'nın özellikle düşük konsantrasyonlarda ve daha kısa işlem sürelerinde H_2O_2 'ye göre daha yüksek performansa sahip olduğunu göstermiştir. Sonuçlar ayrıca, yüksek konsantrasyon ve uzatılmış işlem süresinin belirli özellikler üzerindeki olumsuz etkisini de ortaya koymuştur. Makine öğrenimi modellerinin uygulanması, sonuçları rasyonel bir şekilde daha da doğrulamıştır.

Bulgular TETA ve H_2O_2 'nin antioksidan aktiviteyi, toplam fenolik içeriği ve prolin birikimini belirgin şekilde etkilediğini göstermektedir. H_2O_2 , antioksidan kapasite ve DPPH inhibisyonu açısından gelişmiş etkinlik gösterirken, TETA prolin birikimi ve stres adaptasyonu üzerinde cesaret verici etkiler ortaya koymuştur. TETA'nın kendine özgü şelat oluşturma yetenekleri, besin emilimini düzenlemek ve abiyotik strese karşı dayanıklılığı artırmak için yeni bir yaklaşım sunmakta ve bitki kimyasal priming (ön uygulama) taktiklerinde önemli bir geliştirme potansiyelini vurgulamaktadır. Tepki Yüzey Metodolojisi (RSM) ve Makine Öğrenmesi'nin (ML) birleştirilmesi, bu maddelerin uygulama koşullarını optimize etmek için sağlam bir çerçeve oluşturmuştur. Sonuçlar, TETA'nın kimyasal priming maddesi olarak dönüştürücü yeteneğini vurgulayarak, H_2O_2 'ye alternatif bir yöntem sunmaktadır. TETA'nın bir kimyasal priming maddesi olarak kullanımı, özellikle bitki metabolizması üzerindeki uzun vadeli etkilerini ve daha geniş bir ürün yelpazesine uygulanabilirliğini değerlendirmek için diğer kimyasal veya biyolojik uyarıcılarla sinerjik kullanımı açısından yeni araştırma fırsatları sunmaktadır. Gelecekteki çalışmalar, uygulama koşullarının optimize edilmesine, bu maddelerin sinerjik etkilerinin incelenmesine ve çeşitli ürünler ve çevresel stres koşullarında bitki büyümesi, metabolizması ve direnci üzerindeki uzun vadeli sonuçlarının değerlendirilmesine odaklanmalıdır.

Çalışmanın moleküler kısmı, iki tür DNA işaretleyici sistemi kullanarak mutajenlerin neden olduğu genetik değişiklikleri aradı: SCoT (Başlangıç Kodonu Hedefli) ve iPBS (Primer Bağlanma Bölgesi Arası) işaretleyicileri. Tüm tedavi ve kontrol örneklerinden DNA'yı

başarıyla ayırabildik. Daha sonra PZR kullanarak DNA'yı çoğaltmak için birkaç SCoT ve iPBS primeri kullanılmıştır. Çıkan bantlama desenlerine bakmak için agar jel elektroforezi kullanılmıştır. Her iki işaretleyici sistemi de belirgin olan ve tekrarlanabilen polimorfik desenler göstermiştir. Bazı durumlarda, mutajenlerle tedavi edilen ancak kontrol örneklerinde olmayan örneklerde yeni bantlar ortaya çıkmış ya da var olan bantlar kaybolmuştur. Bantların bu kazanımı veya kaybı, primer bağlanma bölgelerinde veya çoğaltılmış lokusların içinde eklemeler, silmeler veya nokta mutasyonları gibi değişikliklerin moleküler düzeyde bir işareti olarak bilinmektedir.

S. bicolor genomik DNA'sındaki retrotranspozon-flanking alanları iPBS2382 primeri tarafından başarılı bir şekilde çoğaltıldı ve incelenen 54 numunenin hepsinde benzersiz ve polimorfik bantlama profilleri üretildi. Yüksek genetik çeşitlilik ve bu primerin retrotranspozon tabanlı polimorfizmleri tanımlamadaki etkinliği, numunelerin bant sayısı, yoğunluğu ve pozisyonundaki önemli farklılıklarla gösterilmiştir.

Başlangıç kodonlarının yakınında gen açısından zengin alanları arayan SCoT belirteçleri, örneklerin genotiplerindeki değişiklikleri bulmada özellikle iyi olduğu görülmüştür. Retrotranspozon aktivitesinden yararlanan iPBS belirteçleri çok fazla çeşitlilik göstermiştir. Bunun nedeni muhtemelen transpozon elemanların mutajenik stres olduğunda açılıp kapanmasıydı. Bu iki belirteç sistemi, sorgum mutantlarının moleküler parmak izi için güçlü bir temel oluşturmak üzere birlikte iyi çalışmıştır. Görülen polimorfizm hem EMS'nin hem de NaN₃'nin DNA'da kararlı ve tanımlanabilir değişikliklere neden olduğunu göstermiştir.

Ancak çalışmada bazı kusurlar görülmüştür. Başlıca sorunlardan biri, çalışmanın yalnızca erken embriyonik aşamalara ve *in vitro* koşullara bakılması nedeniyle belirli genetik varyantları fenotipik özelliklere bağlamanın mümkün olmamasıydı. Ayrıca, SCoT ve iPBS belirteçleri genetik değişiklikleri göstermede iyi bir iş çıkarmış, ancak bize mutasyonların işlevsel önemi veya genomdaki yerleri hakkında hiçbir şey söylememektedir. Bu kısıtlamalar, sahada moleküler, fizyolojik ve agronomik değerlendirmeleri birleştiren daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğunu göstermektedir.

Bu çalışmanın sonuçlarına dayanarak önerilebilecek bir dizi şey var. İlk olarak, bu çalışmada en iyi işe yarayan sterilizasyon yöntemi, *S. bicolor* ve belki de diğer tahıl mahsulleri ile

gelecekteki *in vitro* deneylerde güvenle kullanılabilir. İkinci olarak hem EMS hem de NaN_3 için 2 saatlik maruz kalma süresi, tohumlara çok fazla zarar vermeden mutant popülasyonları oluşturmaya başlamak için iyi bir seçenek gibi görünmektedir. Bu ayarlar, yeterli genetik çeşitlilik yaratmak ve biyolojik işlevi korumak arasında bir orta yol bulmaktadır.

Üçüncüsü, SCoT ve iPBS belirteçlerinin mutant hatları birbirinden ayırmada çok iyi çalıştığı gösterilmiştir. Bu nedenle, bu belirteçlerin mutant yetiştirme projeleri için erken seçim aşamalarında kullanılması önerilmektedir. Mutant tanımlamasını daha güvenilir hale getirmek için, gelecekteki çalışmalar ISSR, SSR veya SNP tabanlı genotipleme dahil olmak üzere daha fazla belirteç sistemi ve daha derinlemesine çeşitlilik araştırması için biyoenformatik araçlarının kullanılmasını içermelidir.

Son olarak, belirgin moleküler profillere sahip mutant hatlar seralarda ve tarlalarda ne kadar iyi performans gösterdiklerini görmek için daha fazla yetiştirilmelidir. Bu aşama, yapılan değişikliklerin tarımsal yararlılığını doğrulamak için gereklidir. Bu mutasyonları zaman içinde takip eden ve bunların nesilden nesile nasıl aktarıldığını gören uzunlamasına çalışmalar, bunların yetiştirme programlarında nasıl kullanılabileceğini anlamamıza yardımcı olacaktır.

Sonuç olarak, çalışmamız *Sorghum bicolor*'un genetik çeşitliliğini artırmak için retrotranspozon tabanlı moleküler belirteç yaklaşımlarının *in vitro* mutagenesi ile birlikte kullanılmasının mümkün ve yararlı olduğunu göstermektedir. Burada oluşturulan ve test edilen deneysel süreç, fonksiyonel genomik, stres toleransının iyileştirilmesi ve sorgum ve onunla ilişkili diğer mahsullerin moleküler destekli ıslahı alanında gelecekteki çalışmalar için bir başlangıç noktası sunmaktadır.

KAYNAKLAR

- Aasim, M., Katırcı, R., Akgur, O., Yildirim, B., Mustafa, Z., Nadeem, M. A., Baloch, F. S., Karakoy, T., & Yılmaz, G. (2022). Machine learning (ML) algorithms and artificial neural network for optimizing *in vitro* germination and growth indices of industrial hemp (*Cannabis sativa* L.). *Industrial Crops and Products*, 181, 114801.
- Aasim, M., C. Ali, S.A. Altaf, M.T. Ali, A. Nadeem, M.A. Baloch, F.S. 2023. Artificial neural network and decision tree facilitated prediction and validation of cytokinin-auxin induced *in vitro* organogenesis of sorghum (*Sorghum bicolor* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 1–14.
- Aasim, M., R. Katırcı, A.Ş. Acar, S.A. Ali. 2024a. A comparative and practical approach using quantum machine learning (QML) and support vector classifier (SVC) for light-emitting diodes mediated *in vitro* micropropagation of black mulberry (*Morus nigra* L.). *Industrial Crops and Products* 213:118397.
- Aasim, M., B. Yıldırım, A. Say, S.A. Ali, S. Aytaç, M.A. Nadeem. 2024b. Artificial intelligence models for validating and predicting the impact of chemical priming of hydrogen peroxide (H₂O₂) and light-emitting diodes on *in vitro* grown industrial hemp (*Cannabis sativa* L.). *Plant Molecular Biology* 114:33.
- Aasim, M., Akin, F. ve Ali, S.A. Synergizing LED Technology and Hydropriming for Intelligent Modeling and Mathematical Expressions to Optimize Chickpea Germination and Growth Indices. *J Plant Growth Regul* 43, 2340–2359 (2024).
- Acquaah, G. (2012). *Principles of plant genetics and breeding* (2nd ed.). John Wiley & Sons.
- Abdulrazaq, A. ve Ammar, K. (2015). Effect of the chemical mutagens sodium azide on plant regeneration of two tomato cultivars under salinity stress condition *in vitro*. *Journal of Life Sciences*, 9, 27-33.
- Açıkgöz, E., Albayrak, S., Gökkuş, A., & Ekiz, H. (2016). *Yem bitkileri*. Ankara: Tarım ve Orman Bakanlığı Yayınları.
- Aggarwal, C. C. (2018). *Neural networks and deep learning* (Vol. 10, No. 978, p. 3). Cham: Springer.
- Ahloowalia, B. S., Maluszynski, M., & Nichterlein, K. (2004). Global impact of mutation-derived varieties. *Euphytica*, 135(2), 187–204.
- Ali Khan, M., Jyoti, S., Rahul, Naz, F., Ara, G., Afzal, M., Siddique, Y. H. (2021). Effect of lemon grass extract against methyl methanesulfonate-induced toxicity. *Toxin Reviews*, 40(4), 1172-1186.
- Ali, S. A., Aasim, M. (2024). Response surface methodology and artificial intelligence modeling for *in vitro* regeneration of Brazilian micro sword (*Lilaeopsis brasiliensis*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 157(1), 1–13.

- Ali, S. A., Gümüş, N. E., Aasim, M. (2024). A unified framework of response surface methodology and coalescing of Firefly with random forest algorithm for enhancing nano-phytoremediation efficiency of chromium via *in vitro* regenerated aquatic macrophyte coontail (*Ceratophyllum demersum* L.). *Environmental Science and Pollution Research*, 1–17.
- Alkiayat, M. (2021). A practical guide to creating a Pareto chart as a quality improvement tool. *Global Journal on Quality and Safety in Healthcare*, 4(2), 83–84.
- Al-Qurainy, F. (2009). Effects of sodium azide on growth and yield traits of *Eruca sativa* (L.). *World applied sciences journal*, 7(2), 220-226.
- Alsharaiah, M.A., L.H. Baniata, O. Adwan, O.A. Alghanam, A.A.A. Shareha, L. Alzboon, N. Mustafa, M. Baniata. 2022. Neural network prediction model to explore complex nonlinear behavior in dynamic biological networks. *International Journal of Interactive Mobile Technologies* 16:32–51.
- Altındal, D., Altındal, N. (2018). Ayçiçeğinin (*Helianthus annuus* L. cv. Palancı-I) *In Vitro* Tuzlu Koşullarda Gelişimi Üzerine Etil Metansülfonat (EMS) Uygulamalarının Etkisi. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 8(4), 351-359.
- Amin, R., Laskar, R. A., Khursheed, S., Raina, A., Khan, S. (2016). Genetic sensitivity towards MMS mutagenesis assessed through *in vitro* growth and cytological test in *Nigella sativa* L. *Life Sciences International Research Journal*, 3, 2347-8691.
- Anderson, V.L., R.A. McLean. 2018. Design of Experiments: A Realistic Approach. CRC
- Anglani, C. (1998). Sorghum for human food—A review. *Plant Foods for Human Nutrition*, 52, 85-95.
- Awty-Carroll, D., Purdy, S. J., Clifton-Brown, J., Robson, P. R. H. (2020): Using a Taguchi DOE to investigate factors and interactions affecting germination in *Miscanthus sinensis*. *Scientific Reports* 10(1): 1602.
- Badigannavar, A., Teme, N., de Oliveira, A.C. (2018). Physiological, genetic and molecular basis of drought resilience in sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. *Ind J Plant Physiol.* **23**, 670–688.
- Bado, S., Forster, B. P., Nielen, S., Ali, A. M., Lagoda, P. J., Till, B. J., Laimer, M. (2015). Plant mutation breeding: current progress and future assessment. *Plant Breeding Reviews: Volume 39*, 23-88.
- Baghery, M. A., Kazemitabar, S. K., Kenari, R. E. (2016): Effect of EMS on germination and survival of okra (*Abelmoschus esculentus* L.). *Biharean Biologist* 10(1): 33–36.
- Baig, M. M. Q., Ahmad, T., Hafiz, I. A., Abbasi, N. A., Tareen, M. J. (2016). *In vitro* improvement of characters in *Rosa* spp. through colchicine. *JAPS: Journal of Animal & Plant Sciences*, 26(6).

- Bakari, H., Djomdi, Ruben, Z. F., Roger, D. D., Cedric, D., Guillaume, P., ... Gwendoline, C. (2023). Sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) and its main parts (by-products) as promising sustainable sources of value-added ingredients. *Waste and Biomass Valorization*, 14(4), 1023-1044.
- Bas, S., Aasim, M., Gumus, N. E., Katirci, R., Ali, S. A., Karatas, M. (2025). Genetic algorithms assisted machine learning algorithms to optimize nano-phytoremediation of cadmium designed by response surface methodology. *International Journal of Phytoremediation*, 27(8), 1057–1065.
- Bharath, R. A., Prathmesh, P. S., Sarsu, F., Suprasanna, P. (2024). Induced mutagenesis using gamma rays: Biological features and applications in crop improvement. *OBM Genetics*, 8(2).
- Birhanu, S. (2021). Potential benefits of sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] on human health: A review. *International Journal of Food Engineering and Technology*, 5(1), 8-18.
- Blum, A. (2004). Sorghum physiology. In H. T. Nguyen, A. Blum (Eds.), *Physiology and biotechnology integration for plant breeding* (pp. 141–223). CRC Press.
- Bramel, P., Kresovich, S., Giovannini, P. (2022). Global Strategy for the Conservation and Use of Sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) Genetic Resources. *Global Crop Diversity Trust. Bonn, Germany. DOI, 10*.
- Bulut, S., Aasim, M., Emsen, B., Ali, S. A., Askin, H., Karatas, M. (2025). Corrigendum to “Machine learning modeling and response surface methodology driven antioxidant and anticancer activities of chitosan nanoparticle-mediated extracts of *Bacopa monnieri*”[Int. J. Biol. Macromol. 310 (2025) 143470]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 143988.
- Chen, L., Duan, L., Sun, M., Yang, Z., Li, H., Hu, K., ... & Liu, L. (2023). Current trends and insights on EMS mutagenesis application to studies on plant abiotic stress tolerance and development. *Frontiers in Plant Science*, 13, 1052569.
- Cheng, M., McCarl, B., Fei, C. (2022). Climate change and livestock production: a literature review. *Atmosphere*, 13(1), 140.
- Chizoba, O. J., Kyari, B. A. (2020). Response surface methodology and Taguchi method based applications—a review. *Glob J Eng Technol Adv*, 5(02), 047-056.
- Connelly, L. M. (2021). Introduction to Analysis of Variance (ANOVA). *Medsurg Nursing*, 30(3).
- Çelik, Ö., Atak, Ç. (2017). Applications of ionizing radiation in mutation breeding. *New insights on gamma rays*, 6, 111-132.
- Deh Sheikh, A. A., Moradnejad, M. (2014). Mutagenesis in olive (*Olea europaea* L.) calli caused by sodium azide and detection of mutants using ISSR and RAPD markers. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 89(2), 153-158.

- Espitia-Hernández, P., Chavez Gonzalez, M. L., Ascacio-Valdés, J. A., Dávila-Medina, D., Flores-Naveda, A., Silva, T., ... & Sepúlveda, L. (2022). Sorghum (*Sorghum bicolor* L.) as a potential source of bioactive substances and their biological properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(8), 2269-2280.
- Eze, J. J., Dambo, A. (2015). Mutagenic effects of sodium azide on the quality of maize seeds. *Journal of advanced laboratory Research in Biology*, 6(3), 76-82.
- Fadil, M., Lebrazi, S., Aboulghazi, A., El Baakili, A., Es-safi, N. E., Rais, C., ... & Farah, A. (2024). Enhancement of ultrasonic-assisted extraction and antioxidant potential of phenolic compounds from Moroccan *Cannabis sativa*: A green intelligent approach integrating optimal mixture process design and artificial neural networks. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 37, 101359.
- Fahle, S., Prinz, C., & Kuhlenkötter, B. (2020). Systematic review on machine learning (ML) methods for manufacturing processes—Identifying artificial intelligence (AI) methods for field application. *Procedia CIRP*, 93, 413-418.
- FAO. (2021). *Grassland and forage report: Global outlook and sustainable solutions*. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Farooq, M. A., Gao, S., Hassan, M. A., Huang, Z., Rasheed, A., Hearne, S., ... & Li, H. (2024). Artificial intelligence in plant breeding. *Trends in Genetics*.
- Francis, D.V., Subhan, A., I. Mourad, AH. ve ark. Optimizing germination conditions of Ghaf seed using ZnO nanoparticle priming through Taguchi method analysis. *Sci Rep* 14, 15946 (2024).
- Ghanim, A. M. A., Ali, A. B., Sen, A., Ingelbrecht, I., Sivasankar, S. (2023). Rapid cycling and generation advancement for accelerated mutation breeding in sorghum. In *Mutation breeding and efficiency enhancing technologies for resistance to Striga in cereals* (pp. 161–170). Springer.
- Ghasemi, M., Hasani Zonoozi, M., Rezanian, N., Saadatpour, M. (2022). Predicting coagulation–flocculation process for turbidity removal from water using graphene oxide: a comparative study on ANN, SVR, ANFIS, and RSM models. *Environmental Science and Pollution Research*, 29(48), 72839–72852.
- Gill, S.S., N. Tuteja. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48:909–930.
- Giridhar, K., Samireddypalle, A. (2015). Impact of climate change on forage availability for livestock. *Climate change impact on livestock: adaptation and mitigation*, 97-112.
- Godara, S., Parsad, R., Bana, R. S., Singh, D., Avinash, G., Marwaha, S. (2024). DL-RSM: Deep learning-integrated Response Surface Methodology for positive and negative-ideal environmental conditions estimation for crop yield. *Journal of Cleaner Production*, 456, 142381
- Gostimsky, S., Kokaeva, Z., Konovalov, F. (2005). Studying plant genome variation using molecular markers. *Russian Journal of Genetics*, 41, 378 - 388.

- Güvercin, R. Ş. (2020). Etil Metan Sülfonat Mutageninin Pamuk (*Gossypium hirsutum* L. ve *Gossypium barbadense* L.) Tohumu Çimlenmesine Etkisi. *Uluslararası Anadolu Ziraat Mühendisliği Bilimleri Dergisi*, 2(1), 24-29.
- Habib, S. H., Khan, M. A., Alghamdi, S. S., Alzahrani, Y. (2021): Effect of different dosage of EMS on germination, survivability and morpho-physiological characteristics of sunflower seedling. *Helia* 44(75): 167–180.
- Han, J., Kamber, M., Pei, J. (2012). Data mining: Concepts and. *Techniques*, Waltham: Morgan Kaufmann Publishers.
- Hasan, S. A., Rabei, S. H., Nada, R. M., Abogadallah, G. M. (2017). Water use efficiency in the drought-stressed sorghum and maize in relation to expression of aquaporin genes. *Biologia Plantarum*, 61(1), 127–137.
- Hase, Y., Satoh, K., Seito, H., Oono, Y. (2020). Genetic consequences of acute/chronic gamma and carbon ion irradiation of *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in Plant Science*, 11, 336.
- Iriti, M., Faoro, F. (2009). Chemical diversity and defence metabolism: how plants cope with pathogens and ozone pollution. *International journal of molecular sciences*, 10(8), 3371-3399.
- Islam, S., Reza, M. N., Samsuzzaman, S. A., Cho, Y. J., Noh, D. H., Chung, S.-O., Hong, S. J. (2024). Machine vision and artificial intelligence for plant growth stress detection and monitoring: A review. *Precision Agriculture*, 6(1), 34.
- Jain, S. M., Ochatt, S. J., Kulkarni, V. M., Predieri, S. (2008, December). In vitro culture for mutant development. In *IV International Symposium on Acclimatization and Establishment of Micropropagated Plants* 865 (pp. 59-68).
- Jankowicz-Cieslak, J., Till, B. J. (2016). Chemical mutagenesis of seed and vegetatively propagated plants using EMS. *Current protocols in plant biology*, 1(4), 617-635.
- Joya-Dávila, J. G., Gutiérrez-Miceli, F. A. (2020). Ethyl methanesulfonate as inductor of somaclonal variants in different crops. **Phyton-International Journal of Experimental Botany*, 89*(4), 835-846.
- Kadam, U. S., Vishwakarma, M. K., Kumar, S., Rao, A. R., Ramesh, B. (2022). Thermal neutron as a potential mutagen for induced plant mutation breeding: Radiosensitivity response on wheat and rice. *Plant Genetic Resources*, 20(3), 205–215.
- Karabal, E., Yücel, M., Öktem, H. A. (2003). Antioxidant responses of tolerant and sensitive barley cultivars to boron toxicity. *Plant Science*, 164(6), 925–933.
- Katırcı, R., Yılmaz, E. K., Kaynar, O., Zontul, M. (2021). Automated evaluation of Cr-III coated parts using Mask RCNN and ML methods. *Surface and Coatings Technology*, 422, 127571.
- Ke, G., Q. Meng, T. Finley, T. Wang, W. Chen, W. Ma, Q. Ye, T.-Y. Liu. 2017. LightGBM: A highly efficient gradient boosting decision tree. *Advances in Neural Information Processing Systems* 30.

- Ke, C., Guan, W., Bu, S., Li, X., Deng, Y., Wei, Z., ... & Zheng, Y. (2019). Determination of absorption dose in chemical mutagenesis in plants. *PloS one*, 14(1), e0210596.
- Khalid, W., Ali, A., Arshad, M. S., Afzal, F., Akram, R., Siddeeg, A., ... & Saeed, A. (2022). Nutrients and bioactive compounds of Sorghum bicolor L. used to prepare functional foods: a review on the efficacy against different chronic disorders. *International Journal of Food Properties*, 25(1), 1045-1062.
- Khan, S., Al-Qurainy, F., Anwar, F. (2009). Sodium azide: a chemical mutagen for enhancement of agronomic traits of crop plants. *Environ. We Int. J. Sci. Tech*, 4, 1-21.
- Kodym, A., Afza, R. (2003). Physical and chemical mutagenesis. *Plant functional genomics*, 189-203.
- Kostova, A., Todorovska, E., Christov, N., Hristov, K., Atanasov, A. (2006). Assessment of Genetic Variability Induced by Chemical Mutagenesis in Elite Maize Germplasm via SSR Markers. *Journal of Crop Improvement*, 16(1–2), 37–48.
- Kumar, S. P., Kumari, B. R. (2021). Impact of ethyl methane sulphonate mutagenesis in *Artemisia vulgaris* L. under NaCl stress. *BioTech*, 10(3), 18.
- Lee, S. W., Kwon, Y.-J., Baek, I., Choi, H.-I., Ahn, J.-W., Kim, J.-B., Kang, S.-Y., Kim, S. H., Jo, Y. D. (2021). Mutagenic effect of proton beams characterized by phenotypic analysis and whole genome sequencing in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science*, 12, 752108.
- Lertsutthichawan, A., Ruamrungsri, S., Duangkongsan, W., Saetiew, K. (2017). Induced mutation of chrysanthemum by colchicine.
- Liu, L., Huang, L., Sun, C., Wang, L., Jin, C., Lin, X. (2021). Cross-talk between hydrogen peroxide and nitric oxide during plant development and responses to stress. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(33), 9485–9497.
- Lozano-Isla, F., Benites-Alfaro, O. E. and Pompelli, M. F. (2019) *GerminaR: An R package for germination analysis with the interactive web application “GerminaQuant for R”*. Wiley Online Library.
- Ma, L., Kong, F., Sun, K., Wang, T., Guo, T. (2021). From classical radiation to modern radiation: Past, present, and future of radiation mutation breeding. *Frontiers in Public Health*, 9, Article 768071.
- Margay, A.R., A. Hassan. 2024. Optimizing agriculture: A review of chemical priming in crop production. *International Journal of Plant and Soil Science* 36:175–189.
- Martins, N., Barros, L., Santos-Buelga, C., Henriques, M., Silva, S., Ferreira, I. C. F. R. (2015). Evaluation of bioactive properties and phenolic compounds in different extracts prepared from *Salvia officinalis* L. *Food Chemistry*, 170, 378–385.
- McGranahan, D. A., Yurkonis, K. A. (2018). Variability in grass forage quality and quantity in response to elevated CO₂ and water limitation. *Grass and Forage Science*, 73(2), 517-521.

- Mir, S. H., Jan, I. (2023). Sodium Azide as a Mutagen. In *Biotechnologies and Genetics in Plant Mutation Breeding* (pp. 89-121). Apple Academic Press.
- Mirza, K. (2020). *In vitro* koşullarda *Bacopa monnieri* L.'nin farklı kimyasal mutajenlerin etkisi [Yüksek lisans tezi, Necmettin Erbakan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü].
- Mirza, K., Aasim, M., Katırcı, R. ve ark. Machine Learning and Artificial Neural Networks-Based Approach to Model and Optimize Ethyl Methanesulfonate and Sodium Azide Induced *In Vitro* Regeneration and Morphogenic Traits of Water Hyssops (*Bacopa monnieri* L.). *J Plant Growth Regul* 42, 3471–3485 (2023).
- Mitra, A. (2011), The Taguchi method. *WIREs Comp Stat*, 3: 472-480.
- Mittler, R. (2017). ROS are good. *Trends in plant science*, 22(1), 11-19.
- Montgomery, D. C. (2017). *Design and analysis of experiments*. John Wiley & sons.
- Moretti, F. (2011). *Network theory, plot analysis* (Literary Lab Pamphlet Series, No. 2). Stanford University
- Mohamad-Matrol, A. A., Chang, S.-W., Abu, A. (2018). Plant data visualisation using network graphs. *PeerJ*, 6, e5579.
- Mullainathan, L., Suthakar, V. (2015). Studies on Effect of Physical and Chemical Mutagens in Sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) in M2 Generation. *International Letters of Natural Sciences*.
- Mullins, E., Bresson, J. L., Dalmay, T., Dewhurst, I. C., Epstein, M. M., Firbank, L. G., ... & Rostoks, N. (2021). In vivo and in vitro random mutagenesis techniques in plants. *EFSA J* 19 (11): e06611.
- Murashige, T., Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3).
- Myers, R. H., Montgomery, D. C., Anderson-Cook, C. M. (2016). *Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments*. John Wiley & Sons.
- Nadeem, M. A., Nawaz, M. A., Shahid, M. Q., Doğan, Y., Comertpay, G., Yıldız, M., ... & Baloch, F. S. (2018). DNA molecular markers in plant breeding: current status and recent advancements in genomic selection and genome editing. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 32(2), 261-285.
- Nair, A.U., D.P.N. Bhukya, R. Sunkar, S. Chavali, A.D. Allu. 2022. Molecular basis of priming-induced acquired tolerance to multiple abiotic stresses in plants. *Journal of Experimental Botany* 73:3355–3371
- Nasri, F., Zakizadeh, H., Vafaei, Y., Mozafari, A. A. (2021). *In vitro* mutagenesis of Chrysanthemum morifolium cultivars using ethylmethanesulphonate (EMS) and mutation assessment by ISSR and IRAP markers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 1-17.

- Natarajan, A. T. (2005). Chemical mutagenesis: From plants to human. *Current Science*, 312-317.
- Nguyen, H. T., Blum, A. (Eds.). (2004). *Physiology and biotechnology integration for plant breeding*. CRC Press.
- Nik Muhammad Nasir, N. N., Khandaker, M. M., Mohd, K. S., Badaluddin, N. A., Osman, N., Mat, N. (2021). Effect of hydrogen peroxide on plant growth, photosynthesis, leaf histology and rubisco gene expression of the *Ficus deltoidea* Jack Var. *Deltoidea* Jack. *Journal of Plant Growth Regulation*, 40, 1950–1971
- Oladosu, Y., Rafii, M. Y., Abdullah, N., Hussin, G., Ramli, A., Rahim, H. A., ... Usman, M. (2015). Principle and application of plant mutagenesis in crop improvement: review. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 30(1), 1–16.
- Pandian, B. A., Sexton-Bowser, S., Prasad, P. V., Jugulam, M. (2022). Current status and prospects of herbicide-resistant grain sorghum (*Sorghum bicolor*). *Pest management science*, 78(2), 409-415.
- Paterson, A. H. (2008). Genomics of sorghum. *International Journal of Plant Genomics*, 2008(1), 362451.
- Pathirana, R. (2021). Mutations in plant evolution, crop domestication and breeding. *Tropical Agricultural Research and Extension*, 24(3).
- Pavlov, Y. L. (2019). *Random forests* (pp. 1–122). In *Random Forests*.
- Pedregosa, F., G. Varoquaux, A. Gramfort, V. Michel, B. Thirion, O. Grisel, M. Blondel, P. Prettenhofer, R. Weiss, V. Dubourg, J. Vanderplas, A. Passos, D. Cournapeau, M. Brucher, M. Perrot, E. Duchesnay. 2011. Scikit-learn: Machine Learning in Python. *Journal of Machine Learning Research* 12:2825–2830.
- Peng, Q., Tu, L., Wu, Y., Yu, Z., Tang, G., Song, W. (2022). Automatic Monitoring System for Seed Germination Test Based on Deep Learning. *J. Electr. Comput. Eng.*, 2022, 4678316:1-4678316:15.
- Petti, C., Kushwaha, R., Tateno, M., Harman-Ware, A. E., Crocker, M., Awika, J., DeBolt, S. (2014). Mutagenesis breeding for increased 3-deoxyanthocyanidin accumulation in leaves of *Sorghum bicolor* (L.) Moench: A source of natural food pigment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(6), 1227–1232.
- Prabha, R., Dixit, V., Chaudhary, B. R. (2010). Comparative spectrum of sodium azide responsiveness in plants. *American-Eurasian J Agric & Environ Sci*, 8(6), 779-783.
- Predieri, S., Virgilio, N. D. (2007). *In vitro* mutagenesis and mutant multiplication. In *Protocols for micropropagation of woody trees and fruits* (pp. 323-333). Dordrecht: Springer Netherlands.
- Ranal, M. A., Santana, D. G. de (2006): How and why to measure the germination process? *Brazilian Journal of Botany* 29: 1–11.

- Razzaq, A., I. Mahmood, J. Iqbal, A.Q.M. Rasheed, M. Ahmad. 2013. Enhancing drought tolerance of wheat (*Triticum aestivum* L.) through chemical priming. *Wulfenia Journal* 20:44–58.
- Saballos, A. (2008). *Development and utilization of sorghum as a bioenergy crop*. In W. Vermeris (Ed.), *Genetic improvement of bioenergy crops* (pp. 211–248). Springer.
- Sakinah, A. I., Musa, Y., Farid, M., Anshori, M. F., Arifuddin, M., Laraswati, A. A. (2021). Cluster heatmap for screening the drought tolerant rice through hydroponic culture. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 807(4), 42045.
- Samadi, N., Naghavi, M. R., Moratalla-López, N., Alonso, G. L., Shokrpour, M. (2022). Morphological, molecular and phytochemical variations induced by colchicine and EMS chemical mutagens in *Crocus sativus* L. *Food Chemistry: Molecular Sciences*, 4, 100086.
- Senapati, S. K., Rout, G. R. (2008). *In vitro* mutagenesis of rose with ethylmethanesulphonate (EMS) and early selection using RAPD markers. *Advances in Horticultural Science*, 218-222.
- Singleton, V. L., Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144–158.
- Senapati, S. K., Rout, G. R. (2008). *In vitro* mutagenesis of rose with ethylmethanesulphonate (EMS) and early selection using RAPD markers. *Advances in Horticultural Science*, 218-222.
- Singleton, V. L., Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144–158.
- Soltis, P.S., G. Nelson, A. Zare, E.K. Meineke. 2020. Plants meet machines: Prospects in machine learning for plant biology. *Applications in Plant Sciences* 8.
- Somuncuoğlu, B. (2021). İç Anadolu Bölgesinde Yem Bitkileri Tarımının Genel Durumu, Sorunları ve Çözüm Önerileri. *Science and Technique in the 21st Century*, 8(15), 33-42.
- Srivastava, D., Gayatri, M. C., Sarangi, S. K. (2018). *In vitro* mutagenesis and characterization of mutants through morphological and genetic analysis in orchid *Aerides crispata* Lindl. *Indian J Exp Biol*, 56(6), 385-394.
- Subramaniam, R., Kumar, V. S. (2023). Ethyl methanesulphonate (EMS)-mediated mutagenesis induces genetic and morphological variations in eggplant (*Solanum melongena* L.). *International Journal of Plant Biology*, 14(3), 714-728.
- Sun, L., Lai, M., Ghouri, F., Nawaz, M. A., Ali, F., Baloch, F. S., Nadeem, M. A., Aasim, M., Shahid, M. Q. (2024). *Modern plant breeding techniques in crop improvement and genetic diversity: From molecular markers and gene editing to artificial intelligence—A critical review*. *Plants*, 13(19), 2676.

- Suttie, J. M., Reynolds, S. G., Batello, C. (Eds.). (2005). *Grasslands of the world*. FAO Plant Production and Protection Series No. 34. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Szabados, L., Saviouré, A. (2010). Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in plant science*, 15(2), 89-97.
- Taguchi, G. (1986). *Introduction to quality engineering: designing quality into products and processes*.
- Tamilmani, A., Sughasiny, M., Upendran, V. (2023). An Ensemble Framework Approach to Crop Type Prediction Using Feature Selection and Multiclass Classification.
- Tarım ve Orman Bakanlığı. (2024). *2025 yılı performans programı*. T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı Strateji Geliştirme Başkanlığı.
- Taylor, J. R. N., Schober, T. J., Bean, S. R. (2006). Novel food and non-food uses for sorghum and millets. *Journal of Cereal Science*, 44(3), 252–271.
- Teixeira, S. B., Lima, J. A. A., de Almeida, A. C., Costa, C. A., Medeiros, J. A. (2021): Application of vigor indexes to evaluate the cold tolerance in rice seeds germination conditioned in plant extract. *Scientific Reports* 11(1): 11038.
- Tiryaki, İ. (2005). Sorgum: Genetik kökeni, kullanımı, yetiştirme teknikleri ve biyoteknolojik gelişmeler. *KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi*, 8(1), 84–90.
- Türkoğlu, A., Tosun, M., Haliloğlu, K. Evaluation of ethyl methanesulfonate-induced *in vitro* mutagenesis, polymorphism and genomic instability in wheat (*Triticum aestivum* L.). *J. Crop Sci. Biotechnol.* **26**, 199–213 (2023).
- Türkoğlu, A., Haliloğlu, K., Tosun, M., Bujak, H., Eren, B., Demirel, F., ... & Niedbała, G. (2023). Ethyl methanesulfonate (EMS) mutagen toxicity-induced DNA damage, cytosine methylation alteration, and iPBS-retrotransposon polymorphisms in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Agronomy*, 13(7), 1767.
- Türkoğlu, A., Haliloğlu, K., Demirel, F., Aydın, M., Çiçek, S., Yiğider, E., Demirel, S., Piekutowska, M., Szulc, P., Niedbała, G. (2023). Machine Learning Analysis of the Impact of Silver Nitrate and Silver Nanoparticles on Wheat (*Triticum aestivum* L.): Callus Induction, Plant Regeneration, and DNA Methylation. *Plants*, 12(24), 4151.
- Uçer, V.A., Aglar, E., Mortazavi, P. ve ark. Exploring genetic diversity of Turkish fig (*Ficus carica* L.) germplasm using inter-Primer Binding Site (iPBS) retrotransposon markers. *Genet Resour Crop Evol* **72**, 5487–5498 (2025).
- Unan, R., Deligoz, I., Al-Khatib, K., Mennan, H. (2022). Protocol for ethyl methanesulphonate (EMS) mutagenesis application in rice. *Open Research Europe*, 1, 19.
- Xi, M., Sun, L., Qiu, S., Liu, J., Xu, J., Shi, J. (2012). *In vitro* mutagenesis and identification of mutants via ISSR in lily (*Lilium longiflorum*). *Plant cell reports*, 31, 1043-1051.

- Xu, L., Najeeb, U., Naeem, M. S., Wan, G. L., Jin, Z. L., Khan, F., Zhou, W. J. (2012). In vitro mutagenesis and genetic improvement. *Technological Innovations in Major World Oil Crops, Volume 2: Perspectives*, 151-173.
- Van Rossum, G., Drake, F. L. (2009). *Python 3 reference manual*. CreateSpace.
- Viana, V. E., Pegoraro, C., Busanello, C., Costa de Oliveira, A. (2019). Mutagenesis in rice: the basis for breeding a new super plant. *Frontiers in plant science*, 10, 1326.
- Wang, Z., Feng, B., Gao, Q., Wang, Y., Yang, Y., Luo, B., ... & Li, B. (2024). A prediction method of interaction based on Bilinear Attention Networks for designing polyphenol-protein complexes delivery systems. *International Journal of Biological Macromolecules*, 269, 131959.
- Webb, G. I., Sammut, C., Perlich, C., Horváth, T., Wrobel, S., Korb, K. B., Noble, W. S., Leslie, C., Lagoudakis, M. G., Quadrianto, N., Buntine, W. L., Quadrianto, N., Buntine, W. L., Getoor, L., Namata, G., Getoor, L., Han, Xin Jin, J., Ting, J.-A., Vijayakumar, S., ... Raedt, L. De. (2011). Leave-One-Out Cross-Validation. In *Encyclopedia of Machine Learning* (pp. 600–601). Springer US.
- Whitmire, C.D., J.M. Vance, H.K. Rasheed, A. Missaoui, K.M. Rasheed, F.W. Maier. 2021. Using machine learning and feature selection for alfalfa yield prediction. *AI* 2:71–88.
- Yadav, G., Mathur, J. (2025). Seed Priming with Fruit and Vegetable Waste-based Nanoparticles: A Sustainable Green Approach. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 25(1), 303-321.
- Yaldagard, M., Mortazavi, S. A., Tabatabaie, F. (2008): Application of ultrasonic waves as a priming technique for accelerating and enhancing the germination of barley seed: optimization of method by the Taguchi approach. *Journal of the Institute of Brewing* 114(1): 14–21.
- Yali, W., Mitiku, T. (2022). Mutation breeding and its importance in modern plant breeding. *Journal of Plant Sciences*, 10(2), 64-70.
- Yan, S., L. Ye, S. Han, T. Han, Y. Li, E. Alasaarela. 2020. Speech interactive emotion recognition system based on random forest. *2020 International Wireless Communications and Mobile Computing Conference (IWCMC) 2020*:1458–1462.
- Yang, Y., Li, S., Liu, C., Xu, M., Guo, X. (2021): Selection of sensitive seeds for evaluation of compost maturity with the seed germination index. *Waste Management* 136: 238–243.
- Ye, Z., Ouyang, D. (2024). Opportunities and Challenges of Artificial Intelligence (AI) in Drug Delivery. *Exploring Computational Pharmaceutics: AI and Modeling in Pharma* 4.0, 10.
- Yildirim, B., M. Aasim, S. Aytac. 2023. Optimizing *in vitro* germination of primed industrial hemp (*Cannabis sativa* L.) seeds. *Anatolian Journal of Botany* 7:112–116.

- Załoski, D., Stolarski, M. J., Krzyżaniak, M. (2022): Validation of the Taguchi method on the example of evaluation of willow biomass production factors under environmental stress. *Industrial Crops and Products* 185: 115170.
- Zhishen, J., Mengcheng, T., Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food chemistry*, 64(4), 555-559.
- Zin, M., Gansau, J., Baadu, R., Dayou, J., Chong, K. (2023). A systematic review on physical mutagens in rice breeding in Southeast Asia. *PeerJ*, 11



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı

Uyruğu

Doğum tarihi ve yeri :

Telefon :

e-mail :

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Doktora	Sivas Bilim ve Teknoloji Üniv./ Bitki Koruma	2025
Yüksek lisans	Marmara Üniversitesi/ FBE/ Biyoloji	2014
Lisans	Marmamara Üniversitesi/ Biyoloji Öğretmenliği	2006

İş Deneyimi

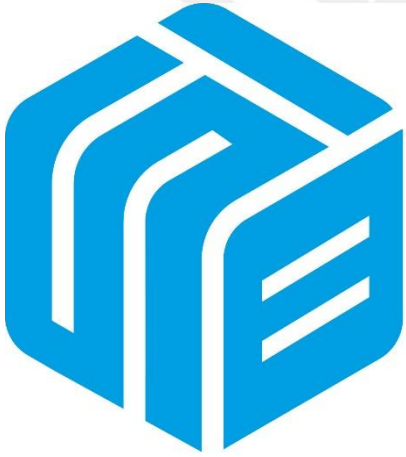
Yıl	Yer	Görev
2025-Halen	Sivas Selçuk Anadolu Lisesi	Biyoloji Öğretmeni
2015-2025	Sivas Şehit Furkan Peker Anadolu Lisesi	Biyoloji Öğretmeni

Yabancı Dil

İngilizce (B2)

Yayınlar

- Kısacık, A., Asım, M., (2023). Application Of Chemical Mutagens For Inducing *In Vitro* Mutagenesis In Plants. Şener, L., Gökçay, G. (Ed.), 2. *International Uludağ Scientific Researches Congress* (490-498).
- Kısacık, A., Asım, M., (2023). Optomizing *In Vitro* Sterilization Of Different Sorghum (*Sorghum Bicolor* L.) Cultivars Şener, L., Gökçay, G. (Ed.), 2. *International Uludağ Scientific Researches Congress* (499-508).
- Kisacik, A., Aasim, M. (2025). Investigating the impact of ethyl amino sulphate (EMS) on *in vitro* germination indices of sorghum with Taguchi design. *Journal of Applied Biological Sciences* (Kabul edildi).



**SİVAS
BİLİM VE TEKNOLOJİ
ÜNİVERSİTESİ**

KÖKLERDEN GÖKLERE...