

## ***In vitro* Mutasyon İslahı Çalışmalarına Yönelik Olarak Farklı Gama Işını Kaynaklarının Kalanşo (*Kalanchoe blossfeldiana* Poelnn.) Yaprak Ayası Eksplantı Üzerine Etkilerinin Karşılaştırılması**

**Irmak ÇAKIN<sup>1</sup>, Burak KUNTER<sup>2</sup>, Kadriye Yaprak KANTOĞLU<sup>3\*</sup>, Aslıhan GÖKTUĞ<sup>4</sup>, Ebru AKYÜZ ÇAĞDAŞ<sup>5</sup>, Şeküre Şebnem ELLİALTIOĞLU<sup>6</sup>**

<sup>1</sup>Türkiye Enerji Nükleer ve Maden Araştırmaları Kurumu, Nükleer Enerji Araştırma Enst., Ankara; ORCID: 0000-0001-8886-5348

<sup>2</sup>Türkiye Enerji Nükleer ve Maden Araştırmaları Kurumu, Nükleer Enerji Araştırma Enst., Ankara; ORCID: 0009-0001-8546-7480

<sup>3</sup>Türkiye Enerji Nükleer ve Maden Araştırmaları Kurumu, Nükleer Enerji Araştırma Enst., Ankara; ORCID: 0000-0002-7247-9116

<sup>4</sup>Türkiye Enerji Nükleer ve Maden Araştırmaları Kurumu, Nükleer Enerji Araştırma Enst., Ankara; ORCID: 0009-0004-3646-5720

<sup>5</sup>Has Biotech Araştırma Geliştirme Tarım Sanayi ve Ticaret A.Ş., Antalya; ORCID: 0009-0000-7996-5371

<sup>6</sup>Doqutech Academy Ltd. Şti., Ankara Üniversitesi, Teknokent, Ankara; ORCID: 0000-0002-3851-466X

Gönderilme Tarihi: 27 Ağustos 2024

Kabul Tarihi: 30 Aralık 2024

### **ÖZ**

Kalanşo (*Kalanchoe blossfeldiana* Poelnn.) uzun ömürlü iç mekân süs bitkisi türlerinden biri olup *in vitro* rejenerasyon kabiliyeti yüksektir. Bu çalışmada *in vitro* mutasyon ıslahı çalışmasına yönelik olarak yaprak ayası eksplantlarında, iki farklı gama ışınlama kaynağında ışınlama yapılarak etkili mutasyon dozlarının belirlenmesi (EMD<sub>50</sub>) ve kaynak etkisinin ortaya konulması hedeflenmiştir. Bu amaçla her dozda 60'şar yaprak ayası eksplantı olacak şekilde *in vitro* kültürler on dört farklı dozda (0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140 ve 160 Gy) Co<sup>60</sup> (235 Gy/h) ve Cs<sup>137</sup> (821 Gy/h) gama ışın kaynakları ile ışınlanmıştır. Işınlanan *in vitro* eksplantlar ışınlama sonrasında rejenerasyon ortamına (2.0 mg.L<sup>-1</sup> TDZ ve 0.5 mg.L<sup>-1</sup> NAA) transfer edilmişlerdir. Işınlamayı takip eden kırk beşinci günde eksplantlarda sürgün rejenerasyonu başarı yüzdeleri tespit edilerek iki farklı gama kaynağının etkileri karşılaştırılmıştır. *In vitro* rejenerasyon amacıyla S2 kodlu uygulamanın (%15'lik NaClO içeren sterilizasyon çözeltisi) ve R3 kodlu 2.0 mg.L<sup>-1</sup> TDZ ve 0.5 mg.L<sup>-1</sup> NAA içeren MS besin ortamının kullanılabilmesi belirlenmiştir. EMD<sub>50</sub> dozu olarak, Cs<sup>137</sup> kaynağı için 79.97 Gy ve Co<sup>60</sup> kaynağı için ise 103.54 Gy hesaplanmıştır. Bununla birlikte kobalt kaynağı için daha yüksek dozlarda bazı yeni uygulamaların yapılması önerilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Cs<sup>137</sup> (Sezyum 137), Co<sup>60</sup> (Kobalt 60), EMD<sub>50</sub>, Kalanşo (*Kalanchoe blossfeldiana* Poelnn.)

### **Comparison of the Effects of Different Gamma Ray Sources on *Kalanchoe* (*Kalanchoe blossfeldiana* Poelnn.) Leaf Blade Explants for *in vitro* Mutation Breeding Studies**

#### **ABSTRACT**

*Kalanchoe* (*Kalanchoe blossfeldiana* Poelnn.) is a long-lived indoor ornamental plant species with high *in vitro* regeneration ability. The aim of this study was to determine the effective mutation doses (EMD<sub>50</sub>) in leaf blade explants for *in vitro* mutation breeding using two different gamma irradiation sources and to identify the source effect. For this purpose, *in vitro* cultures were irradiated with <sup>60</sup>Co (235 Gy/h) and <sup>137</sup>Cs (821 Gy/h) gamma ray sources at fourteen different doses (0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, and 160 Gy) with 60 leaf blade explants at each dose. Irradiated *in vitro* explants were transferred to the regeneration medium (2 mg.L<sup>-1</sup> TDZ and 0.5 mg.L<sup>-1</sup> NAA) after irradiation. Indirect shoot regeneration success percentages were determined on the forty-fifth day following irradiation, and the effects of the two different gamma sources were compared. S2 (15% NaClO sterilization solution) and R3 (MS nutrient medium containing 2.0 mg.L<sup>-1</sup> TDZ and 0.5 mg.L<sup>-1</sup> NAA) could be used for *in vitro* regeneration. The EMD<sub>50</sub> dose was calculated as 79.97 Gy for the <sup>137</sup>Cs source and 103.54 Gy for the <sup>60</sup>Co source. However, some new applications of higher doses of cobalt sources have been suggested for higher doses of cobalt source.

**Keywords:** <sup>137</sup>Cs (Cesium 137), <sup>60</sup>Co (Cobalt 60), EMD<sub>50</sub>, *Kalanchoe* (*Kalanchoe blossfeldiana* Poelnn.)

### **GİRİŞ**

Afrika orijinli olan kalanşo (*Kalanchoe blossfeldiana* Poelnn.), *Crassulaceae* familyasında yer alan ve saksılı bitkiler grubu içinde farklı çiçek

rengi, çiçek ve yaprak yapısı ile öne çıkan bir süs bitkisidir. Ayrıca bazı yabancı akraba türlerinin geleneksel tıpta romatizmal ve iltihabi hastalıklara karşı kullanılmış olduğu bilinmektedir [1, 2]. Son yıllarda ise içerdiği antioksidanlar nedeni ile

\*Sorumlu yazar / Corresponding author: kayaprakta@yahoo.com

kanser tedavisi ile ilgili çalışmalar [3] açısından da önem arz etmektedir. *K.blossfeldiana*'nın saksılı süs bitkisi olarak kullanımının yanı sıra kesme çiçek [4] ve dış mekân süs bitkisi olarak değerlendirilmesine yönelik bir eğilim de söz konusudur [5]. Türün ticari olarak çoğaltımı ve üretiminde doku kültürü yöntemleri son dönemde oldukça önem kazanmıştır [6]. Geçmişten günümüze kadar olan süreçte *in vitro* çoğaltımda yaprak ayası, bitki gövdesi parçaları ve sürgün uçları eksplantlarının rejenerasyon amacıyla kullanıldığı bilinmektedir [7-10]. Türe yönelik olarak 1930'lu yılların başından itibaren çeşit geliştirmek amacı ile yapılan çalışmalar içinde melezleme ıslahı halen etkinliğini korumakla birlikte yeni teknolojik ilerlemelerle de paralel olarak doku kültürü teknikleri ile entegre ıslah ve biyoteknolojik yöntemlere yönelik yaklaşımlardan yararlanılmaktadır [11]. Diğer türlerde olduğu gibi kalansoda da klasik ıslah yöntemleri içinde yer alan mutasyon ıslahı alternatif genetik varyasyon oluşturmak üzere yararlanılan bir yöntemdir. Türe özgü olarak yapılan *in vivo* ve *in vitro* mutasyon ıslahı çalışmaları değerlendirildiği zaman mutasyon uyarımını sağlayan kimyasal ve fiziksel mutagen kaynaklar, bu kaynakların etki mekanizmaları, mutagene maruz bırakılacak olan bitkisel materyal ve materyalin kimyasal içeriği, gelişme dönemi gibi faktörler önem arz etmektedir [12, 13]. Dolayısı ile mutagen olan kaynağın ve biyolojik materyalin özelliklerinin bilinmesi yapılacak çalışma adına dikkat çekicidir [14, 15]. Mutasyon ıslahına yönelik çalışmalar genel olarak değerlendirildiği zaman uygulama kolaylığı nedeniyle iyonize radyasyon kaynaklarının (gama, X ışını, hızlı nötron, elektron hızlandırıcısı, ağır iyon kaynakları gibi) kimyasal mutagenlere göre daha ağırlıklı olarak kullanılmakta olduğu görülmektedir. Uluslararası Atom Enerjisi Ajansı Mutant Veri Bankası (IAEA-MVD) incelendiği zaman bugüne kadar mutasyon ıslahı ile kalansoda için Hollanda ve Japonya'da dört çeşidin geliştirildiği görülmektedir [16]. İyonize radyasyon uygulamalarında biyolojik canlı tarafından absorbe edilen iyonize radyasyon canlıda moleküler seviye etkiye neden olmaktadır. Işın uygulaması sonucunda DNA, enzim ve ATP gibi makro moleküller ile koenzim gibi daha küçük moleküllere etki ederek mutasyon adı verilen değişimlere neden olmaktadır [17]. Her bir iyonize radyasyon kaynağı sahip olduğu iyonizasyon kapasitesine göre sahip oldukları Lineer Enerji Transferi (LET) değeri ile kategorize edilir [18]. Buna göre gama ışın kaynağı olan  $Co^{60}$  ve  $Cs^{137}$  düşük LET düzeyine sahip kaynaklardır [19, 20]. Genel bir değerlendirme yapıldığı zaman iyonize radyasyon kaynakları içinde tarımsal, tıbbi, gıda uygulamaları ve endüstriyel radyasyon teknolojileri açısından

dünya genelinde  $Co^{60}$  radyoizotopunun uygulamada kullanıldığı ve tercih edildiği bilinmektedir. Gama radyasyon kaynaklarını bir başka anlamda kıyaslar isek nükleer ya da olabilecek bir radyolojik kaza durumunda güvenlik yönünden  $Cs^{137}$ 'ye göre  $Co^{60}$  kaynaklarının radyasyon kirliliği, kontaminasyon ve nükleer kirlilik oluşturma riski düşüktür. Çünkü yayılım mekanizmaları birbirinden farklılık göstermektedir. Bu kaynaklar yarı ömürleri açısından değerlendirildiği zaman ise  $Co^{60}$  kaynağının yarı ömrünün 5.271 yıl buna karşılık  $Cs^{137}$  kaynağının yarı ömrü ise 30.07 yıldır [20]. Buna karşılık enerji açısından iki kaynak karşılaştırıldığında  $Co^{60}$ 'ın enerjisi  $Cs^{137}$ 'ye göre daha yüksektir. Bu da uygulama yapılan örneğe gama ışınlarının girişkenliği üzerinde etkilidir.  $Cs^{137}$ 'ye göre  $Co^{60}$ 'ın girişkenliği ve doz hızı daha yüksektir. Bu nedenle her iki gama kaynağı açısından diğer iyonize radyasyon kaynakları ile bir kıyaslama yapıldığı zaman gama radyasyonunun enerjisi yüksek olduğu için ışınlama ile ortaya çıkacak etki mekanizması üzerinde ışınlanma süresi anlamında olan etki kritiktir [21]. Ancak iyonize radyasyon kaynaklarının uygulama yapılan biyolojik materyale girişkenliğinin de iyi bilinmesinde yarar vardır. Çünkü gama ışınları 100 kiloelektronvolt (keV)'un üzerinde foton enerjisine ve yüksek penetrasyon gücüne sahiptir. Gama ışını kaynağı olan  $Co^{60}$  ve  $Cs^{137}$  uygulandığı biyolojik dokuyu sahip olduğu enerji nedeniyle delip geçerken elektron hızlandırıcı ve diğer kaynaklar sahip oldukları düşük enerji seviyesine göre gama kaynaklarına göre daha az girişkenlik özelliğine sahiptirler [22]. Ancak her iki gama kaynağının girişkenliği birbiri ile karşılaştırıldığı zaman  $Co^{60}$  ve  $Cs^{137}$ 'ye göre daha penetrasyon oranı güçlü olan bir iyonize radyasyon kaynağıdır. Burada kaynağın sahip olduğu enerjinin ve doz hızının bilinmesi ışınlama çalışmasının doğru ve etkili yapılması adına önemli bir kritik noktadır. Çünkü yüksek enerjiye sahip kaynaklarda doğru doz haritalaması yapılmaz ve ışınlanma süresi biyolojik materyale göre ayarlanmaz ise örnek kayıpları çok fazla olabilmektedir. Bu nedenle gerek gama kaynakları gerekse diğer iyonize radyasyon kaynakları ile mutasyon ıslahı çalışmasına başlamadan önce mutlaka ön çalışma olarak ana mutant popülasyonun oluşturulmasına yönelik olarak üzerinde çalışılacak genotipe özgü EMD<sub>50</sub> dozunun belirlenmesi gerekmektedir.

Burada sonuçları sunulan çalışmada farklı doz hızı ve enerjiye sahip olan iki farklı gama ışını kaynağı olan  $Co^{60}$  ve  $Cs^{137}$  kaynaklarında kalansoda bitkisine ait yaprak ayası eksplantlarının ışınlanması sonucunda kaynak etkisinin ortaya çıkarttığı etkilerin karşılaştırılması ve her iki kaynağa göre EMD<sub>50</sub> dozunun belirlenmesi hedeflenmiştir.

## MATERYAL VE METOT

### Materyal

Bu çalışmada yerli üreticiden temin edilen turuncu çiçeklere sahip bir genotip kullanılmıştır (Şekil 1). Genotipin stok bitkileri yaprak çelikleri ile çoğaltılmış ve çoğaltılan bitkilere ait 1×1 cm boyutlu olarak hazırlanan yaprak ayası parçaları (Şekil 1) *in vitro* kültüre alınarak ışınlamada kullanılmıştır.



Şekil 1. Çalışmada kullanılan kalanşo bitkisi ve kültüre almak üzere hazırlanan yaprak ayası parçaları

### Metot

#### *In Vitro* Yaprak Ayası Kültürlerinin Kurulması

Yaprak ayası eksplantlarından *in vitro* rejenerasyon sağlamak amacıyla Bejaoui vd. [10]'nin çalışması baz alınmış ancak ortaya çıkan ihtiyaçlar doğrultusunda yöntemler modifiye edilmiştir. Bu amaçla öncelikle en etkili sterilizasyon yöntemini belirlemek üzere aşamalı olarak deneme kurulmuştur (Çizelge 1). Sterilizasyon çözeltisinin sodyum hipoklorit dozu etkinliğini incelemek üzere iki farklı içerik hazırlanmış, bu işlemin öncesinde yaprak ayaları steril saf su ile ön yıkamaya tabi tutulmuştur. Sterilizasyon işlemi sonrasında yaprak ayalarından hazırlanan eksplantlar üç tekerrürlü olarak, her tekerrürde 60'şar adet eksplant olacak şekilde büyüme düzenleyici madde içermeyen Murashige ve Skoog [23] (MS) besin ortamında kültüre alınarak eksplantların kontamine olma durumu iki hafta süre ile izlenmiştir.

Çalışma sırasında belirlenen sterilizasyon yöntemi ile steril edilen yaprak ayası eksplantları Bejaoui vd. [10]'nin çalışmasında belirtilen besin ortamı bileşimi (1 mg.L<sup>-1</sup> BAP ve 0.5 mg.L<sup>-1</sup> NAA içeren MS) kültüre alınan genotip için etkili sonuç vermeyince, yaprak eksplantları Çizelge 2'de sunulan besin ortamlarında Thidiazuron (TDZ)'un farklı kombinasyonları (0.5, 1.0 ve 2.0 mg.L<sup>-1</sup>) ile 0.5 mg.L<sup>-1</sup> Naphthaleneacetic acid (NAA) içeren MS

besin ortamlarında kültüre alınmıştır. Tüm besin ortamı kombinasyonlarının pH'ı 5.6, sakaroz içeriği 30 g.L<sup>-1</sup> ve agar içeriği 7 g.L<sup>-1</sup> olarak sabit tutulmuştur. Kültür başlangıcını takip eden ilk yedi gün kültürler 24±1°C sıcaklıkta ve karanlık koşullardaki iklimlendirmeli inkübatörde inkübe edilmiş daha sonra 16/8 h aydınlatma rejimine sahip aynı sıcaklık koşullarında tutulmuştur.

Etkili rejenerasyon ortamı içeriği belirlendikten sonra yaprak ayalarından rejenera olan bitkicikler (Şekil 2), büyüme düzenleyici madde içermeyen MS besin ortamına aktararak tam bitki formuna dönüşmüş ve gelişmelerini tamamlamışlardır.

Çizelge 1. Yaprak ayası eksplantlarının yüzeysel sterilizasyonu için denenen farklı NaClO dozları içeren çözelti bileşimleri ve sterilizasyon aşamaları

Uygulama No	Sterilizasyon Aşamaları
S1	%70'lik EtOH (5 saniye) + steril saf su ile 3 kez çalkalama + 1-2 damla Tween-20 içeren %10'luk NaClO çözeltisinde (10 dakika) + steril saf su ile 3 kez çalkalama
S2	%70'lik EtOH (5 saniye) + steril saf su ile 3 kez çalkalama + 1-2 damla Tween-20 içeren %15'lik NaClO çözeltisinde (10 dakika) + steril saf su ile 3 kez çalkalama

Çizelge 2. Yaprak ayası eksplantlarından rejenerasyon sağlamak üzere denenen besin ortamı içerikleri

Besin Ortamı Kodu	Besin Ortamı İçeriği
R1	MS (0.5 mg.L <sup>-1</sup> TDZ + 0.5 mg.L <sup>-1</sup> NAA)
R2	MS (1.0 mg.L <sup>-1</sup> TDZ + 0.5 mg.L <sup>-1</sup> NAA)
R3	MS (2.0 mg.L <sup>-1</sup> TDZ + 0.5 mg.L <sup>-1</sup> NAA)

#### *Etkili Mutasyon Dozunun Belirlenmesi*

Belirlenen sterilizasyon uygulaması ve genotipe göre etkisi teyit edilen besin ortamında 1×1 cm boyutunda *in vitro* kültüre alınan yaprak ayaları Türkiye Enerji Nükleer ve Maden Araştırma Kurumu, Nükleer Enerji Araştırma Enstitüsü bünyesinde bulunan Co<sup>60</sup> (Doz hızı: 235 Gy/h) ve Cs<sup>137</sup> (Doz hızı: 821 Gy/h) gama ışın kaynaklarında on dört farklı dozda (0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140 ve 160 Gy) ve her dozda 60 eksplant olacak şekilde büyüme düzenleyici madde içermeyen MS besin ortamında ışınlanmıştır. Işınlama sonrası hızla ışınlama sonucunda besin ortamında oluşması beklenen radikallerin toksik etkilerinden eksplantları korumak üzere tüm eksplantlar ana rejenerasyon ortamına aktarılmıştır. Işınlamayı takip eden 45. günde eksplantlardan bitki rejenerasyonu gözlemi yapılarak dozlara göre rejenerasyon oranları belirlenmiştir.

#### *İstatistiksel Analiz*

Her iki iyonize radyasyon kaynağında yapılan ışınlama sonrasında elde edilen rejenerasyon verileri

lineer regresyon analizine tabi tutularak her iki kaynaktan ışınlanan bitkisel örneğe ait EMD<sub>50</sub> dozu belirlenmiştir. Genotipe uygun sterilizasyon ve besin ortamı kombinasyonunu belirlemek üzere tesadüf parselleri deneme desenine göre üç tekerrürlü olarak denemeler her tekerrürde 60 paralel olarak kurulmuştur. Sonuçlar Minitab ve Mstact istatistik paket programları ile analiz edilmiştir. Duncan testi çoklu karşılaştırmada uygulamalar arası farklılığı belirlemek üzere (p<0.01) uygulanmıştır.

## BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu araştırmanın ilk aşamasında *in vitro* kültüre alınan yaprak ayaları için etkili NaClO dozunu belirlemek üzere iki uygulama denenmiştir. Denen iki uygulamadan S2 kodlu %15 oranında NaClO içeren sterilizasyon solüsyonu %100 oranında kültürlerin sağlıklı kalmasını sağlayan işlem akışını sağlamıştır (Çizelge 3). Dolayısı ile elde edilen sonuçla kendi laboratuvar koşullarımız açısından en etkili sterilizasyon sağlanmıştır. Bugüne kadar kalanço için farklı eksplant tiplerinde (boğum parçaları, yaprak diskleri, sürgün ucu vb.) sterilizasyonu sağlamak üzere farklı uygulama ve sterilizasyon ajanlarının kullanıldığı görülmektedir [6, 9, 10]. Dolayısı ile eksplant kaynağı ve laboratuvar koşulları da göz önüne alınarak doğru sterilizasyon yönteminin belirlenmesi ile [1] materyal ve zaman kaybının önüne geçilmiştir.

Yaprak ayası eksplantlarının farklı hormon kombinasyonları içeren MS besin ortamları üzerindeki rejenerasyon oranları Çizelge 4'te verilmiştir. Denemede yer alan üç farklı besin ortamı içinde R3 kodlu 2.0 mg.L<sup>-1</sup> TDZ + 0.5 mg.L<sup>-1</sup> NAA içeren MS besin ortamı, kalanço eksplantlarında %100 oranında rejenerasyon sağlayan ortam olarak belirlenmiştir (Çizelge 4). Bu besin ortamını %85 rejenerasyon oranı ile R2 ortamı izlerken en düşük rejenerasyon %45 oranı ile R1 ortamında gerçekleşmiştir. Kaviani vd. [24]; NAA, TDZ ve 2,4-D gibi büyümeyi düzenleyici maddelerin farklı tip eksplantlarda rejenerasyon kapasitesi üzerinde etkili olduğunu belirterek genotip tepkisinin mutlaka göz önünde tutulması gerektiğine dikkat çekmiştir. Benzer olarak yine yaprak ayası kullanılarak yapılan bir diğer çalışmada %3 sakaroz, %0,7 agar, 1 mg.L<sup>-1</sup> BAP ve 0.5 mg.L<sup>-1</sup> NAA içeren, pH'ı 5.7 olan MS besin ortamı en iyi rejenerasyonu sağlamıştır [10]. Genotip tepkisinin yaratacağı farklılık göz önüne alınarak belirlenen BGD içeriklerinde daha önce beyaz çiçekli başka bir genotipte yapılan çalışmadan farklı olarak çalışmamızda kullanılan turuncu renkli farklı bir kalanço genotipindeki *in vitro* rejenerasyon yanıtları farklı olmuştur. Kalanço'da çeşit

geliştirmede türler arası melezlemeler oldukça etkin kullanılmakta [5] ve farklı gen havuzlarından elde edilen ticari çeşitler yurt dışından ithal edilerek ülkemizde satışı yapılmaktadır. Bu nedenle farklı çalışmalarda kullanılan farklı kalanço genotiplerinin rejenerasyon için birbirinden farklı BGD içeriklerine ihtiyaç duymaları öngörülebilir bulunmuştur. Ayrıca genotip etkisinin yanı sıra, eksplantın donör bitkiden alındığı zamandaki fizyolojik durumu, yaprakların pozisyonu ve yaşı da iyi bir rejenerasyonu sağlayacak olan ortam kombinasyonunun belirlenmesinde de etkili olan faktörler arasında yer almaktadır [8, 20].

Çizelge 3. Yaprak ayası eksplantlarının sterilizasyonu için denene yöntemler

Sterilizasyon Uygulaması No	Kültüre Alınan Eksplant Sayısı	Enfeksiyonsuz Kültür Oranı (%)
S1	180	0 b
S2	180	100 a*

\*(LSD Val=0.0151, Sx=0.0042, Duncan testine göre harfler ortalamalar arasındaki farklılığı p<0.01 sınırlarında tanımlamaktadır)

Çizelge 4. Yaprak ayası eksplantlarının farklı oranda TDZ içeren MS besin ortamında ortalama rejenerasyon değerleri

Besin Ortamı Kodu	Kültüre Alınan Eksplant Sayısı	Rejenerasyon Oranı (%)
R1	180	45 c
R2	180	85 b
R3	180	100 a*

\*(LSD Val=0.0150, Sx=0.0040, Duncan testine göre harfler ortalamalar arasındaki farklılığı p<0.01 sınırlarında tanımlamaktadır)



Şekil 2. R3 ortamında kültüre alınan yaprak ayası eksplantlarından bitki rejenerasyonu

Yaprak ayası eksplantlarının turuncu renkli genotipe uygun rejenerasyon ortamı belirlendikten sonra bu eksplant tipi ile yapılacak *in vitro* mutasyon çalışmasına yönelik olarak iki farklı gama ışını kaynağı (Co<sup>60</sup>, Cs<sup>137</sup>) ile ışınlama yapılmıştır. Burada EMD<sub>50</sub> dozunu belirlemenin dışında farklı enerji seviyelerine sahip iki gama kaynağının eksplant üzerinde yapmış olduğu etkileri de belirlemek üzere sonuçlar irdelenmiştir.

On dört farklı dozda her iki ışınlama kaynağında ışınlanan eksplantların rejenerasyon ortamına transferini takip eden 60. günde gözle ve gerektiği koşullarda binoküler mikroskop yardımı ile 10x büyütmede eksplantlarda sayım yapılarak rejenerasyon durumu saptanmıştır (Şekil 3). Yapılan

gözlemler sonucunda Cs<sup>137</sup> ışın kaynağında ışınlanan eksplantlarda fiziksel zarar olarak Co<sup>60</sup> gama kaynağına göre daha az zarar olduğu izlenmiştir. Uygulama dozları açısından yapılan değerlendirmede Cs<sup>137</sup> kaynağında 70 Gy'lik uygulamadan sonra rejenerasyon kapasitesinde önemli ölçüde bir azalma olduğu %78 oranında 70 Gy'de sağlanan rejenerasyonun 80 Gy ve üzerindeki dozlarda ortalama olarak %18.16'ya gerilediği saptanmıştır.



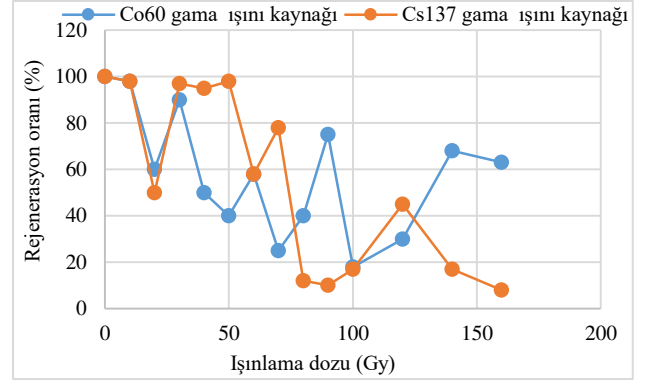
Şekil 3. Co<sup>60</sup> ve Cs<sup>137</sup> radyasyon gama kaynaklarında ışınlanan eksplantların rejenerasyon durumu

Buna karşılık Co<sup>60</sup> kaynağının ise 160 Gy'lik uygulamada dahi eksplantların rejenerasyon yeteneğini azalarak da olsa sürdürdüğü belirlenmiştir (Şekil 4). Co<sup>60</sup> kaynağında 70 Gy'lik uygulama ile ciddi bir rejenerasyon gerilemesi olduğu ancak artan dozlarda bu oranın %49 seviyesinde seyrettiği belirlenmiştir. Sezyum kaynağındaki kararlı gerilemenin kobalt kaynağında sağlanamadığı Şekil 4'de izlenmektedir. Gama kaynağı ile yapılan ışınlama sonucunda elde edilen veriler ile yapılan regresyon analizi sonucu aşağıda sunulan formülde (Formül 1.) görüldüğü üzere y kontrol olan 0 Gy'lik uygulamada elde edilen rejenerasyon değerinin %50 değerini temsil ederken, x olarak tanımlanan değer ise EMD<sub>50</sub> dozunu tanımlamaktadır Buna göre Cs<sup>137</sup> uygulamasının sonucu olarak EMD<sub>50</sub> dozu 79.97 Gy olarak belirlenmiştir. Buna karşılık Co<sup>60</sup> kaynağı ile yapılan ışınlama sonucunda ise EMD<sub>50</sub> dozu 103.54 Gy olarak bulunmuştur (Formül 2).

$$-0,7298x + 108,36 = y \text{ (Formül 1)}$$

$$-0,2398x + 74,828 = y \text{ (Formül 2)}$$

Ancak Co<sup>60</sup> kaynağı için lineer regresyon analizinde elde edilen r<sup>2</sup> değerinin 0.70'den az olması ve artan dozlarda yaklaşık %50 civarında rejenerasyon kapasitesinin korunarak özellikle 140 ve 160 Gy uygulamalarındaki rejenerasyon oranının %60'ın üzerinde gerçekleşmesi de göz önüne alınarak çalışılan genotipe yönelik olarak mutlaka 160 Gy'lik dozun üzerindeki ışınlama dozlarının da denenmesi gerekliliği ortaya çıkmıştır. Bugün dünyada pek çok türde farklı ışınlama kaynakları (düşük ve yüksek enerjili) kullanılarak ışınlama ve mutasyon ıslahına yönelik çalışmalar yapılmaktadır [25, 26].



Şekil 4. İki farklı gama kaynağında ışınlanan eksplantların dozlarla göre rejenerasyon oranları (%)

Çalışmada kullanılan biyolojik materyal tipi (tohum, *in vitro* eksplant, çelik vb.) ve buna bağlı olarak su içeriği, ışınlama yapılacak olan kaynağın LET değeri, radyasyon kaynağının yarattığı fiziksel ve kimyasal etkiler, ışınlamada kullanılan kaynağın yarı ömür durumu ve buna bağlı olarak sahip olduğu doz hızı, ışınlama sırasında ortamın oksijen seviyesi gibi faktörler önemlidir [19, 29]. Elde edilen bulgular değerlendirildiği zaman öncelikle öne çıkan ilk parametre ışınlama kaynağının sahip olduğu doz hızıdır. Çünkü Cs<sup>137</sup> kaynağı daha yüksek bir doz hızına (821 Gy/h) sahip olduğu için ışınlama sırasında doku içine penerte olma gücü Co<sup>60</sup> kaynağına göre daha düşük görünse de kısa sürede etkili bir doz dağılımı eksplantlar açısından elde edilen EMD<sub>50</sub> dozu doğrultusunda sağlanmış durumdadır. Co<sup>60</sup> kaynağının doz hızı ise 235 Gy/h olmakla birlikte Cs<sup>137</sup> kaynağı ile kıyaslandığı zaman ışınlama süresinin daha uzun olduğu bu nedenle de özellikle *in vitro* materyal açısından besin ortamında serbest radikal oluşumunun daha hızlanması ve oksijen miktarının da buna bağlı olarak azalması ile birlikte eksplantlar üzerinde farklı etkiler oluşturabilme olasılığı mevcuttur [20, 22, 27]. Bu nedenle de Co<sup>60</sup> uygulamasında kullanılmış olan on dört farklı ışınlama dozunun genotip tepkisi de göz önüne alınarak yeterli olmadığı görülmüştür. Benzer etkiler ve bulgular farklı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda da ortaya konmuştur [19, 20, 22, 28, 29].

## SONUÇ

Islah çalışmalarının süresini hızlandırmak ve gen havuzunu genişletmek amacı ile *in vitro* mutasyon ıslahı çalışmaları halen popülerliğini korumaktadır. Bu araştırma kapsamında yaprak ayası eksplantı kullanımı başlangıç materyali olarak planlanan *in vitro* mutasyon ıslahı çalışmasına yönelik olarak öncelikle *in vitro* kültür başlangıcına yönelik etkili sterilizasyon ve rejenerasyon ortamının optimize

edilmesi hedeflenmiştir. Yapılan çalışma sonucunda S2 kodlu uygulamanın (%15'lik NaClO içeren sterilizasyon çözeltisi) ve R3 kodlu 2.0 mg.L<sup>-1</sup> TDZ ve 0.5 mg.L<sup>-1</sup> NAA içeren MS besin ortamının çalışılan genotip için en etkili rejenerasyonu sağladığı belirlenmiştir. Geniş bir varyasyona sahip mutant bir popülasyon ile mutasyon ıslahı çalışmalarını yapabilmek üzere çalışılan genotip, eksplant tipi ve mutasyon uyartımında kullanılacak olan mutagen kaynağına göre EMD<sub>50</sub> dozunun belirlenmesi gerekmektedir. Bu amaçla hem EMD<sub>50</sub> dozunu hem de iki farklı gama ışınlama kaynağı ile yapılan ışınlamanın etkilerini belirlemek üzere yaprak ayası eksplantları on dört farklı dozda ışınlanmış ve Cs<sup>137</sup> kaynağı için EMD<sub>50</sub> dozu 79.97 Gy Co<sup>60</sup> kaynağı için ise 103.54 Gy olarak belirlenmiştir. Ancak Co<sup>60</sup> kaynağında elde edilen rejenerasyon verilerinde artan doza bağlı olarak rejenerasyon kapasitesinde olması beklenen azalma beklendiği ölçüde gerçekleşmediği için mutlaka 160 Gy'ın üzerindeki dozların doğru bir EMD<sub>50</sub> dozunun belirlenmesine yönelik uygulanması gerektiği sonucu ortaya çıkmıştır. Dolayısı ile bu çalışma ile ortaya konmak istenen iki gama radyasyon kaynağının gerek kaynakların doz hızı ve gerekse bu doz hızına bağlı olarak örneklerin ışınlanma süresi arasında ortaya çıkan farklılığın eksplant rejenerasyonu ve EMD<sub>50</sub> dozu üzerinde önemli etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Özellikle *in vitro* mutasyon ıslahı çalışmalarında bu sonuçlar göz önüne alınarak doz planlaması yapılmasının önemi bir kez daha teyit edilmiştir. Gelecek on yıl içinde gama kaynaklarının yerini elektrikle aktive olan X ışını, elektron hızlandırıcı gibi düşük enerjili iyonize kaynakların alması beklenmektedir. Bu kaynakların etki mekanizmaları bilinerek mutasyon ıslahı çalışmalarına başlanması başarılı sonuçların alınması adına önemlidir.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma TENMAK-NÜKEN imkânlarıyla yürütülen A2.H1.P16 numaralı projenin bir bölümüdür. Desteklerinden dolayı TENMAK'a teşekkürlerimizi sunarız.

## KAYNAKLAR

1. Gümüş, C., Ellialtıoğlu, Ş.Ş. 2018. A review on tissue culture studies of *Kalanchoe blossfeldiana* Poelln. Turkish Journal of Scientific Reviews, 11(1):18-26, e-ISSN:2146-0132. (In Turkish).
2. Anonymous 2024. Kalancho. <https://en.wikipedia.org/wiki/kalanchoe> (Erişim Tarihi: Nisan 2024).
3. Stefanowicz-Hajduk, J., Hering, A., Gucwa, M., Sztormowska-Achranowicz, K., Kowalczyk, M., Soluch, A., Ochocka, J.R. 2022. An *in vitro* anticancer, antioxidant, and phytochemical study on water extract of *Kalanchoe daigremontiana* Raym.-Hamet and H.Perrier. *Molecules*, 31, 27(7):2280.
4. Kahraman, M., U., Boyacı, F. 2021. Kalancho. Eds: Kazaz, S., Mendi Yalçın, Y., Süs Bitkileri Islahı (Türler) Gece Kitaplığı, Ankara, s:239-282, ISBN:978-625-7478-250-2.
5. Kahraman, M.U., Yalçın Mendi, Y., Karabıyık, Ş., Lütken, H.V., Favero, B.T. 2022. Kalanchoë Breeding: Past, Present and Future. *Ornamental Horticulture* 28(1):19-35.
6. Bhuiyan, M.S.U., Kim, T., In, J.G., Yang, D.C., Choi, K.S. 2006. Plant regeneration from leaf explants of *Kalanchoe daigremontiana* Hamet & Perrier. *Korean Journal of Medicinal Crop Science* 14(5):293-298.
7. Smith, R.H., Nightingale, A.E. 1979. *In vitro* propagation of *Kalanchoe*. *HortScience* 14(1):20.
8. Linjian, F., Dongpo, J., Xinshuan, Z. 2006. Research of different culture conditions on plantlet regeneration from leaves of *Kalanchoe blossfeldiana*. *Chinese Agricultural Science Bulletin* 5. [http://en.cnki.com.cn/article\\_en/cjftotalzntb200605021.htm](http://en.cnki.com.cn/article_en/cjftotalzntb200605021.htm) (Erişim: Nisan 2024)
9. Altındağ Çelik, F.N. 2022. Investigations on *in vitro* regeneration and micropropagation from leaf explants of *Kalanchoe blossfeldiana* (Kalanchoe) (M.Sc. Thesis). Bartın University, Graduate School of Natural and Applied Sciences, Department of Horticulture, Bartın, 67p.
10. Bejaoui, R., Özdemir, G.E., Ellialtıoğlu, Ş.Ş. 2023. *In vitro* or ex vitro rooting and acclimatization of *Kalanchoe blossfeldiana* Poelln. shoots propagated by tissue culture technique. *Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi* 10(4):843-853.
11. Favaro, B.T., Tan, Y., Lin, Y., Hansen, H.B., Shadmani, N., Xu, J., He, J., Müller, R., Almeida, A., Lütken, H. 2021. Transgenic *Kalanchoë blossfeldiana*, containing individual rol genes and open reading frames under 35S promoter, exhibit compact habit, reduced plant growth, and altered ethylene tolerance in flowers. *Frontiers in Plant Science* 12:672023.
12. van Harten, A. M. 1998. Mutation breeding theory and practical applications. Cambridge University Press, UK, 353p.
13. Kharkwal, M. 2012. A brief history of plant mutagenesis. *Plant Mutation Breeding and Biotechnology*. CABI, Wallingford, pp:21-30.
14. Amaldi, U. 2000. The importance of particle accelerators. *Europhysics News* 31(6):5-9.

- 15.Datta, S.K. 2023. Technology package for induced mutagenesis. *Journal of Biology and Nature* 15(1):70-88.
- 16.MVD, 2024. Mutant variety database. <https://nucleus.iaea.org/sites/mvd/sitepages/search.aspx> (Erişim Tarihi: Mayıs 2024).
- 17.Farkash, E.A., Kao, G.D., Horman, S.R., Prak, E.T.L. 2006. Gamma irradiation increases endonuclease-dependent L1 retro transpositions in a cultured cell assay. *Nucleic Acids Research* 33(4):1196-1204.
- 18.Zengquan, W., Hongmei, X., Jianping, L., Shibin, Y., Yan, F., Zhongkui, X. 2003. Application of heavy ion beams in induced mutation breeding and molecular modification. *Nuclear Physics Review* 20(1):38-41.
- 19.Lagoda, P., Shu, Q., Foster, B., Nakagawa, H., Nakagawa, H. 2012. Effects of radiation on living cells and plant. *Plant Mutation Breeding and Biotechnology*. CABI Publishing, Wallingford, pp:123-124.
- 20.Spencer-Lopes, M.M., Foster, B.P., Jankuloski, L. 2018. Manual on mutation breeding third edition. FAO Publishing, Italy, 301p.
- 21.Taner, C.A. 2011. Yeni kuşak radyasyon teknolojileri uygulamaları ve kobalt-60 (Co<sup>60</sup>) gama ışınlama tesisleri. <https://www.fmo.org.tr/wp-content/uploads/2011/07/yeni-ku%5%9fak-radyasyon-teknolojileri-uygulamalar%4%b1-ve-kobalt-60-co-60-gama-1%5%9f%4%b1nlama-tesisleri.pdf> (Erişim Tarihi: Ağustos 2024).
- 22.Mba, C., Afza, R., Shu, Q., Shu, Q., Foster, B., Nakagawa, H. 2012. Mutagenic radiations: x-ray, ionizing particles and ultraviolet. *Plant Mutation Breeding and Biotechnology*. CABI, Oxfordshire, UK, pp:83-90.
- 23.Kaviani, B., Hashemabadi, D., Kordi, M. 2014. The effect of different concentrations of plant growth regulators on micropropagation of *Kalanchoe blossfeldiana* cv. White. *Journal of Ornamental Plants* 4(2):101-106.
- 24.Bado, S., Forster, B.P., Nielen, S., Ghanim, A., Lagoda, P.J., Till, B.J., Laimer, M. 2015. Plant mutation breeding: current progress and future assessment. *Plant Breeding Reviews* 39:23-88.
- 25.Melsen, K., van de Wouw, M., Contreras, R. 2021. Mutation breeding in ornamentals. *HortScience* 56(10):1154-1165.
- 26.Halliwell, B., Gutteridge, J.M. 2015. Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press, USA, 944p.
- 27.Micke, A., Donini, B. 1993. Induced mutations. (Eds. Hayward, M.D., Bosemark, N.O., Romagosa, I.). *Plant Breeding, Principles and Prospects*, Chapman & Hall, London, pp:52-62.
- 28.Leonard, A., Jacquet, P., Lauwerys, R. 1983. Mutagenicity and teratogenicity of mercury compounds. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology* 11(4):1-18.