

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



**DOMATESİN FARKLI GELİŞME DÖNEMLERİNDE UYGULANAN SOĞUK
STRESİNİN GEN EKSPRESYONU, MORFOLOJİK VE FİZYOLOJİK
ÖZELLİKLERE ETKİLERİ**

Serkan AYDIN

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ
ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

OCAK 2025

ANTALYA

T.C.

AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



**DOMATESİN FARKLI GELİŞME DÖNEMLERİNDE UYGULANAN SOĞUK
STRESİNİN GEN EKSPRESYONU, MORFOLOJİK VE FİZYOLOJİK
ÖZELLİKLERE ETKİLERİ**

Serkan AYDIN

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ
ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

OCAK 2025

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DOMATESİN FARKLI GELİŞME DÖNEMLERİNDE UYGULANAN SOĞUK
STRESİNİN GEN EKSPRESYONU, MORFOLOJİK VE FİZYOLOJİK
ÖZELLİKLERE ETKİLERİ**

Serkan AYDIN
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ
ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

**Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü
tarafından FDK-2022-5974 nolu proje ile desteklenmiştir.**

OCAK 2025
ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DOMATESİN FARKLI GELİŞME DÖNEMLERİNDE UYGULANAN SOĞUK
STRESİNİN GEN EKSPRESYONU, MORFOLOJİK VE FİZYOLOJİK
ÖZELLİKLERE ETKİLERİ**

Serkan AYDIN
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ
ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

Bu tez 16/01/2025 tarihinde jüri tarafından Oybirliği / Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Hatice İKTEN (Danışman)	[imza]
Prof. Dr. Cengiz TOKER	[imza]
Prof. Dr. Nedim MUTLU	[imza]
Doç. Dr. Hatice Filiz BOYACI	[imza]
Doç. Dr. Hasan PINAR	[imza]

ÖZET

DOMATESİN FARKLI GELİŞME DÖNEMLERİNDE UYGULANAN SOĞUK STRESİNİN GEN EKSPRESYONU, MORFOLOJİK VE FİZYOLOJİK ÖZELLİKLERE ETKİLERİ

Serkan AYDIN

Doktora Tezi, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Hatice İKTEN

Ocak 2025; 90 sayfa

Domates, tropik kökenli bir bitki olup, düşük sıcaklık stresine karşı verdiği tepkiler, uzun süredir bilimsel araştırmaların odak noktası olmuştur. Kültür domatesi ile yabani ve uzak akrabalarının abiyotik stres faktörlerine karşı verdikleri tepkiler, geniş bir genetik varyasyon sergilemektedir. Bu farklılıkların genetik mekanizmaları, etkili genler ve gen yolları üzerinde yapılan çalışmalar, biyokimyasal içeriklerle ilişkilendirilerek açıklığa kavuşturulmuştur. Çoğu araştırma, bu tepkilerin erken fide dönemine odaklanmış ve yapraklardan gen ifadeleri incelenmiştir.

Bu çalışmada, düşük sıcaklık stresine karşı hem erken fide hem de çiçeklenme dönemlerinde verilen tepkiler değerlendirilmiş, stresin meyve tutumu, meyve kalitesi, tohum verimi ve çimlenme gibi sonraki dönemlere etkileri de analiz edilmiştir. Araştırma kapsamında 18 farklı genotip test edilerek, biyokimyasal analizler (MDA, H₂O₂), klorofil içeriği ölçümleri (SPAD502) ve görsel değerlendirme kriterleri kullanılmıştır. Bu kriterlere göre tartılı derecelendirme yöntemi ile en hassas ve en toleranslı üç genotip seçilmiş ve ardından bu genotipler, +3°C düşük sıcaklığa 7 gün boyunca maruz bırakılmıştır.

Araştırma sonuçları, düşük sıcaklık stresine toleranslı genotiplerin, hassas genotiplere kıyasla daha stabil gen ifade seviyelerine sahip olduğunu ve biyokimyasal içeriklerinde daha az değişim gözlemlendiğini ortaya koymuştur. Toleranslı genotiplerde, çiçeklenme dönemindeki düşük sıcaklık uygulaması sonrası meyve tutum oranlarının daha yüksek olduğu ve meyve deformasyonları ile tohum kayıplarının daha az olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, bu genotiplerin tohum çimlenme oranlarının da yüksek olduğu saptanmıştır. Bu bulgular, *CBF* gen ailesi ve *LePOD* gibi genlerin yüksek ekspresyon gösterdiği genotiplerin, düşük sıcaklık toleransı üzerine yapılan ıslah programlarına dahil edilerek, dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesine katkı sağlayabileceğini göstermektedir. Toleranslı genotiplerin (R-5, R-6 ve R-7) kontrol genotipi (R-9) ile karşılaştırıldığında, fide ve çiçeklenme dönemindeki düşük sıcaklık stresine karşı daha dayanıklı oldukları ve düşük sıcaklığın bu genotiplerde meyve gelişimi üzerindeki olumsuz etkilerinin daha düşük olduğu gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar, düşük sıcaklık stresine karşı tolerans geliştirme açısından genetik mekanizmaların daha iyi anlaşılmasına katkıda bulunmakta ve domates yetiştiriciliğinde dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesine yönelik önemli bir rehber sunmaktadır.

ANAHTAR KELİMELEER: Abiyotik stres, Domates, Düşük sıcaklık, Gen ifadesi, RT-qPCR.

JÜRİ: Doç. Dr. Hatice İKTEN

Prof. Dr. Cengiz TOKER

Prof. Dr. Nedim MUTLU

Doç. Dr. Hatice Filiz BOYACI

Doç. Dr. Hasan PINAR



ABSTRACT

THE EFFECTS OF COLD STRESS APPLIED AT DIFFERENT DEVELOPMENT PERIODS OF TOMATO ON GENE EXPRESSION, MORPHOLOGICAL AND PHYSIOLOGICAL PROPERTIES

Serkan AYDIN

PhD Thesis in Biotechnology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Hatice İKTEN

January 2025; 90 pages

Tomato, a plant of tropical origin, has long been a focus of scientific research regarding its responses to low temperature stress. Both cultivated tomatoes and their wild relatives exhibit a wide genetic variation in their responses to abiotic stress factors. Studies have explored the genetic mechanisms, key genes, and gene pathways involved in this variation, which have been further elucidated through their association with biochemical contents. Most of these studies have focused on the early seedling stage, examining gene expression from leaves.

In this study, responses to low temperature stress were evaluated in both the early seedling and flowering stages, and the effects on fruit setting, fruit quality, seed yield, and germination in subsequent stages were analyzed. A total of 18 genotypes were tested, with biochemical analyses (MDA, H₂O₂), chlorophyll content measurements (SPAD502), and visual assessment criteria being used to compare genotypes. Principal component analysis and weighted rating methods were employed to select the three most sensitive and the three most tolerant genotypes, which were then exposed to +3°C low temperature for 7 days.

The results revealed that genotypes tolerant to low temperature stress exhibited more stable gene expression levels and showed less variation in biochemical contents compared to sensitive genotypes. In the tolerant genotypes, fruit set rates were higher after the low temperature treatment during the flowering stage, and fruit deformities and seed losses were less frequent. Additionally, the germination rates of seeds from these genotypes were found to be higher. These findings suggest that genotypes showing high expression of genes such as the CBF gene family and LePOD could be included in breeding programs aimed at improving low temperature tolerance. The tolerant genotypes (R-5, R-6, and R-7) were confirmed to be more resilient to low temperature stress during the seedling and flowering stages compared to the control genotype (R-9), with the negative effects of low temperature on fruit development being less pronounced in these genotypes. These results provide valuable insights into the genetic mechanisms behind low temperature tolerance and serve as an important guide for the development of resistant varieties in tomato breeding.

KEYWORDS: Abiotic stress, Gene expression, Low temperature, RT-qPCR, tomato

COMMITTEE: Do. Dr. Hatice İKTEN

Prof. Dr. Cengiz TOKER

Prof. Dr. Nedim MUTLU

Do. Dr. Hatice Filiz BOYACI

Do. Dr. Hasan PINAR



ÖNSÖZ

Tarımsal araştırmalar içerisinde üzerinde en çok araştırma yapılan türlerden birinin domates olması kesinlikle tesadüf değildir. Dünyada ve ülkemizde yaygın olarak yetiştirilen ve tüketilen bir sebze türü olmasının yanında ekonomik değerinin yüksek olması, zengin besin içeriği ve insan sağlığına olumlu etkileri değerini oldukça artırmaktadır. Değişen çevre koşulları bu sevilen ürünün yetiştiricilik koşullarını gitgide kısıtlar olmuştur. İklim değişikliğine bağlı olarak tüm bitkilerde olduğu gibi domatestede biyotik ve abiyotik etmenlere karşı tolerantlık durumları değişkenlik göstermeye başlamıştır. Dayanıklılık gen kaynaklarının önemi git gide artmakta ilgili genlerin ve ifade düzeylerinin çalışılması elzem olmaktadır. Bu tez çalışmasında domatesin erken ve ileri dönemlerinde düşük sıcaklık stresine bağlı olarak oluşan fizyolojik etkiler ve bunlarla ilişkili gen ifadelerinin seviyeleri araştırılmıştır. Çalışmada farklı 18 genotip içerisinden hassas ve tolerant olanlar ön eleme metoduyla seçilerek bunların stres faktörüne verdiği cevaplar incelenmiştir. Böylece hassas ve tolerant genotipler arasında gen ifade düzeyleri arasındaki farklılıklar net bir şekilde ortaya konmuş ve ıslah çalışmaları için bir kaynak ve yol haritası gösterici niteliği taşımaktadır.

Doktora eğitiminin ilk gününden bu yana bana inanan, güvenen, motive eden, çalışmaların her aşamasında maddi manevi, tecrübe ve bilgi birikimiyle bana destek olan değerli danışman hocam Doç. Dr. Hatice İKTEN'e ne kadar teşekkür etsem azdır.

Bu süreçte çalışmanın birçok aşamasında ve ihtiyaç duyduğumuz her anda benden desteklerini esirgemeyen Tarımsal Biyoteknoloji Bölümünün değerli hocalarına, yüksek lisans ve doktora öğrencilerine, sınırsız desteklerinden dolayı Doç. Dr. Cengiz İKTEN, Dr. Hilal Şule TOSUN'a ve Dr. Büşra YİRMİBEŞ'e, yuvam BATEM'in kıymetli idarecileri ve çalışma arkadaşlarıma sonsuz teşekkür ederim.

En zor zamanlarda manevi destekleriyle beni ayakta tutan sevgili eşim Burcu AYDIN, kızlarım Asya AYDIN ve Deniz AYDIN'a tüm kalbimle teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ	v
İÇİNDEKİLER	vi
AKADEMİK BEYAN	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK TARAMASI	4
2.1 Domatesin Sistematığı.....	4
2.2 Domatesin Morfolojik ve Fizyolojik Özellikleri.....	4
2.2.1 Kök, gövde, yaprak ve çiçek yapısı	5
2.2.2 Bitki büyüme ve gelişme evreleri	6
2.2.3 Meyve yapısı, tohum ve çimlenme	6
2.3 Genetiği ve Moleküler Biyolojisi.....	6
2.3.1 Genom yapısı ve genetik haritalama.....	6
2.3.2 Genetik çeşitlilik ve ıslah çalışmaları	7
2.4 Domatesin Hastalık ve Zararlıları	7
2.4.1 Yaygın görülen hastalıklar ve zararlılar	7
2.4.2 Hastalık ve zararlılarla mücadele yöntemleri.....	8
2.4.3 Dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesi	8
2.5 Domateste Abiyotik Stres Çalışmaları	8
2.5.1 Düşük sıcaklık stresiyle ilgili fizyolojik ve kimyasal çalışmalar.....	9
2.6. Gen ekspresyonunun nicel olarak ölçülmesi (RT-QPCR)	11

2.6.1. Düşük sıcaklık ile ilgili genler	11
3. MATERYAL VE METOT	15
3.1. Bitkisel Materyal	15
3.2. Yetiştirme Ortamı.....	15
3.3. Ön Değerlendirme Kriterleriyle Genotiplerin Seçimi.....	15
3.3.1. Görsel değerlendirme	16
3.3.2. Yapraktan klorofil ölçümü	18
3.3.3. Lipid peroksidasyon (Malondialdehit-MDA) analizi	18
3.3.4. Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂) analizi.....	19
3.4. Düşük Sıcaklık Uygulamaları	20
3.4.1. Tohum düşük sıcaklık uygulaması.....	20
3.4.2. Fide dönemi düşük sıcaklık uygulaması	21
3.4.3. Çiçeklenme dönemi düşük sıcaklık uygulaması	21
3.5. Düşük sıcaklık uygulaması sonrası meyve ve tohum ölçümleri:	22
3.6. Gen İfadesi Çalışmaları (RT-qPCR)	22
3.6.1. RNA izolasyonu.....	22
3.6.2. DNaz Enzim Uygulaması	23
3.6.3. Gradient RT-qPCR ve Standartların Oluşturulması.....	23
3.6.4. RT-qPCR Analizleri.....	24
3.7. İstatistiksel Değerlendirme Yöntemi.....	24
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	26
4.1. Ön Değerlendirme Kriterlerinin Bulguları.....	26
4.1.1. Görsel değerlendirme bulguları	31
4.1.2. Yapraktan klorofil ölçümü bulguları.....	33
4.1.3. Lipid Peroksidasyon (MDA) analiz bulguları.....	37
4.1.4. Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂) analiz bulguları	38

4.1.5. İndeks puanları ve tartılı derecelendirme analizi	40
4.2. Seçilen Genotiplerde Düşük Sıcaklık Uygulaması Sonrasına Ait Bulgular	44
4.2.1 Tohuma düşük sıcaklık uygulaması.....	44
4.2.2. Düşük sıcaklığın çiçeklenme ve meyve üzerine etkilerine ait bulgular.....	46
4.3. RNA Kalitesine Dair Bulgular	49
4.4. qPCR Optimizasyon Çalışmaları	52
4.4.1. Primer Bağlanma Sıcaklıklarının Optimizasyonu	52
4.4.2. Standartların oluşturulması	55
4.5. Genlerin İfade Düzeyleri.....	56
4.5.1. Yaprak dokularında genlerin ifade düzeyleri.....	56
4.5.2. Çiçek dokularında genlerin ifade düzeyleri	70
5. SONUÇLAR	77
6. KAYNAKLAR	80
ÖZGEÇMİŞ	

AKADEMİK BEYAN

Doktora Tezi olarak sunduğum “Domatesin Farklı Gelişme Dönemlerinde Uygulanan Soğuk Stresinin Gen Ekspresyonu, Morfolojik ve Fizyolojik Özelliklere Etkileri” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

23/12/2024

Serkan AYDIN

İmzası

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

°C : Santigrat Derece

C₂H₂ : Asetilen

cm : Santimetre

CO₂ : Karbondioksit

g : Gram

kg : kilogram

L : Litre

m : metre

mg : Miligram

mL : Mililitre

mm : Milimetre

µg : Mikrogram

µL : Mikrolitre

nm : Nanometre

ppm : Parts Per Million

s : saniye

Tezin metninde “,” ondalık ayracı kullanılmıştır.

Kısaltmalar

AÜ : Akdeniz Üniversitesi

MTA : Maden Tetkik ve Arama

AÜ : Akdeniz Üniversitesi

ABA : Absisik asit

ASA	: Askorbik asit
BC	: Back Cross
BR	: Brassinosteroid
BZR	: Brassinazole-Resistant
CAS-9	: CRISPR-Associated Protein 9
CBF	: C-repeat Binding Factor
CRSPR	: Clustred Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribo Nucleic Acid
DREB	: Dehydration Responsive Element Binding
dsDNA	: Double Strand Deoksiribo Nucleic Acid
EDTA	: Ethylenediaminetetra-Acetic Acid
EGCG	: Epigallocatechin-3-gallate
GWAS	: Genome-Wide Assiciation Studies
MAS	: Marker Assisted Selection
MDA	: Malondialdehit
MeJA	: Methyl Jasmonate
Mill	: Miller
mRNA	: Messsenger Ribo Nucleic Acid
miRNA	: Micro ribo Nucleic Acid
OD	: Optik Densite
OK	: Ozmotik Koşullandırma
QTL	: Quantitative Trait Loci
qPCR	: Quantititive Polymerase Chain Reaction
PCR	: Polymerase Chain Reaction
PR-protein	: Pathogenesis Related Protein

RBOH	: Respiratory Burst Oxidase Homolog
RNA	: Ribonucleicacid
ROS	: Reactive Oxygen Species
RT-PCR	: Real Time Polymerase Chain Reaction
seq	:Sekanslama
SnRK	: Snorkel Releated Kinase
TGRC	: Tomato Genetic Resource Center
TSWV	: Tomato Spotted Wilt Virus
TYLCV	: Tomato Yellow Leaf Curl Virus
ToBRFV	: Tomato Brown Rugose Fruit Virus
WT	: Wild Type

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Dünya domates yayılım rotası (Prohens and Nuez, 2008)	1
Şekil 1.2. Türkiye’de önde gelen sebzelerin 2022 yılı alan bakımından yüzdeleri (TÜİK 2024).....	2
Şekil 1.3. Türkiye’de önde gelen sebze türlerinin 2022 yılı üretim miktarı bakımından yüzdeleri (TÜİK 2024).....	2
Şekil 3.1. A) Ön değerlendirme uygulaması için düşük sıcaklık uygulanan bitkilerin görünümü B) Kontrol bitkilerinin genel görünümü C) Kontrol bitkilerinden yaprak örneği alımı D) MDA ve H ₂ O ₂ analizlerinde spektrofotometrik ölçümlerin görüntüsü	16
Şekil 3.2. Görsel değerlendirme kullanılan soğuk hasarını gösteren seviyelere ait yaprak örnekleri	17
Şekil 3.3. SPAD502 Plus cihazıyla yapraktan klorofil ölçümü	18
Şekil 3.4. A) MDA ve H ₂ O ₂ ölçümleri için kullanılan spektrofotometre B) H ₂ O ₂ ölçümü için kullanılan standartlar	19
Şekil 3.5. Tohuma uygulanan düşük sıcaklık denemesinde petri kaplarının hazırlanması	21
Şekil 3.6. Fide dönemi saksı hazırlığı ve çiçek dönemi düşük sıcaklık uygulaması	22
Şekil 4.1. Modern Sera Kompleksindeki kompartmanda kontrol bitkilerinin takibi esnasında alınan ısı ve nem değerlerinin grafiği	27
Şekil 4.2. İklim odasındaki sıcaklık ve nem değerleri grafiği	28
Şekil 4.3. İklim odasında 7. günde bitkilerin durumu. A: Hassas olarak testlenen genotipler. B: Tolerant olarak testlenen genotipler.....	29
Şekil 4 4. Hassas olarak denemeye alınan genotiplerin düşük sıcaklık uygulama sonrası kontrol bitkileriyle beraber karşılaştırması. U: Düşük sıcaklık uygulanmış bitkiler, K: Uygulama yapılmamış kontrol bitkileri, A: S-1, B: S-2, C: S-3, D: S-4, E: S-5, F: S-6, G: S-7, H: S-8, I: S-9	30
Şekil 4.5. Tolerant olarak denemeye alınan genotiplerin düşük sıcaklık uygulama sonrası kontrol bitkileriyle beraber karşılaştırması. U: Düşük sıcaklık uygulanmış bitkiler, K: Uygulama yapılmamış kontrol bitkileri, A: R-1, B: R-2, C: R-3, D: R-4, E: R-5, F: R-6, G: R-7, H: R-8, I: R-9	31
Şekil 4 6. Genotiplerin klorofil içeriğinin ölçüm günlerine göre değişim grafiği	35
Şekil 4.7. Genotiplerin klorofil içeriğinin kontrol bitkilerine göre oransal değişim grafiği.....	36
Şekil 4.8. Tohuma düşük sıcaklık uygulaması sonrası çimlenme durumları.....	46
Şekil 4.9. Hassas genotiplerin çiçeklenme dönemindeki düşük sıcaklık uygulaması sonrası meyve görüntüleri. A: S-2 uygulama, B: S-2 kontrol, C: S-6 uygulama, D: S-6 kontrol, E: S-8 uygulama, F: S-8 kontrol.....	48

Şekil 4.10. Tolerant genotiplerin çiçeklenme dönemindeki düşük sıcaklık uygulaması sonrası meyve görüntüleri. A: R-5 uygulama, B: R-5 kontrol, C: R-6 uygulama, D: R-6 kontrol, E: R-7 uygulama, F: R-7 kontrol	49
Şekil 4.11. DNaz uygulaması sonrası yaprak dokularına ait RNA'ların jel görüntüleri	52
Şekil 4.12. Belirli sıcaklık aralığında (49-60°C) primerlere ait amplifikasyon grafikleri. A: <i>Actin</i> , B: <i>EF-1</i> , C: <i>CBF-1</i> , D: <i>CBF-3</i> , E: <i>SISNAT</i> , F: <i>SIAMST</i> , G: <i>LePOD</i> , H: <i>SIMYB102</i> I: <i>SIF3HL</i> , J: <i>RBOH1</i>	54
Şekil 4.13. Gradient PCR ürünlerine ait agaroz görüntüleri.....	55
Şekil 4.14. <i>LePOD</i> geni için hazırlanmış standartlara ait Cq değerlerini gösteren grafik	56
Şekil 4.15. Genlerin S-2 genotipinde yaprak dokularında ifade düzeyleri grafiği	58
Şekil 4.16. Genlerin S-6 genotipinde yaprak dokularında ifade düzeyleri grafiği	60
Şekil 4.17. Genlerin S-8 genotipinde yaprak dokularında ifade düzeyleri grafiği	62
Şekil 4.18. Genlerin R-5 genotipinde yaprak dokularında ifade düzeyleri grafiği.....	64
Şekil 4.19. Genlerin R-6 genotipinde yaprak dokularında ifade düzeyleri grafiği.....	66
Şekil 4.20. Genlerin R-7 genotipinde yaprak dokularında ifade düzeyleri grafiği.....	68
Şekil 4.21. Genlerin R-9 genotipinde yaprak dokularında ifade düzeyleri grafiği.....	69
Şekil 4.22. Genlerin S-2 genotipinde çiçek dokularında ifade düzeyleri grafiği.....	70
Şekil 4.23. Genlerin S-6 genotipinde çiçek dokularında ifade düzeyleri grafiği.....	71
Şekil 4.24. Genlerin S-8 genotipinde çiçek dokularında ifade düzeyleri grafiği.....	72
Şekil 4.25. Genlerin R-5 genotipinde çiçek dokularında ifade düzeyleri grafiği	72
Şekil 4.26. Genlerin R-6 genotipinde çiçek dokularında ifade düzeyleri grafiği	74
Şekil 4.27. Genlerin R-7 genotipinde çiçek dokularında ifade düzeyleri grafiği	74
Şekil 4.28. Genlerin R-9 genotipinde çiçek dokularında ifade düzeyleri grafiği	76

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Domatesin sistematikteki yeri.....	4
Çizelge 3.1. Ön değerlendirme testlerine alınan genotipler.....	15
Çizelge 3.2. Görsel değerlendirme skalası.....	17
Çizelge 3.3. Standart eğri okuması için hazırlanan tüplerin içeriği.....	20
Çizelge 3.4. Çalışılan genlerin primer dizilimleri ve bağlanma sıcaklıkları.....	23
Çizelge 4.1. Ziraat Fakültesi Modern Seralar Kompleksindeki kompartmanın uygulama süresince alınan ısı ve nem değerleri.....	26
Çizelge 4.2. Soğuk uygulamanın yapıldığı süre boyunca iklim odasının sıcaklık ve nem değerleri.....	27
Çizelge 4.3. Genotiplerin görsel değerlendirme indeks skorları.....	32
Çizelge 4.4. Dört farklı zamanda, 2 gruba ait bitkilerin SPAD 502 Plus cihazıyla yapılan klorofil ölçümleri.....	34
Çizelge 4.5. Genotiplere ait SPAD 502 Plus ile klorofil ölçümleri sonucu indeks değerleri (uygulama/kontrol)	35
Çizelge 4.6. Genotiplerin lipid peroksidasyon (MDA) analiz bulguları sonucu indeks değerleri (uygulama/kontrol)	38
Çizelge 4.7. Genotiplerin Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂) analiz bulguları sonucu indeks değerleri (uygulama/kontrol)	39
Çizelge 4.8. Tolerant ve hassas grupların indeks puanları.....	40
Çizelge 4.9. Tolerant ve hassas gruba göre göreceli puanları, sınıf değerleri ve aralıkları	41
Çizelge 4.10. Tolerant ve Hassas genotiplerin kriterlere göre aldıkları puanlar	43
Çizelge 4.11. Tartılı derecelendirme toplam puanlarına göre tolerant ve hassas genotiplerin sıralanması	44
Çizelge 4.12. Genotiplerin 3 farklı sıcaklık derecesinde, 50 tohum üzerinden çimlenme sayılarının ortalamalarının karşılaştırılması.....	45
Çizelge 4.13. Seçilen genotiplerin çiçek ve meyve gözlemlerine ait uygulama/ kontrol ortalamalarının karşılaştırılması.....	48
Çizelge 4.14. Hassas genotiplerin RNA izolasyonu sonrası ölçülen OD değerleri	50
Çizelge 4.15. Tolerant genotiplerin RNA izolasyonu sonrası ölçülen OD değerleri.....	51
Çizelge 4.16. S-2 genotipinde yaprak dokularında genlerinin ifade düzeyleri (2 ^{-ΔΔCt}) ..	57
Çizelge 4.17. S-6 genotipinde yaprak dokularında genlerinin ifade düzeyleri (2 ^{-ΔΔCt}) ..	59
Çizelge 4.18. S-8 çeşidinde yaprak dokularında genlerinin ifade düzeyleri (2 ^{-ΔΔCt})	62
Çizelge 4.19. R-5 çeşidinde yaprak dokularında genlerinin ifade düzeyleri (2 ^{-ΔΔCt})	63
Çizelge 4.20. R-6 çeşidinde yaprak dokularında genlerinin ifade düzeyleri (2 ^{-ΔΔCt})	65
Çizelge 4.21. R-7 çeşidinde yaprak dokularında genlerinin ifade düzeyleri (2 ^{-ΔΔCt})	67

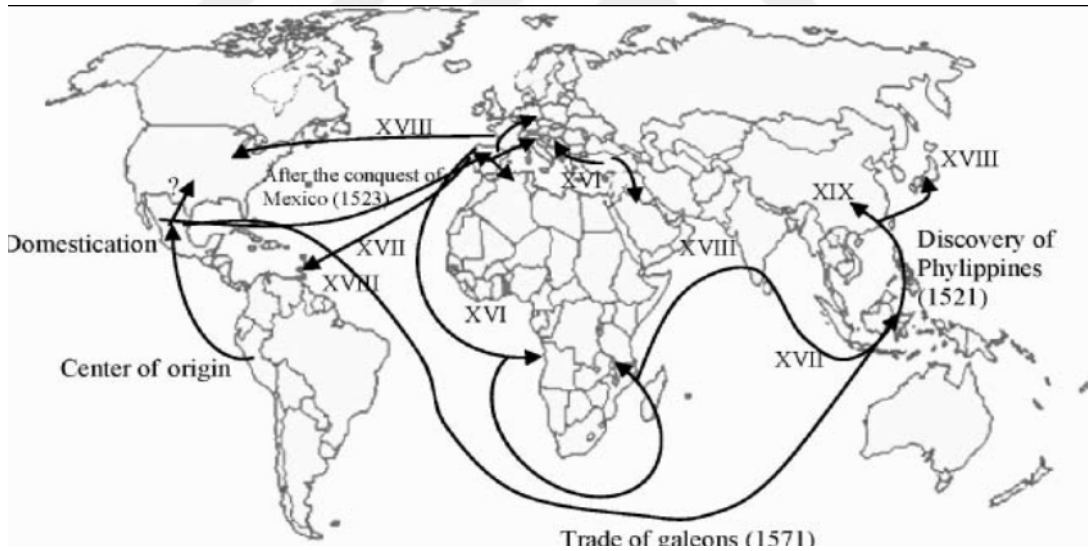
Çizelge 4.22.	R-9 çeşidinde yaprak dokularında genlerinin ifade düzeyleri ($2^{-\Delta\Delta C_t}$).....	69
Çizelge 4.23.	S-2 çeşidinde çiçek dokularında genlerinin ifade düzeyleri ($2^{-\Delta\Delta C_t}$).....	70
Çizelge 4.24.	S-6 çeşidinde çiçek dokularında genlerinin ifade düzeyleri ($2^{-\Delta\Delta C_t}$).....	71
Çizelge 4.25.	S-8 çeşidinde çiçek dokularında genlerinin ifade düzeyleri ($2^{-\Delta\Delta C_t}$).....	72
Çizelge 4.26.	R-5 çeşidinde çiçek dokularında genlerinin ifade düzeyleri ($2^{-\Delta\Delta C_t}$).....	72
Çizelge 4.27.	R-6 çeşidinde çiçek dokularında genlerinin ifade düzeyleri ($2^{-\Delta\Delta C_t}$).....	74
Çizelge 4.28.	R-7 çeşidinde çiçek dokularında genlerinin ifade düzeyleri ($2^{-\Delta\Delta C_t}$).....	74
Çizelge 4.29.	R-9 çeşidinde çiçek dokularında genlerinin ifade düzeyleri ($2^{-\Delta\Delta C_t}$).....	76



1. GİRİŞ

Domates (*Solanum lycopersicum* L.) çok sayıda yabani ve kültüre alınmış uzak akrabaları olan Solanaceae familyasına ait bir sebze türüdür. Yabani formlar Güney Amerika'daki Galapagos Adalarında olduğu kadar Peru'da And dağlarında (Rick 1973, Taylor 1986) ve Ekvador'dan ve Bolivya'ya uzanan dar bir şeritte bulunmaktadır.

Tarımsal faaliyet olarak domatesin ilk kez kültüre alınması Meksika veya Peru'da yaşayan yerli kabileleri tarafından Güney Amerika'da yapılmıştır. Kelime olarak kökeni Aztek dilinde 'xitomate' veya 'zitotomate' kelimelerinden geliştirilen ismi ile birlikte 16. yüzyılda Avrupa'ya, 18. yüzyılda buradan Kuzey Amerika'ya getirildiği, daha sonra da tüm dünya üzerine yayıldığı kabul edilmektedir (Gould 1983). Şekil 1.1'de domatesin dünya çapındaki bu yayılım rotasını görmek mümkündür. Özellikle bu süreçte İspanyol kâşiflerin Amerika'yı keşfetmesinin ardından domates Avrupa'da tanınır olmuştur. Akabinde 16. yüzyılda bu kâşifler aracılığıyla İspanya'ya ulaşan domates, kısa sürede Avrupa'nın farklı bölgelerine yayılmıştır. Bununla birlikte, ilk başlarda dekoratif bir bitki olarak yetiştirilmiş ve yemeklerde kullanılması yaygınlaşmamıştır. Domatesin yabani ve uzak akrabaları halen Peru, Ekvador, Bolivya ve Şili sınırları içerisinde yer alan And Dağları bölgesi ve Galapagos Adaları'nda bulunabilmektedir (Çelik ve Kabaş 2021).

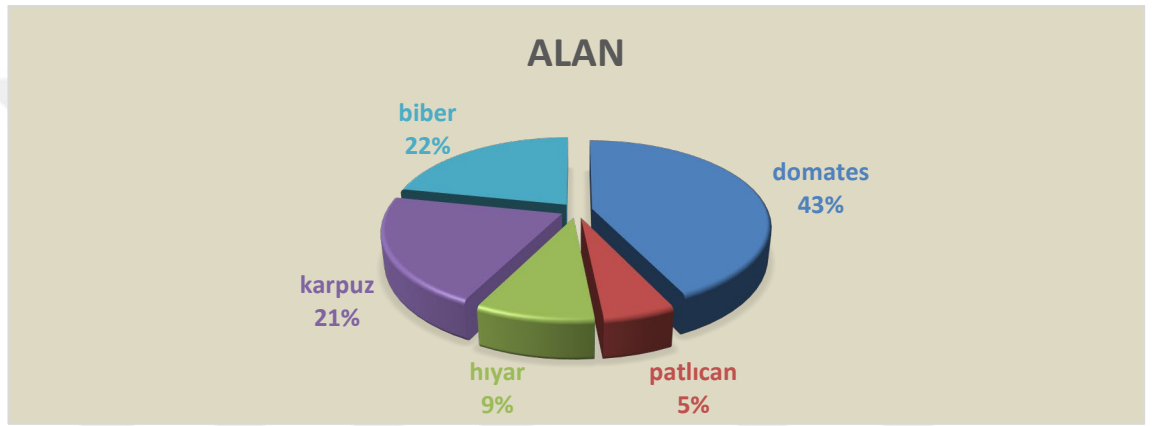


Şekil 1.1. Dünya domates yayılım rotası (Prohens and Nuez, 2008)

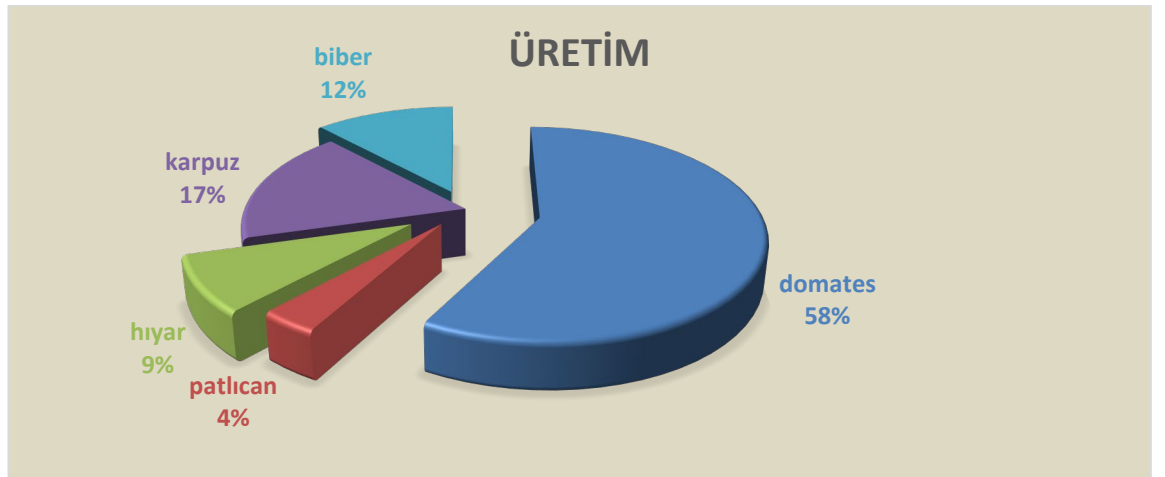
Domates günümüzde üretim, tüketim ve ticaret hacmi bakımından sebze türleri arasında ilk sırada yer almaktadır. Ayrıca insan beslenmesindeki önemi ve gıda sanayiindeki kullanım olanakları (dondurulmuş, konserve, salça, ketçap, turşu, domates suyu) nedeniyle ekonomik ve stratejik değeri günden güne artmaktadır. Domatesin taze olarak tüketiminin yanı sıra, sanayiye yönelik birçok ürünün hammaddesi olması (ketçap, salça, konserve, dondurulmuş ürünler vb.) ve ticaret hacminin yüksek olması bu önemini

pekiştirmektedir (Anonim 2021). Son verilere göre dünya domates üretimi, 5 milyon hektar alanda 189,1 milyon ton olarak kaydedilmiştir. Çin domates üretim ve ekim alanı bakımından ilk sırada yer alırken Türkiye’de ise üretim, 181 bin hektar alanda 13,2 milyon ton olarak gerçekleşmiştir. Bu üretim değerleriyle Türkiye, Çin ve Hindistan’dan sonra üçüncü sırada yer almaktadır (FAOSTAT 2024).

Türkiye’de domates üretiminde en önemli bölgeler sırasıyla Akdeniz, Ege ve Marmara’dır. Bu üç bölge toplam üretimin %68’ini karşılamaktadır. Türkiye domates üretiminde Akdeniz Bölgesi’nin payı %28’dir. Ülkemizde sebze üretimi bakımından domates birinci sırada yer almakta, ardından karpuz, biber, hıyar ve patlıcan gelmektedir (TÜİK 2024).



Şekil 1.2. Türkiye’de önde gelen sebzelerin 2022 yılı alan bakımından yüzdeleri (TÜİK 2024)



Şekil 1.3. Türkiye’de önde gelen sebze türlerinin 2022 yılı üretim miktarı bakımından yüzdeleri (TÜİK 2024)

Domates ıslah çalışmaları, biyotik ve abiyotik faktörlere karşı daha dayanıklı, verimli ve lezzetli domates çeşitlerinin geliştirilmesini amaçlayan önemli bir tarımsal Ar-Ge faaliyetidir. Bu çalışmalar, seleksiyon ve geleneksel melezleme ile başlayıp genetik mühendislik gibi yöntemlerin dahil olmasıyla ileri bir boyuta taşınmıştır. Özellikle yeni domates çeşitlerinin kalite, verim ve dayanıklılık gibi parametrelerini daha da artırmak için, yabani tip domates genomları bilinçli tercihlerle kültür formlarına aktarılmıştır (Rick 1960). Ancak, insan eliyle yapılan yapay seleksiyonun domates genomunu nasıl değiştirdiği büyük ölçüde gizemini korumaktadır (Lin vd. 2014). Bu konularda çalışan araştırmacılar, yüksek verim, hastalık ve zararlı etmenlere dayanım (Zamir vd. 1994), uzun raf ömrü ve tüketici tercihlerine uygunluk gibi özelliklere sahip yeni domates çeşitleri geliştirmek için moleküler markırlar (Tanksley vd. 1995) geliştirmektedirler. Domates ıslahındaki bu yenilikçi yaklaşımlar, tarımsal üretimin sürdürülebilirliğini artırarak gıda güvenliğine önemli katkılar sağlamaktadır. Araştırmacılar, genetik çeşitliliği koruyarak ve artırarak, gelecekte karşılaşılabilecek çevresel (biyotik-abiyotik) stres faktörlerine karşı daha tolerant-dayanıklı domates çeşitleri geliştirmeyi hedeflemektedirler. Bu sayede hem üreticilerin hem de tüketicilerin ihtiyaç ve beklentilerine uygun, daha kaliteli ve besin değeri yüksek domates çeşitlerinin piyasaya sunulması mümkün olacaktır.

Bu tez çalışması, düşük sıcaklık stresinin domates bitkisinin fide evresi ve çiçeklenme döneminde bazı genlerin ekspresyon seviyelerini belirlemek ve bu stresin bitkinin sonraki gelişim dönemlerindeki etkilerini gözlemlemek amacıyla yürütülmüştür. Araştırmanın temel hedefi, düşük sıcaklık stresinin meyve tutumu, tohum verimi ve bu tohumların çimlenme kabiliyeti üzerindeki olumsuz etkilerini tespit etmektir. Bu bağlamda, domates bitkileri farklı düşük sıcaklık stres koşullarına maruz bırakılarak, gen ekspresyon seviyelerindeki değişiklikler detaylı bir şekilde incelenmiş ve bu değişikliklerin bitkinin fenotipik özellikleri üzerindeki yansımaları analiz edilmiştir. Ayrıca, stres koşullarının bir sonraki nesle olan etkilerini belirlemek amacıyla tohumlar toplandıktan sonra çimlenme testleri yapılmış ve verim analizleri gerçekleştirilmiştir. Çalışma, düşük sıcaklık stresine maruz kalan bitkilerde gözlemlenen gen ekspresyon değişikliklerinin, meyve tutumu ve tohum verimi üzerindeki potansiyel etkilerini ortaya koyarak, tarımsal üretimde düşük sıcaklık stresinin minimize edilmesine yönelik stratejilerin geliştirilmesine katkı sağlamayı amaçlamaktadır.

2. KAYNAK TARAMASI

2.1 Domatesin Sistematığı

Domates (*Solanum lycopersicum* L.) geniş bir tropikal familya olan *Solanaceae*'nin ve *Solanum* cinsinin en bilinen üyesidir. Yabani ve kültüre alınmış domates türlerinin tamamı diploid olup kromozom sayısı $2x=2n=24$ 'tür. Ayrıca tüm yabani tipler kültür formlarıyla melezlenebilmektedir. Domatesin atası olarak bilinen *Solanum esculentum* var. *cerasiforme* kültür formuna (*Solanum lycopersicum* L.) dönüşmüş ve sistematik olarak bugünkü yerini almıştır (Çelik ve Kabaş 2021).

Çizelge 2.1. Domatesin sistematikteki yeri

Sınıf:	<i>Dicotyledoneae</i>
Takım:	<i>Solanales</i>
Familya:	<i>Solanaceae</i>
Cins:	<i>Solanum</i>
Tür:	<i>Solanum lycopersicum</i> L.
Diğer İsimleri (Synomims): <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. <i>Lycopersicon esculentum</i> var. <i>Esculentum</i> <i>Lycopersicon lycopersicum</i> <i>Lycopersicum esculentum</i> <i>Solanum esculentum</i> Dunal <i>Solanum lycopersicon</i> <i>Solanum lycopersicum</i> var. <i>humboldtii</i>	

2.2 Domatesin Morfolojik ve Fizyolojik Özellikleri

Domates, biyolojik olarak çok yıllık otsu bir bitki olmasına rağmen, tarımsal üretimde genellikle tek yıllık bir ürün olarak yetiştirilmektedir. Bitkinin doğası gereği, uygun çevresel koşullarda birkaç yıl boyunca büyüebilme potansiyeli vardır. Ancak, tarımsal uygulamalarda bitkinin çok yıllık formlarının kullanımı, hastalık ve zararlılara karşı artan hassasiyet, ayrıca uzun vadede verimliliğin düşmesi gibi nedenlerle tercih edilmemektedir. Bu bağlamda, üreticiler çoğunlukla her sezon bitkileri yenileme yoluna gitmekte ve domatesi tek yıllık bir ürün olarak değerlendirmektedirler. Domates bitkisinin vejetatif gelişimi ve olgunlaşma süreci, ideal yetiştirme koşullarında belirli bir zaman dilimi içerisinde gerçekleşmektedir. Tohumun çimlenmesi ile ilk çiçeklenme

arasındaki süre ortalama olarak 45 gün civarındadır. Bu süre boyunca bitki, kök ve yaprak sistemini geliştirerek fotosentez kapasitesini artırmakta ve çiçeklenmeye hazırlanmaktadır. Çiçeklenme, meyve bağlama ve olgunlaşma süreci ise, çevresel faktörlerin etkisiyle 90 ila 100 gün arasında değişiklik göstermektedir. Bu süreçte, meyveler olgun rengini almaya başlamakta ve hasat için uygun duruma gelmektedir. Ancak, bu süre zarfı; sıcaklık, ışık, su ve besin maddesi gibi faktörlerin etkisiyle farklılık gösterebilmektedir. Dolayısıyla, domates üretiminde optimal verim ve kalite elde edebilmek için bitkinin büyüme süreci boyunca dikkatli bir şekilde izlenmesi ve gerekli tarımsal müdahalelerin zamanında yapılması gerekmektedir. (Nuez 2001, Anonim 2017).

2.2.1 Kök, gövde, yaprak ve çiçek yapısı

Domates tohumlarının çimlenme sürecinde, embriyonik radikül (kökçük) uzayarak bir kazık kökü oluşturur. Kazık kök, başlangıçta aşağı yönde dikey olarak büyür ve daha sonra kök boğazına yakın bir bölgeden yan kökler gelişmeye başlar. Bitki kök sisteminin %75'ini oluşturan yan kökler, toprağın ilk 25 cm derinliğinde yayılarak konumlanır. Ana kazık kök zarar görmez ve toprak yapısı da buna izin verirse 140 cm derinliğe kadar inebilmesi mümkündür. Domates bitkisinin gövdesi otsu yapıda olup, büyüme döneminde toprakla temas ettiği noktadan yeni saçak kökler oluşturma yeteneğine sahiptir (Ouyang vd. 2021). Kazık kökün toprağa dikey olarak büyümesi bitkiye hem mekanik stabilite sağlar hem de su ve besin maddelerinin alımında birincil kanal işlevi görür. Perisikliden (canlı ve ince çeperli parankima hücrelerinden oluşan silindirik yapıdaki kökün en dış tabakası) çıkan yan (lateral) kökler ise daha ince yapıdadır. Bu lateral kökler, kökün yüzey alanını artırarak bitkinin su ve besin emme kapasitesini önemli ölçüde artırır (Quezada vd. 2023) ve böylece bitkinin olağan gelişimine katkıda bulunur.

Domates saplarında, sap ile yaprak sapının tabanı arasında yaprak koltukları bulunur. Yaprak koltuklarından yan dallar, çiçek kümeleri (infloresanslar) ortaya çıkar. Büyüme ucunda yer alan apikal meristem, apikal tomurcuk veya sürgün ucu olarak bilinir. Apikal meristem, sapın dikey büyümesinden sorumlu olan aktif bölünen hücrelerin bulunduğu bir bölgedir. Bu bölge, sapın uzunluğunu artırarak yeni hücreler üretir ve bu hücreler uzayarak çeşitli dokulara farklılaşır (Quezada vd. 2023). Domates bitkileri, gövde boyunca alternatif şekilde dizilen bileşik yapraklara sahiptir. Her yaprak tipik olarak birkaç yaprakçıktan oluşur. Yaprakçıklar genellikle yumurta biçiminde veya mızrak şeklindedir ve tırtıklı kenarlara sahiptir.

Döllenme biyolojisi incelendiğinde domates çiçeklerinin erselik (erkek ve dişi organları aktif olarak bulunur) yapıda olduğu görülür (Çelik ve Kabaş 2021) Tipik olarak çiçeğin yapısını oluşturan farklı bileşenler bulunmaktadır. Çiçeğin tabanında, çiçeği bitkinin ana gövdesine bağlayan ve pedisel veya çiçek sapı olarak adlandırılan modifiye bir gövde bulunur. Çiçekler, beş adet yeşil renkli sepalle çevrilidir ve bu sepaller topluca çanak yapraklar (kaliks) olarak adlandırılmaktadır. Sepallerin temel işlevi, açılmadan önce gelişmekte olan çiçek tomurcuğunu sarmak ve korumaktır. Bir diğer bileşen, birleşik beş taç yapraktan oluşan ve korolla olarak bilinen yapıdır. Taç yapraklar genellikle sarı renkte olup, bazı çeşitlerde beyaz veya pembe gibi farklı renk tonlarında da görülebilmektedir (Cooper 1927; Went 1944; Monforte vd. 2013)

2.2.2 Bitki büyüme ve gelişme evreleri

Domates bitkileri, bodur (determinant) veya sırk (indeterminant) olarak farklı gövde gelişmeleri sergiler (Kandel vd. 2020). Bodur tiplerde gövde, çeşidin özelliğine bağlı olarak az veya çok dallanabilir. Bitkinin gövdesi üzerinde çok sayıda sürgün yaprak koltuklarından meydana gelir. Aynı şekilde bu sürgünlerden çıkanlar da yeni sürgünler oluşturabilir. Bodur tiplerin gövde üzerinde çiçek salkımları görülmez; sürgünler çiçek salkımı ile son bulur. Sırk tiplerde ise gövde, sınırsız (indeterminant) büyüme yeteneğindedir (Demir ve Ünlü 2023). Bitkinin büyüme ucu sürekli olarak büyüyebilir ve yaprak koltuklarından yeni sürgünler oluşturabilir. Koltuklardan çıkan bu sürgünler koparılmazsa bitki dallanır ve ana sürgün ucundaki büyüme engellenmiş olur. Sırk çeşitlerinde çiçek salkımları boğum aralarında meydana gelir (Çelik ve Kabaş 2021)

2.2.3 Meyve yapısı, tohum ve çimlenme

Domates meyvesi 3 ana kısımdan oluşur be bunlar perikarp, plasenta ve löküler boşluktur. Meyvenin dış tabakası olan Parikarb ise dıştan içe doğru ekzokarp, mezokarp ve endokarptan oluşan katmanlardan meydana gelmektedir. Meyvenin ortasındaki parankima dokusu plasentayı oluşturur. Loküler boşlukta ise tohumlar jelimsi kıvamlı bir sıvı ile kaplı halde bulunur (Mesa vd. 2022). Genel olarak bu kısımların gelişimi sırasındaki işlerin ters gitmesi meyve şeklini etkilemektedir. Domateste meyvenin şekli ve genel görünümü pazarlanabilirlik açısından oldukça önemlidir. Çiçeklenmeden itibaren meyvenin oluşum sürecinde çevresel ve fizyolojik bazı etkenlerin neden olduğu olumsuzluklar şekil bozukluğunun ana nedeni olarak bildirilmektedir (Thompson 2001; Iqbal vd. 2013).

2.3 Genetiği ve Moleküler Biyolojisi

Domatesin genomik yapısı ve moleküler biyolojisi, bitki bilimi ve biyoteknoloji alanlarında önemli bir araştırma konusu olarak öne çıkmaktadır. Domates (*Solanum lycopersicum* L.), genom dizilimi tamamlanmış ilk tarımsal bitkilerden biri olup (Tomato Genom Consortium X 2012) bu veri genetik araştırmalar için büyük bir kaynak sağlamaya halen devam etmektedir. Domates bitkisinin genetik yapısı, meyve gelişimi, olgunluk, hastalık direnci ve stres toleransı gibi özellikleri belirleyen çeşitli genler ve moleküler mekanizmalar hakkında kapsamlı bilgi sunmaktadır (Klee vd. 2011; Kalloo 2012; Kaur vd. 2023). Genom düzenleme teknikleri kullanarak domates bitkilerinde istenilen özelliklerin geliştirilmesi, verimlilik ve besin değerinin artırılmasına yönelik çalışmalarda büyük ilerlemeler kaydedilmiştir (Nagamine ve Ezura 2022). Bu araştırmalar, sadece tarımsal üretimde verimliliği artırmakla kalmayıp, aynı zamanda temel genetik ve biyolojik süreçlerin anlaşılmasına da katkıda bulunmaktadır.

2.3.1 Genom yapısı ve genetik haritalama

Domates (*Solanum lycopersicum* L.), genetik ve genomik çalışmalarda en yoğun şekilde araştırılan *Solanaceae* familyasına ait bir türdür. Diploid yapısı ile birlikte $n=12$ kromozomlu ve yaklaşık 950 Mb'lık küçük bir genom büyüklüğüne sahiptir. Domatesin yapısal genomik araştırmaları, 2005 yılında farklı ülkelerin ortak çabalarıyla gen bakımından zengin eukromatik bölgelerin dizilenmesiyle başlamıştır (Barone vd. 2008;

Mueller vd. 2009). Domates genomu yaklaşık olarak 32 bin protein kodlayan gen içermektedir (Tomato Genome Consortium 2012). Verimle birebir ilişkili özellikler için melez popülasyonlardan QTL haritalama çalışmalarında domates öncü seçeneklerden biri olarak kullanılmıştır. Yakın geçmişte yapılan birçok GWAS çalışması, özellikle meyve kalitesi, metabolitler ve tatla ilişkili bileşikler için yeni lokusların tanımlanmasına olanak sağlamıştır (Zhao vd. 2019).

2.3.2 Genetik çeşitlilik ve ıslah çalışmaları

Domates bitkisinde genetik çeşitlilik, tarımsal ıslah çalışmaları için büyük önem taşımaktadır. Genetik çeşitlilik, domatesin yabani akrabaları ve farklı domates türleri arasında bulunan geniş gen havuzundan kaynaklanır (Pavan vd. 2009). Bu çeşitlilik, biyotik ve abiyotik streslere dayanıklılık gibi tarımsal açıdan önemli özelliklerin geliştirilmesine olanak tanır (Sadashiva vd. 2017). Modern moleküler biyoloji teknikleri ve genomik araçlar kullanılarak, domatesin genetik yapısı detaylı bir şekilde incelenmiş ve bu sayede spesifik genlerin fonksiyonları belirlenmiştir (Kimura ve Sinha 2008; Ranc vd. 2012; 100TGSC vd. 2014; Knapp ve Peralta 2016). Bu bilgi, ıslah çalışmalarında istenilen özelliklerin hızlı ve etkili bir şekilde seçilmesine yardımcı olmaktadır.

Sebze ıslah programlarında çoğunlukla geleneksel melezleme yöntemleri ve modern biyoteknolojik yaklaşımlar birlikte kullanılır hale gelmiştir (Zorzoli vd. 2007). Geleneksel yöntemler, seleksiyon ve melezleme tekniklerine dayanırken (Sharma vd. 2019), biyoteknolojik yaklaşımlar genetik mühendislik, gen düzenleme (örneğin CRISPR-Cas9) ve marker destekli seleksiyon (MAS) gibi ileri teknolojileri içermektedir. Bu yöntemler, verimlilik, kalite, hastalık direnci ve çevresel stres toleransı gibi özelliklerin geliştirilmesini hızlandırmaktadır (Causse vd. 2007). Ayrıca, ıslah programları, sürdürülebilir tarımı desteklemek amacıyla su ve besin kullanımı verimliliğini artıran çeşitlerin geliştirilmesine de odaklanmaktadır. Böylece, genetik çeşitliliğin korunması ve etkin ıslah çalışmaları ile domates üretiminde sürdürülebilirlik ve verimlilik sağlanması mümkün olmaktadır (Gascuel vd. 2017).

2.4 Domatesin Hastalık ve Zararlıları

Domates, dünya genelinde yaygın olarak yetiştirilen ve tüketilen önemli bir sebze türüdür; ancak çeşitli hastalık ve zararlılara karşı duyarlılıkları, tarımsal üretimde önemli verim kayıplarına ve ekonomik zararlara yol açmaktadır. Domates bitkilerinde görülen hastalıklar genellikle fungal, bakteri ve virüs kaynaklı enfeksiyonlar olarak çeşitlenmektedir.

2.4.1 Yaygın görülen hastalıklar ve zararlılar

Domates lekeli solgunluk virüsü (TSWV), domates sarı yaprak kıvrıcıklığı virüsü (TYLCV) (Blancard 2012), domates kahverengi buruşuk meyve virüsü (ToBRFV) (Luria vd. 2017), *Phytophthora infestans* etmeni tarafından oluşturulan geç yanıklık, *Alternaria solani*'nin neden olduğu erken yanıklık ve *Ralstonia solanacearum* kaynaklı bakteriyel solgunluk, ciddi üretim kayıplarına sebep olan başlıca patojenlerdir. Ayrıca, trips, beyazsinek, akar ve tuta (Smith vd. 2018) gibi böcek zararlıları da domates bitkilerinde önemli zararlar meydana getirmektedir.

2.4.2 Hastalık ve zararlılarla mücadele yöntemleri

Domates yetiştiriciliğinde karşılaşılan en ciddi problemler, biyotik ve abiyotik stres faktörlerinden kaynaklanmaktadır. Bu faktörler arasında hastalık ve zararlılar, kuraklık, tuzluluk, düşük ve yüksek sıcaklıklar gibi etmenler ön plana çıkmaktadır. Özellikle domates hastalıkları ve zararlıları, meyvenin pazarlanabilir kalitesini ve genel verimini önemli ölçüde düşürmektedir. Bu bağlamda, tohumla taşınan patojenler, hastalığın yayılmasını kolaylaştırarak daha büyük kayıplara neden olmaktadır (Yılmaz vd. 2014). Bu patojen ve zararlılarla mücadelede, entegre zararlı yönetimi stratejilerinin uygulanması (İnak vd. 2019) ve dayanıklı bitki çeşitlerinin geliştirilmesi kritik öneme sahiptir. Bu yaklaşımlar, sürdürülebilir tarım uygulamalarının teşviki ve ürün kayıplarının minimize edilmesi açısından büyük bir potansiyele sahiptir.

2.4.3 Dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesi

Domates ıslahında abiyotik ve biyotik etmenlere karşı dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesi, tarımsal üretimin sürdürülebilirliği ve gıda güvenliği açısından kritik bir öneme sahiptir (Kissoudis vd. 2015). Abiyotik stres faktörleri, iklim değişikliği ve toprak tuzluluğu gibi çevresel koşullardan kaynaklanırken, biyotik stres faktörleri ise hastalıklar, zararlılar ve yabancı otlar gibi biyolojik tehditlerden oluşmaktadır. Domates 200'den fazla zararlı ve hastalık etmenine karşı hassas olduğu bildirilmiştir (Bai ve Lindhout 2007). Bu stres faktörlerine dayanıklı domates çeşitleri, verim kaybını minimize ederek üretim maliyetlerini azaltır ve aynı zamanda kimyasal mücadeleye olan bağımlılığı düşürür (Chitwood-Brown vd. 2021). Dolayısıyla, abiyotik ve biyotik strese dayanıklı domates çeşitlerinin ıslahı hem ekonomik hem de çevresel sürdürülebilirliğe önemli katkılar sağlar. Bu süreç, modern biyoteknolojik tekniklerin ve genetik analizlerin etkin kullanımıyla desteklendiğinde, multidisipliner bir yaklaşımla birlikte artık daha fazla ön plana çıkmaktadır.

2.5 Domateste Abiyotik Stres Çalışmaları

Bitkiler abiyotik stres faktörlerine karşı birden çok genin etkileşimini içeren tolerans mekanizmaları geliştirebilirler. Abiyotik stres koşullarında bitkinin toleransını artırmaya yönelik etkin bir yaklaşım olarak bu stres sonucu tetiklenen genlerin işlevlerinin ve abiyotik stres toleransını şartlandıran moleküler mekanizmaların kapsamlı bir şekilde anlaşılmasını gerektirmektedir (Chaudhary vd. 2019).

Domatesin kültür formu, *Lycopersicon esculentum* Mill., kuraklık, tuzluluk, aşırı ya da düşük sıcaklıklar, aşırı nem, topraktaki besin elementlerinin dengesizlikleri ve çevre kirliliği gibi birçok abiyotik stres faktörlerine karşı orta veya yüksek derecede duyarlıdır. Ancak, *Lycopersicon* cinsi içinde, elverişli genetik çeşitlilik açısından zengin bir kaynak olabilecek yabani türlerin varlığı bildirilmektedir (Rick 1979). Böyle bir genetik çeşitlilik, özellikle hastalık direncini artırmak amacıyla arzu edilen tarımsal özelliklerin iyileştirilmesi için domates ıslah programlarında yaygın olarak kullanılmıştır. Bu varyasyon, domateste abiyotik stres toleransının fizyolojik ve genetik temelini karakterize etmek ve stres toleranslı bitkiler geliştirmek için de kullanılmıştır (Fooled 2007).

2.5.1 Düşük sıcaklık stresıyla ilgili fizyolojik ve kimyasal çalışmalar

Bitkiler düşük sıcaklık koşullarına tolerans stresin şiddetine göre üç gruba ayrılabilir: Birinci grupta tropik bitkiler yer alır (muz- *Musa sapientum* L., avokado- *Persea americana* Mill. ve papaya- *Carica papaya* L.). Bu gruptaki bitkiler düşük sıcaklığa oldukça duyarlıdır ve 12°C'nin altında ölümle sonuçlanabilecek ciddi zararlar görülebilir. İkinci grupta domates (*Solanum lycopersicum* L.) ve patates (*Solanum tuberosum* L.) gibi subtropik kökenli bitkiler yer alır. Bu bitkiler düşük sıcaklığa karşı tolerant ama donmaya karşı duyarlıdır. 12°C'nin altındaki sıcaklıklara adapte olabilirler fakat 0°C'nin altındaki sıcaklıklarda yaşamaları mümkün olmaz. Üçüncü gruptaki bitkiler soğuğa ve donmaya dayanıklıdır. Bunlar soğuğa adapte olabilir ve 0°C'nin altındaki sıcaklıklarda da yaşamlarını idame ettirebilirler (Doğru 2019).

Soğuk stresine maruz kalan bitkilerde solma, yapraklarda kloroz, lokal nekrozlar ve hücre zarında önemli zararlar oluşmaktadır. Üşüme hücre zarının yapısını değiştirerek geçirgenliğini etkilemekte ve zarla ilişkili enzimlerin aktivitesinde sorunlara sebep olmaktadır (Lyons 1973; Tatsumi ve Murata 1981). Bununla birlikte soğuk stresine girmiş bitkilerin fotosentez hızında ve solunumunda yavaşlama, protein sentezinde azalma ve önceden sentezlen proteinlerin parçalanmasında artışlar meydana gelebilmektedir. Tüm bu tepkilerin üşüme sırasında hücre zarı fonksiyonlarının kaybedilmesi sonucu oluşan zararlar olduğu düşünülmektedir. Hücre zarı tabakalarındaki yağların, yağ asidi zincirindeki oranları sabittir. Soğuğa hassas bitkilerde 0-14°C'ler arası sıcaklıklarda hücre zarı sıvı içeriğini kaybetmeye başlar ve protein bileşenleri de bu durumda fonksiyonlarını kaybederler. Nihayetinde hücre içine ve dışına madde alışverişi ve diğer tüm enzimatik faaliyetlerde bir sonlanma ve hücre ölümü meydana gelir (Akman vd. 2001).

Fotosentez, sıcaklıktaki düşüşe karşı en hassas hücresel süreçlerden biridir. LT'ler, fotosistemler I ve II tarafından emilen ışık enerjisi ile CO₂ fiksasyonu ve fotorespirasyon tarafından tüketilen enerji arasında bir dengesizliğe neden olarak fotohasara neden olur (Allen ve Ort 2001). Yapılan bazı çalışmalarda, bitkinin yaprak gelişimi sırasındaki stabil olarak devam eden hafif bir soğuk stresinin yaprak klorofil içeriğinde ciddi azalmalara ve sonrasında fotosentez hızında düşüşe neden olduğunu gösteren bulgulara erişilmiştir. Geçici de olsa güçlü bir soğuk stresine maruz kalarak gelişen yapraklarda klorofil sentezindeki bozulmanın etkisiyle kloroz biçiminde lekeler görülür (Fracheboud ve Hadimann 1994).

Farklı domates genotiplerinin gösterdiği farklı soğuk toleransı tepkilerini açıklamada tek başına antioksidatif sistemlerdeki değişimlerin yeterli olmadığı, ozmotik potansiyel (antifreeze etkisi), kök hidrolik iletkenliği, fotosentetik etkinlik gibi farklı bitkisel özelliklerin de domatesta soğuk etkinliği üzerine belirleyici rol oynayabildiği düşünülmektedir (Gökmen 2006).

Sıcaklık koşullarının geceleri minimum 10-12°C'nin altına düşmesi durumunda erkek organlarda oluşan polenlerin az sayıda ya da hiç oluşamamasına neden olmaktadır. Az sayıda oluşmuş polenlerin canlılık ve çimlenme yeteneklerinin düşük olması, çiçek organları ile eşey hücrelerinde deformasyonların ve gelişme bozukluklarının görülmesi gibi faktörler verimi büyük ölçüde etkilemektedir (Daşgan ve vd. 1994). Domates

bitkisindeki biyotik ya da abiyotik faktörlerin etkisiyle oluşan tepkilerin bir sonucu olarak meyve yapısında deformasyonlar görülebilmektedir. Kedi yüzü gibi bu tip deformasyonlara, çiçeğin oluşumu sırasında meydana gelen ve meyvenin normal gelişmemesine neden olan içsel veya çevre kaynaklı bir etken neden olur. Kesin neden hakkında çok az yayınlanmış bilgi bulunmaktadır ve aslında birden fazla neden olabileceği düşünülmektedir. Çiçeklenmeden yaklaşık 3 hafta önce meydana gelen düşük sıcaklıklar, kedi yüzünün miktarını artmasına neden olabilir (Olson 2004).

Domates türünde düşük sıcaklık ile ilgili birçok araştırmacının yaptıkları çalışmalara bakıldığında çoğunlukla düşük sıcaklığın tohum ve fide döneminde gerçekleşen fizyolojik ve kimyasal değişimler hakkında olduğu görülmektedir. Literatür örnekleri de aşağıda gösterilmiştir.

Düşük sıcaklık sonucu domates bitkisinde oluşan stres, 0 ila 15°C sıcaklık aralığında gerçekleşir. Hücre içinde buz kristalleri oluşmaması ile soğuk stresinden farklılık gösterir. Düşük sıcaklıklar, diğer tüm stres faktörlerinde olduğu gibi bitkilerde reaktif oksijen türleri (ROS)'nin üretilmesine yol açarak bitkide oksidatif strese neden olurlar. (Scandalios 2005; Rymen vd. 2007; Aydınoglu ve Akgül 2019)

Zamir vd. (1981)'in yürüttükleri çalışmada bir yabani ve bir kültür domates genotipinin düşük sıcaklığa verdikleri tepkileri kıyaslamak için her iki çalışma materyaline ait polenleri 5°C sıcaklıkta bekleterek çimlenme durumlarını incelemişlerdir. Ayrıca aynı araştırmacılar bir başka çalışmalarında döllenme sırasındaki düşük sıcaklık koşullarının kök uzama hızına etkisini araştırmak için domateste polen seçme metodlarını denemişlerdir (Zamir ve Gadish 1987).

Domateste 1999 yılında Venema vd. tarafından yapılan çalışmada optimum (25/20°C) ve yarı optimum (16/14°C) gündüz/gece sıcaklık şartlarının büyüme, fotosentez, pigment bileşimi ve karbonhidrat içeriği üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla kültür ve yabani domates türlerini karşılaştırmışlardır. Sonuç olarak; büyüme sıcaklığı, yaprak alanı bazında klorofil içeriğini pek etkilemezken, klorofil bazında ksantofil döngüsü pigmentlerinin (violaksantin + antheraxanthin + zeaksantin) içeriği 16/14 °C'de yetişen yapraklarda 1,5 kat daha yüksek olmuştur.

Demirkaya (2017)'nin yapmış olduğu bir çalışmada Rio Grande ve H-2274 domates çeşitlerine ait tohumlarda metil jasmonat ve deniz yosunu ön uygulamaların düşük sıcaklık stresine karşı etkileri araştırılmıştır. Deniz yosunu ekstraktının 1:500 oranındaki çözeltisi ve 0.5 mm mM dozundaki metil jasmonat (MeJA) çözeltisi ile ozmotik koşullandırma (OK) uygulamaları tohumlara 20°C ve 1, 2 ve 3 gün süre ile yapılmış ve uygulamalardan sonra tohumlar 15°C ve 20°C'de çimlendirme testlerine alınmıştır. MeJA ve deniz yosunu ile OK uygulamaları, 'Rio Grande' çeşidinde 15°C ve 20°C' de çimlenme oranını ve çimlenme indeksini arttırmış, ortalama çimlenme süresini kısaltmıştır. MeJA ve deniz yosunu ile OK uygulamaları, 'H-2274' çeşidinde 15°C ve 20°C'de çimlenme indeksini arttırmış, ortalama çimlenme süresini kısaltmış, ancak çimlenme oranındaki artışlar istatistiki olarak önemli bulunmamıştır.

Açık tarlada güz sezonunda yapılan çalışmada düşük sıcaklık stresini olumsuz etkilerini gidermek için fenolik bileşiklerin uygulanması incelenmiştir. 10°C altındaki

şartlarda farklı konsantrasyonda salisilik asit, sülfosalisilik asit, benzoik asit, metil-salisilik asit ve acetyl-salisilik asit spreyle bitkilere uygulanmıştır. Tüm uygulamalar düşük sıcaklık şartlarına toleransta etkili olarak bulunmuştur (Meena vd. 2017).

2.6. Gen ekspresyonunun nicel olarak ölçülmesi (RT-QPCR)

1970 yılında ters transkriptaz enziminin keşfi, moleküler klonlama için kullanılan RT-PCR'nin gelişimine zemin hazırlamıştır. Polimeraz zincir reaksiyonunun (PCR) geliştirilmesi, Kary Mullis'e 1992'de Nobel Kimya Ödülü'nü kazandırmış ve moleküler biyolojide köklü değişikliklere yol açmıştır. Bu ödülün verildiği dönemde, Russel Higuchi'nin yaptığı araştırmalar, PCR'nin floresan probalar kullanılarak izlenebileceğini ortaya koymuş ve kantitatif gerçek zamanlı PCR'nin (qPCR) gelişimini sağlamıştır. RT-PCR, qPCR ile birleştirildiğinde, RT-qPCR olarak adlandırılır ve mRNA miktarının ölçülmesi yoluyla gen ekspresyonunun analiz edilmesine imkân tanır. Bu yöntemler ve uygulamaları, yaşam bilimleri araştırmalarını ve klinik teşhisi büyük ölçüde değiştirmiştir (Adams 2020).

Gerçek zamanlı qPCR, çift zincirli DNA (dsDNA)'ya özgü boyalar (SYBR Green I) tarafından yayılan floresan sinyallerini izleyerek anlık olarak DNA amplifikasyonunu doğrular ve PCR ürünlerinin elektroforez jel metoduyla doğrulama gereksinimini ortadan kaldırır. RT-qPCR, yüksek doğruluk ve hassasiyeti, anlık tespit olanağı gibi avantajları nedeniyle patojenlerin ve gen farklılıklarının tespiti gibi araştırmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Yu vd. 2021)

2.6.1. Düşük sıcaklık ile ilgili genler

Foolad ve Lin, 1998 yılında domates tohumlarının çimlenme döneminde düşük sıcaklığa tolerans durumunun genetik temelini araştırmak amacıyla yaptıkları çalışmada soğuğa toleran ve hassas olduğu bilinen iki genotipi melezleyerek F2, F3 ve BC1 döllerinde çimlenme durumlarına bakmışlardır. Hem düşük hem de yüksek sıcaklıklarda çimlenme üzerinde ağırlıklı olarak eklemeli (aditif) etkileri olan benzer veya özdeş genlerin varlığını rapor etmişlerdir.

Domates meyvelerine düşük konsantrasyonlu metil jasmonat veya metil salisilat uygulamaları düşük sıcaklığa karşı dirençlerini önemli ölçüde arttırmış ve düşük sıcaklıkta depolama sırasında çürümeyi azaltmıştır. Yapılan gen ifade (ekspresyon) analizlerinde farklı PR-protein mRNA desenleri gözlemlenmiştir. Düşük sıcaklık uygulanmayan genotiplerde kayda değer PR-protein mRNA desenleri artışına rastlanmamıştır (Ding vd. 2002).

C₂H₂ Zing Finger proteinlerinin mekanizmasını anlamaya yönelik yapılan çalışmalarda bu proteinin bitkilerin farklı çevresel stres koşullarına karşı savunma ve uyum sağlama tepkisinde yer alan anahtar bir gen ifadesi yani transkripsiyonel düzenleyici olarak değerlendirilebileceğini ortaya koymuştur (Ciftci ve Mittler 2008).

Çeri domateste soğuğa tolerans stratejisi içerisinde Arginaz aktivitesi ve gen ifadesinin rolü üzerine yapılan çalışmada düşük sıcaklığın iki Arginaz geninin (*LeARG1* ve *LeARG2*) transkripsiyonel gen ifade seviyelerini arttırdığı görülmüştür. Kontrol ile

kıyaslandığında Arginaz, domates meyvelerinde soğuktan kaynaklanan hasarı hafifletmiş, elektrolit sızıntısını ve peroksidaz aktivitesini azaltmıştır (Zhang vd. 2010).

Bitkilerin düşük sıcaklığa maruz kaldıklarında göstermiş oldukları tepkilerle ilgili Gilmour vd. (2000)'nin görüşü; bu tepkinin transkripsiyonel ağ ile idare edilmekte olmasıdır. Soğuk stresi durumunda verilen bu tepkilerin kaynağı olarak bazı transkripsiyon faktörlerini kodlayan genler tanımlanmış ve ortaya konmuştur. Bunlar Arabidopsis' te *CBF/DREB1* (Thomashow 2010), pirinçte *DREB/CBF* (Ito vd., 2006), yine Arapidopsis' te *WRKY* (Zou vd., 2010) ve *MYB* (Agarwal vd., 2006)' dir. Son yıllarda miRNA'ların da bitkilerde soğuğa karşı tepkide etkili olduğuna yönelik çalışmaların yapıldığı bildirilmektedir (Cao vd., 2014). Domateste düşük sıcaklık stresine tepki olarak oluşan miRNA ve diğer bazı genlerin analizi üzerine yapılan bir diğer çalışmada LA1777 (*Solanum habrochaites* L)'ın üç gerçek yapraklı erken fide döneminde, +4°C'de soğuk uygulaması yapılmıştır. Yeni nesil sekanslama yöntemiyle iki small RNA Kütüphanesi ve iki degradome kütüphanesi oluşturulmuştur. Toplamda 397 miRNA tanımlanmış, soğuğa tepki olarak bunlardan 192'si artış gösterirken 205'i azalmıştır. Bunlara ek olarak 9 adet miRNA ve 6 adet hedef gen transkripti qRT-PCR yoluyla tespit edilmiştir. Bu analiz sonucunda anti-stres proteinlerinin ifadesinin soğuk toleransında birinci derecede rol oynadığı kanaatine varılmıştır (Cao vd. 2014). Caffagni vd. (2014)'nin domateste soğuk toleransının moleküler olarak analiz edilmesine yönelik çalışmalarında 'Albenga' ve 'San Marzona' çeşitleri kullanılmış ve soğuk stres ile ilişkili *CBF/DREB* ve *ROS* aracılı iki ana yolağın ön plana çıktığı görülmüştür. Bu yollara yönelik aday genler seçilmiştir. *CBF* regülunun yanı sıra C_2H_2 tipi Zinc finger proteini aracılı soğuk sinyal yollarının da toleransta etkili rol oynadığı bulunmuştur. *CBF/DREB1* düzenleyici (regulon), bitkilerdeki soğuk stresi ile bağlantılı olarak bulunan ilk ve en önemli örnek düzenleyici kümedir. *CBF* homologları pek çok tek ve çift çenekli bitki türünde tanımlanmıştır. İlginç olan bu regulonun soğuğa dayanıklı bitkilere has olmadığını, aynı zamanda domates, pirinç, ayçiçeği ve narenciye gibi soğuğa duyarlı (sıcak mevsim) bitkilerin genomunda da evrimsel olarak korunduğunu görülmektedir (Zhang vd., 2004, Morsy vd., 2005, Fernandez vd., 2008, He vd., 2012). Yapılan bir çalışma sonucu *CBF1* ve *CBF2*'nin transkriptlerinin 10°C sıcaklığın altında indüklendiği bulunmuştur. Buna ek olarak domateste soğuğa uyum sürecindeki *CBF* mekanizmalarının Arapidopsis'in soğuğa uyum mekanizmalarıyla ortak noktalara sahip olduğunu düşündürmüştür (Zhou vd. 2014).

Bir başka çalışmada *Solanum lycopersicum* L ve *Solanum habrochaites* L türlerine ait iki genotipe 4°C'de 10 gün soğuk uygulanmış yeni nesil sekanslama sistemleri yardımıyla transkriptom analizi yapılmıştır. 200 milyon okuma sonrasında genler, miRNA'lar ve alternatif ekleme (alternate splicing) olayları gözlemlenmiştir. İki tür arasında soğuk stresi sonucunda oluşan gen ifade desenlerinde farklılıklar olduğu tespit edilmiştir (Chen vd. 2015).

Ding vd. tarafından (2016) yayınlanan bir raporda soğuk stresi altında sedoheptulose-1, 7-bisphosphatase (SBPase) aktivitesindeki değişikliklerin SBPase antisens ve sens olan genetiği değiştirilmiş (transgenik) domates (*Solanum lycopersicum* L) bitkilerinde fotosentez ve büyüme üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir. SBPase aktivitesindeki değişiklik sayesinde soğuk stresi altında transgenik bitkilerde karbonhidrat birikimin önemli ölçüde artmış olduğu gözlemlenmiştir.

SnRK2'ler, Absisik asit (ABA) sinyalinin kritik bileşenleridir ve aktiviteleri, büyüme ve stres tepkisi durumları arasında geçiş yapmak için bitki hücrelerinde sıkı bir şekilde düzenlenir. ABA'dan sonra aktivasyon döngüsünde SnRK2'lerin otofosforile olduğu, fosfataz 2C'nin aktivitesini bloke ettiği bildirilmiştir; otofosforilasyon, kinaz fonksiyonlarını aktive ederek, Arabidopsis'te ABA maruziyetine ve ozmotik streslere yanıt olarak aşağı akıştaki (downstream) substratlarının çoğunun fosforilasyonu ile sonuçlandığı bildirilmiştir (Hsu vd. 2018).

Bir diğer çalışmada soğuğa tepki olarak kodlandığı düşünülen SIF3HL geninin RNA interferaz yoluyla susturulması sonucu elektrolit sızıntısı, lipid peroksidasyon (Malondialdehit-MDA), prolin ve reaktif oksijen türleri (ROS) seviyelerindeki değişim soğuğa karşı hassasiyete yol açmıştır (Hu vd. 2019).

Domateste soğuğa toleransı geliştirmek için çözünür şeker seviyelerini modüle eden transgenik *VvBAM1* geninin ektopik ifadesi üzerine bir çalışma yapılmıştır. Bu çalışmada *VvBAM1*'in aşırı ekspresyonu nişasta hidrolizine müdahale ederek çözünür şeker seviyelerini etkilemiş ROS seviyelerini düşürerek soğuğa tolerans kabiliyetini geliştirdiği görülmüştür (Liang vd. 2021).

Chi vd. (2020) tarafından Brassinosteroid (BR) ile indüklenen soğuk toleransının ubiquitinle işaretlenmiş protein agregatlarındaki değişikliklerle ilişkili olup olmadığı, aynı genetik arka plana sahip fakat BR biyosentez yetenekleri farklı olan domates bitkileri kullanarak incelenmiştir. Bu bitkiler arasında, BR biyosentez genlerinden *DWARF*'ın kusurlu olduğu bir mutant olan *dwf*, *DWARF*'ı aşırı eksprese eden transgenik bir bitki olan *DWFOE* ve yabani tip (WT) bulunmaktaydı. Optimum büyüme koşulları altında, üç genotip arasında REL, Fv/Fm, D1 protein birikimi veya çözünmeyen protein agregatlarının belirlenen seviyeleri açısından anlamlı bir fark olmadığı bulunmuştur. Bir diğer çalışmada BR'lerin bitkinin strese tepkisinde kritik bir rol oynadığı görülmüştür. Düşük sıcaklık ve BR'lerin etkisiyle indüklenen brassinazole-resistant 1 transkripsiyonel bağlanma proteini (*BZR1*), C-tekrar bağlanma faktörleri (*CBF1*, *CBF3*) ve respiratory burst oxidase homolog 1 (*RBOH1*)'in promoterlerine bağlanmış ve bunların ekspresyonunu teşvik etmiştir. Kritik olarak *RBOH1* ekspresyonunun bastırılması, düşük sıcaklık ve BR kaynaklı *BZR1* birikimini ve bununla ilgili CBF transkriptlerinde artışları olumsuz etkilemiştir. Ayrıca *RBOH1* bağımlı H₂O₂ üretimi, glutasyon homeostazını etkileyerek *BZR1* birikimini ve *CBF* transkriptlerinin seviyelerini de düzenlemiştir. Tüm bu sonuçlar birlikte ele alındığında, *BZR1* ve reaktif oksijen türleri arasındaki etkileşimin düşük sıcaklık ve BR ile aktive edilen *CBF* ekspresyonuna aracılık ettiğini ve domateste (*Solanum lycopersicum* L.) soğuğa toleransa yol açtığını göstermiştir. Yine de soğuğa tepki süreçlerinde düşük sıcaklığa duyarlı bitkilerde *CBF* yolunun aktivasyonunun temelini oluşturan mekanizma belirsizliğini korumaktadır (Fang vd. 2021).

Fotosentetik enzimlerden olan Rubiscoların birimlerini eksprese eden genlerden *SIRbcS1* soğuğa tolerans konusunda regüle edici etkisinin olduğu yapılan çalışmada ortaya konmuştur. *SIRbcS1*'in diğer Rubisco alt birimleriyle %97,62 oranında özdeş olmasına rağmen soğuğa adaptasyon sırasında etkisi diğerlerine göre kayda değer bulunmuştur (Zhuang vd. 2020).

Bir diğer çalışmada, oksidatif hasar, hidrojen peroksit ve elektrolit sızıntısı

ölçülerek belirlenmiştir. Bitkileri soğuğa maruz bırakma, hidrojen peroksit üretimini tetikleyerek oksidatif stresi önemli ölçüde indüklemiştir ve AsA (askorbik asit) oksidatif hasarı önemli düzeylerde hafifletmede etkili olmuştur. Uygulama yapılmamış bitkilerde H_2O_2 miktarı 54.33 nmol g⁻¹ FW iken, soğutma stresine maruz bırakıldığında bu miktar önemli ölçüde ve yoğun bir şekilde 89.56 nmol g⁻¹ FW seviyesine yükselmiştir. En düşük hidrojen peroksit miktarı (25.20 nmol g⁻¹ FW) AsA ile ön uygulama görmüş bitkilerde rapor edilmiştir; bununla birlikte, soğuk stresine maruz bırakılmış ve AsA ile ön uygulama görmüş fidelerde hidrojen peroksit miktarları 72.72 nmol g⁻¹ FW olarak gözlemlenmiştir. Dolayısıyla, dışarıdan uygulanan askorbik asit, soğuk stresi altındaki bitkilerde H_2O_2 birikimini önemli ölçüde azaltmıştır (Elkelish vd. 2020).



3. MATERYAL VE METOT

3.1. Bitkisel Materyal

Materyal olarak 6 hibrit, 10 saf hat, 1 standart çeşit ve 1 yabancı formdan oluşan 18 genotip ön değerlendirme sürecine dahil edilmiştir. Kullanılan hat ve çeşitler, piyasada tek ürün ve güz yetiştiriciliği için uygunluğu bilinen hibrit çeşitlerin yanı sıra Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü (BATEM)' de geliştirilen soğuğa hassas bir hibrit çeşit, hassas yerel genotipler, önceki çalışmalarda tolerant ve hassas olarak değerlendirilen genotiplerden (Tepe ve Kabaş, 2019) oluşturulmuş olup liste Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Ön değerlendirme testlerine alınan genotipler

Hassas olarak değerlendirilenler:	Tolerant olarak değerlendirilenler:
S-1 (BATEM 3)	R-1 BATEM 1
S-2 (BATEM 4)	R-2BATEM 2
S-3 (BATEM 5)	R-3BATEM 8
S-4 (BATEM 6)	R-4 (Kızılkaya F1)
S-5 (BATEM 7)	R-5 (Bestona F1)
S-6 (BATEM 9)	R-6 (Anıt F1)
S-7 (BATEM 10)	R-7 (Çiğdem F1)
S-8 (BATEM Özçelik F1)	R-8 (Seyran F1)
S-9 (Ayaş Domatesi)	R-9 (LA1777- <i>Solanum habrochaites</i>)

3.2. Yetiştirme Ortamı

Çalışmada kullanılan 18 genotipe ait tohumlar tesadüf blokları deneme desenine göre 3 tekerrürlü olarak, her tekerrürde 6 bitki olacak şekilde 32 gözlü fide viyollerine ekilmiştir. Viyollerdeki gözlerin ağız çapı 55mm, iç derinliği ise 70mm'dir. Viyoller 3:1 oranında klasman torf-perlit karışımından oluşan harç ile doldurulup tohum ekimi yapıldıktan sonra üzeri vermikülit ile kapatılmıştır. Ön değerlendirme işlemlerine kadar 2 günde bir, bir boş-bir dolu (20:20:20 dengeli gübre ile) olacak şekilde sulanmıştır.

3.3. Ön Değerlendirme Kriterleriyle Genotiplerin Seçimi

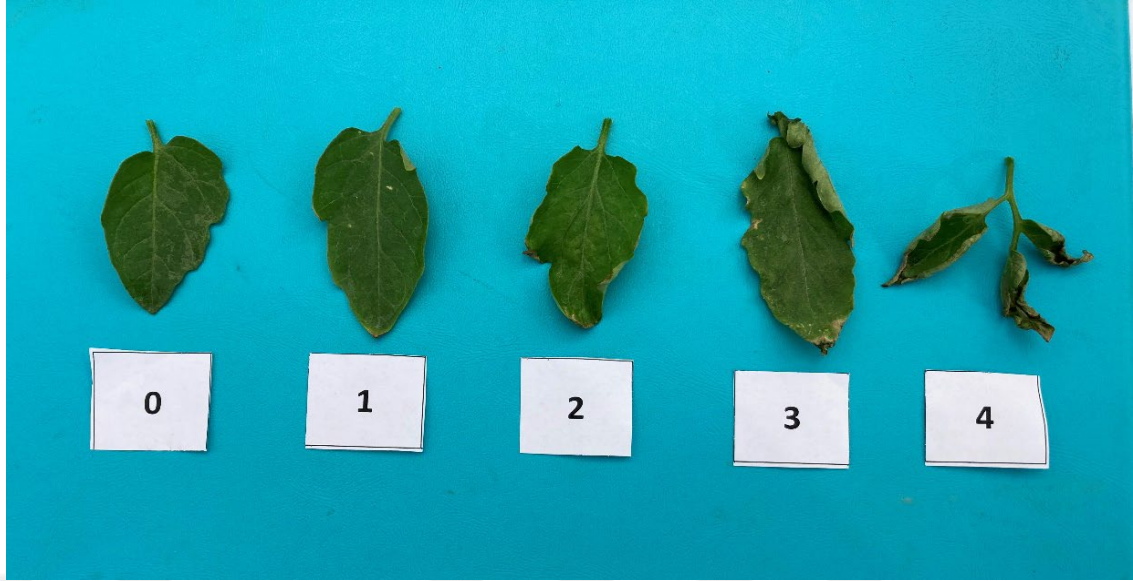
Test edilen 18 genotipten 3 adet en hassas ve 3 adet en tolerant olanları belirlemek için fideler 2-3 gerçek yapraklı dönemine geldiklerinde, 3 tekerrür ve her tekerrürde 6'şar bitki olacak şekilde, 3°C'(± 2)'de, 120 saat, 12/12 saat gece gündüz foto-periyotta ve 350 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ ışık yoğunluğuna sahip iklimlendirme odasında tutulmuşlardır (Şekil 3.1). Aynı genotiplerin şahitleri ikinci grup olarak standart sera koşullarında (25-30°C) yetiştirilmişlerdir. (Cao vd. 2015; Tepe ve Kabaş 2019). Bu süreçte 4 farklı değerlendirme kriteri dikkate alınmıştır: Görsel değerlendirme, klorofil içeriği, Lipid peroksidasyon analizi ve Hidrojen peroksit analizi.



Şekil 3.1. A) Ön değerlendirme uygulaması için düşük sıcaklık uygulanan bitkilerin görünümü B) Kontrol bitkilerinin genel görünümü C) Kontrol bitkilerinden yaprak örneği alımı D) MDA ve H₂O₂ analizlerinde spektrofotometrik ölçümlerin görüntüsü

3.3.1. Görsel değerlendirme

Ön değerlendirme adımlarından ilki olan görsel değerlendirme için 120 saat boyunca 3°C'(±2) soğukta tutulan fideler seraya, kontrol grubunun yanına alındıktan 5 gün sonra Wang vd. (1996); Cao vd. (2015); Tepe vd. (2018) tarafından uygulanan metottaki skala modifiye edilerek görsel olarak değerlendirilmiştir. Skala değerlerinin açıklamaları Çizelge 3.2'de verilmiştir. Soğuk hasarını görsel olarak değerlendirmek için 5 seviyeli bir puanlama skalası kullanılmıştır. Bu seviyeler aşağıdaki Şekil 3.2'de verilmiştir. İklim odasından çıkarılan her genotipin her tekerrürüne ait 4 fide kontrol grubuna göre görsel olarak puanlanmıştır. Tekerrürlerin ortalaması alınarak en az ve en çok etkilenen genotiplere ait skala değerleriyle soğuk hasarı indeksleri belirlenmiştir.



Şekil 3.2. Görsel değerlendirme kullanılan soğuk hasarını gösteren seviyelere ait yaprak örnekleri

Çizelge 3 2. Görsel değerlendirme skalası

0	Zararlanma yok	Hiç etkilenme yok (kontrol bitkileri gibi)
1	Az zararlanma	Alt yapraklarda solgunluk başlangıcı ve renk açılması
2	Hafif derecede zararlanma	Sürgünde küçük nekrotik alanların oluşumu, yaprak kenarlarında hafif kurumalar
3	Orta derece zararlanma	Yapraklarda şiddetli solgunluk ve sararma, yaprak kenarlarında kurumalar yaprak alanının %30'una yakın nekroz-solgunluk oluşumu
4	Şiddetli zararlanma	Yapraklarda kurumalar, yaprak alanının %50'den fazla nekrotik lekelenmeler

Görsel değerlendirme stres şiddeti indeksi aşağıdaki formülle hesaplanmıştır.

$$I = \frac{\sum n \cdot i}{n} \quad (3.1.1)$$

$n = \text{bitki sayısı}$

$i = \text{stres indeksi}$

3.3.2. Yapraktan klorofil ölçümü

SPAD-502 Plus cihazı bitki yapraklarının klorofil içeriğinin yaprağa zarar vermeden çabuk ve kolay bir şekilde ölçülebilmesini sağlamaktadır (Şekil 3.3). Klorofil ölçümleri için her bir genotip iklim odasındaki 120 saat soğuk uygulamasının ardından kontrol grubunun bulunduğu seraya alınmıştır. Alındığı andan itibaren, 3, 5 ve 7 gün sonra olmak üzere 4 farklı günde klorofil okuması yapılmıştır. Ölçüm yapılırken dikkat edilen husus olarak gölge düşmeyecek şekilde bir genotipe ait 3 tekerrürlü ve her tekerrüründe bulunan 4 bitkinin 3. yapraklarının damarsız bölümlerinden toplamda 12 okuma yapıldı ve ortalamaları kaydedilmiştir. Kontrol grubu genotiplerinde de aynı yöntemle ölçümler yapılarak fotosentez etkinliğini ölçmek adına bir klorofil indeksi oluşturulmuştur. İklim odası ve kontrol bitkilerinin klorofil değerleri arasındaki oran bu amaçla kullanılmıştır. Sonuçların değerlendirilmesinde aşağıdaki formüle göre yapılmıştır.

$$\text{Soğuk etkinliği indeksi (SEİ)} = (\text{Uygulama} / \text{Kontrol}) \times 100 \quad (3.1.2)$$



Şekil 3.3. SPAD502 Plus cihazıyla yapraktan klorofil ölçümü

3.3.3. Lipid peroksidasyon (Malondialdehit-MDA) analizi

Lipid peroksidasyonu, Kıran vd. (2015)'nin kullandığı metoda göre, malondialdehit (MDA) içeriğinin ölçülmesi ile belirlenmiştir (Şekil 7). Bunun için 0,5 g taze yaprak dokusu 1 mL (%5) trikloroasetik asit (TCA) solüsyonunda homojenize edilmiştir. Homojenat 16000 g' de 15 dakika oda sıcaklığında santrifüj yapılmıştır. Süpernatant, %0,5 thiobarbiturik asit (TBA) ve %20 TCA solüsyonlarından eşit hacimler alınarak tüplere aktarıldı ve daha sonra bu tüpler 96°C 'de 25 dakika inkübe edilmiştir.

İnkübasyondan sonra tüpler buz banyosuna aktarılıp 12 000 g'de, 5 dk, santrifüj yapılmıştır. Sonrasında elde edilen süpernatanın absorbansı 532 nm'de ve 600 nm spektrofotometrik değerlerde ölçülmüştür. Bu ölçüm sırasında %20 TCA + %0,5 TBA solüsyonu kör olarak kullanıldı. MDA içeriği, 155 mM-1 cm-1 tükenme katsayısı spektrofotometre cihazı tarafından otomatik hesaplanmıştır. Elle hesaplanması durumunda formül şu şekildedir:

$$MDA \text{ equivalents (nmol ml}^{-1}) = [(A532-A600)/155000]*106 \quad (3.1.3)$$



Şekil 3.4. A) MDA ve H₂O₂ ölçümleri için kullanılan spektrofotometre B) H₂O₂ ölçümü için kullanılan standartlar

3.3.4. Hidrojen peroksit (H₂O₂) analizi

Hidrojen peroksit seviyesi ölçümlerinde Junglee vd. (2014)'nin yönteminden yararlanılmıştır. Buna göre sıvı azotta öğütülmüş 0,5 gram bitki örneği hızlı bir şekilde 50 ml'lik falkon tüplere konularak üzerine 5 ml %0,1'lik Trikloroasetik asit (TCA) ilave edildi ve karıştırılmıştır. Örnekler daha sonra 12.000 G'de 15 dk. santrifüjlenmiştir. Santrifüjün ardından 0,5 ml süpernatant temiz bir 1,5 ml'lik eperdorfa alınarak üzerine 0.5 ml 10 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7.0) ve 1 ml 1 M potasyum iyodür (KI) eklenmiştir. Süpernatantın absorbans değeri spektrofotometre cihazında 390 nm de okundu. H₂O₂ içeriği standart eğriden elde edilen denklem kullanılarak hesaplanmıştır.

Çizelge 3.3. Standart eğri okuması için hazırlanan tüplerin içeriği

Test Tüpü	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>	<u>6</u>	<u>7</u>
H ₂ O ₂ (ml)	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1
PBS (pH 7.0)	1	0,9	0,8	0,6	0,4	0,2	0
1 M KI	1	1	1	1	1	1	1

H₂O₂ standart eğrisi için 57 µl %30'luk H₂O₂ çözeltisinden alındı ve 100 ml'ye tamamlandı. Daha sonra tekrar 10 kat seyreltme yapılarak Çizelge 3.3'de belirtilen miktarlara göre test tüpleri hazırlandı (Şekil 3.4). Çözeltilerin molaritesi için kullanılan formül şöyledir:

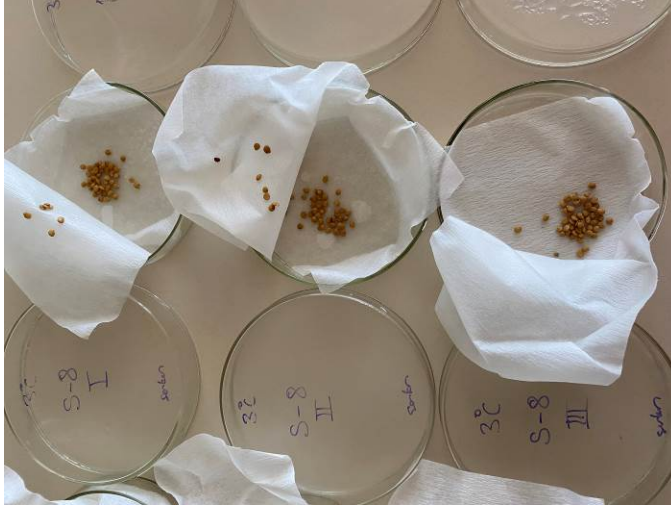
$$M1 \cdot V1 = M2 \cdot V2 \quad (3.1.4)$$

3.4. Düşük Sıcaklık Uygulamaları

Ön değerlendirme kriterlerine göre test edilen 18 genotip içerisinde en uç değerleri veren 3 hassas ve 3 tolerant genotip ikinci aşamaya alındı. Seçilen genotiplere ait tohumlara düşük sıcaklık uygulanarak çimlenme oranları alındı. Yine bu genotiplere ait bir başka grup tohum fide haline getirilerek fide ve çiçek döneminde yapılan düşük sıcaklık uygulamasıyla da gen ifade seviyeleri ve sonraki dönemdeki meyve bağlama ve tohum verimliliği değerleri alındı.

3.4.1. Tohuma düşük sıcaklık uygulaması

Üç hassas, üç tolerant ve kontrol genotip (LA1777) tohumları, her bir genotip için 50'şer adet ve 3 tekerrürlü olacak şekilde ayrıldı. Her grup tohum petri kaplarında, nemli filtre kâğıdı içerisinde (Barrero-Gill vd. 2016), 7 gün boyunca 3°C(±2), 13°C(±2) ve 25°C(±2)'de olacak şekilde tutulup işlem sonundaki çimlenen tohum sayıları belirlendi (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Tohuma uygulanan düşük sıcaklık denemesinde petri kaplarının hazırlanması

Normal koşullarda (20-25°C’de) viyollere ekilen tohumlardan elde edilen genotiplere ait fideler 3-4 yapraklı olduğu dönemde 2 gruba ayrıldı. Üç tekerrürlü olacak şekilde her grup için 6 fide düşük sıcaklık uygulaması için denemeye alındı.

3.4.2. Fide dönemi düşük sıcaklık uygulaması

Yetiştirilen fideler 3°C (± 2) ve 12 saatlik foto-periyot, 350 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ ışık yoğunluğuna sahip iklim odasına alındı (Barrero-Gill vd. 2016). Bu süreçte 0., 1., 12. ve 48. saatlerde RNA izolasyonu için 3 tekerrürlü olarak her tekerrürde 2 bitkiden yaprak örneği alındı ve hemen sıvı nitrojen dolu bir kap içerisinde ani donmaya maruz bırakılarak metabolik tüm aktiviteler durduruldu. Sonrasında yapılacak analiz işlemlerine kadar -80°C’de muhafaza edildi. (Cao vd. 2014).

3.4.3. Çiçeklenme dönemi düşük sıcaklık uygulaması

İkinci grup olarak ayrılan genotiplerin fideleri elde edildikten sonra standart bir sera içerisinde 18cm çapında ve 22cm derinlikte, 5 lt hacimli saksılarda yetiştirildi (Şekil 3.6). Yetiştiricilik boyunca 2 günde bir bir boş-bir dolu (20:20:20 dengeli gübre ile) olacak şekilde sulandı. Her genotip için 3 tekerrür ve her tekerrürde 2 saksı (her saksıda birer bitki) olacak şekilde çalışma planlandı ve 2. salkım çiçeklenmeden yaklaşık 5 gün önce iklim odasına (3°C (± 2), 12 saat foto-periyot) alındı. Daha sonra 0., 1., 12. ve 48. saatlerde çiçek örnekleri alınarak sıvı nitrojen içerisinde konuldu. Daha sonra -80°C’de RNA izolasyonuna kadar muhafaza altına alındı. Çiçeklenme ve sonrasında alınan gözlemler aşağıda belirtildiği şekilde uygulanmıştır.



Şekil 3.6. Fide dönemi saksı hazırlığı ve çiçek dönemi düşük sıcaklık uygulaması

3.5. Düşük sıcaklık uygulaması sonrası meyve ve tohum ölçümleri:

Sera koşullarında yetiştirilen 2. grubun 2. çiçek salkımı dönemindeki düşük sıcaklık uygulaması sonrası bitkilerin 3. çiçek salkımlarındaki tutan meyvelerin sayısı alındı. Meyvede şekil bozukluğuna oranını tespit etmek için hasarlı meyvelerin salkımdaki toplam meyve sayısına oranı hesaplandı. Salkım başına meyve ve tohum sayısı kaydedildi. Salkımda kaç meyvede kaç tohum bağladığı ve tohum ağırlıkları (g) alındı. Tohum çimlenme gücü testi ölçümleri için petri kaplarında %2'lik agar içerisinde tamamıyla karanlık bir ortamda çimlenmeleri sağlanarak sayımları yapıldı (Zamir ve Gadish 1987).

3.6. Gen İfadesi Çalışmaları (RT-qPCR)

3.6.1. RNA izolasyonu

İzolasyon için örnekler her bloktaki uygulamaların her tekerrürden 2'şer bitkiden olacak şekilde alınmıştır. Yaprak örnekleri için 3-4 yapraklı fide döneminde bitki başına 2 yaprak şeklinde toplanmıştır. Çiçek örnekleri ise 2. döl çiçek salkımından her bitkiden 3'er çiçek olarak alınmıştır. Yaprak ve çiçek tüm örnekler toplanır toplanmaz derhal sıvı azot içerisinde konulmuş ve laboratuvarında sıvı azot ile tekrar parçalanarak toz haline getirilmiştir. Daha sonra bunlardan 100'er mg tartılarak üzerine 1 ml Trizol eklenerek 10 dk boyunca oda sıcaklığında bekletilmiş ve akabinde 13000 RPM'de 10 dk santrifüj yapılmıştır. Santrifüjden sonra üst faz yeni tüplere aktarılarak üstüne 200 µL 24/1 oranında kloroform-izoamil eklenmiştir. Hafifçe alt üst edilerek karıştırılan tüpler 3 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Bu işlemden sonra tekrar 13000 RPM'de 10 dk santrifüj ile 3 farklı faza ayrılması sağlanmıştır. İhtiyacımız olan RNA ürünlerinin bulunduğu üst faz dikkatlice pipetle çekilerek yeni tüplere aktarılmıştır. Çekilen miktar kadar izopropanol eklenerek elde hafifçe karıştırıldıktan sonra 10 dk oda sıcaklığında inkübasyonu sağlanmıştır. Sonrasında yine 13000 RPM'de 10 dk santrifüj yapıldıktan sonra peletin dibe çökerek eppendorf tüpüne yapışması sağlanmış ve üst faz dikkatlice

dökülmüştür. Peletlerin üzerine 1ml %70'lik ethanol eklenerek 11000 RPM'de 5 dk santrif yapılmış ve sonrasında üst faz dikkatlice dökülerek peletler 30 dk boyunca kurumaya bırakılmıştır. Kuruduktan sonra peletlerin üzerine 100 ml ultra steril su eklenmiş ve 10 dk, 55°C sıcak su banyosunda inkübe edilmiştir. Bu işlemi takiben birkaç saniye vorteks ve kısa bir santrifüjden sonra tüpler -20°C dolaba kaldırılmıştır (Macedo ve Ferreira 2014). RNA ürün varlığını teyit etmek için OD değerleri biodrop cihazında ölçülmüştür.

3.6.2. DNaz Enzim Uygulaması

RNA örnekleri 1 µg yoğunlukta olacak şekilde ayarlanmıştır. Bu konsantrasyona karşılık gelen miktardaki RNA, 1 µL DNaz tamponu, 1 µL DNaz (1/100) ve son hacmi 10 µL'ye tamamlayacak kadar su ile birleştirilmiştir. Elde edilen reaksiyon karışımı, enzim aktivitesini sağlamak amacıyla 37°C'de 30 dakika süreyle inkübe edilmiştir. Enzim aktivitesini durdurmak için 1 µL EDTA eklenmiş ve ardından 65°C'de ikinci bir inkübasyon gerçekleştirilmiştir. DNaz uygulanmış RNA ürünlerinin OD değerleri ölçülmüştür.

3.6.3. Gradient RT-qPCR ve Standartların Oluşturulması

Çalışma kapsamında seçilen genlerle ilgili primerler (Çizelge 3.4) için PCR optimizasyonu yapılmıştır. Bu amaçla, her bir primer için 49-65°C aralığında 8 farklı sıcaklıkta bir gradient planlaması yapılmıştır. Analizlerde bulk örnekleri kullanılmış ve her bir gen için optimum sıcaklıklar belirlenmiştir. Gradient qPCR sonrasında elde edilen ürünler %1'lik agaroz jelde görüntülenmiş ve ürün kalitelerine bakılmıştır. Genler için annealing sıcaklığı seçiminde qPCR sonuçlarından elde edilen grafikler ve jeldeki bant görüntüleri değerlendirilmiştir. Reaksiyon sayısı ve 64'lü plakadaki uygulanacağı kuyucuk sayısının minimize edilmesi için azami gayret gösterilmiştir. Daha sonra, her gen için ayrı ayrı standartlar hazırlanmış ve primerlerin çalışma etkinliği kontrol edilmiştir. Standartların konsantrasyonları sırasıyla 1/10.000, 1/100.000, 1/1.000.000, 1/10.000.000 ve 1/100.000.000 (RNA/ultra steril su) olacak şekilde ayarlanmış ve her bir gen için belirlenen annealing sıcaklıklarına göre qPCR analizi yapılmıştır. Optimizasyon çalışmalarının ardından örneklerin qPCR analizine geçilmiştir.

Çizelge 3.4. Çalışılan genlerin primer dizilimleri ve bağlanma sıcaklıkları

Gen adı	İleri primeri (5'-3')	Geri primeri (5'-3')	Kaynak	T _m (°C)
<i>CBF1</i>	CTGCCTATCCCTGCTTCCTC	AAGATCGCCTCCTCATCCAC	Caffagni vd. 2014	49
<i>CBF3</i>	AGTCGGAGGAAGAAGAA TCAGTG	TCCCATTTAGTACATTGAGGTG	Caffagni vd. 2014	49
<i>SIF3HL</i>	CAGGCAGTAAGTAACGGT AAGTAC	GAGATCCATCTTCTGTGACAG	Hu vd. 2019	58
<i>SSIRBCS1</i>	GGATCCATGGCTTCCTCA ATTGTCTC	GTCGACGAATCCTTCTGGCTTGTAGG	Zhuang vd. 2020	58

Çizelge 3.4'ün devamı,

<i>RBOH1</i>	TCCAGCACAAAGATTACCG	CCTCCATTGCGACGAT	Fang vd. 2021	58
<i>LebZIP2</i>	ATGGCTTCGTCAAGTGGT	TCAGTACTGCAAGACATC	Seong vd. 2008	58
<i>C₂H₂ Zing finger protein</i>	TGTCACAAGTGTTCCTG ACTG	TTAGCGTTAGCATTCCGTTACC	Caffagni vd. 2014	58
<i>LeCOR413PM2</i>	AACTGGAGGAGCAACATA	TCAAGCCAATCTGGAAAG	Zhang vd. 2021	53
<i>SIMYB102</i>	TGGTCTGCTATTGCTGCA CG	CGTGGACTGTGTGCTACTGG	Wang vd. 2020	53
<i>SIREC2</i>	CGCTGCTGGAATCATCGA AA	CACCTGCTGTCATTCGATGG	Zhang vd. 2023	58
<i>LePOD</i>	GTCCGGGAGTTGTTTCTT GT	ATCACCATTGGCTTCTGACA	Zhang vd. 2021	49
<i>SISNAT</i>	GGAGGAGATGTTGATGTG TATG	TGCATGATCTGATGTTGCAC	Wang vd. 2020	53
<i>SLAMST</i>	TCAACAAGGCATATGGAA TGAC	CAACAATGGAGTTGAGTCCTTC	Ding vd. 2022	58
<i>LeLTP1</i>	TCTAGGAGGCTGTTGTGG TG	GTGGAGGGGCTGATCTTGTA	Zhang vd. 2021	49
<i>EF-1 (referans)</i>	GGAACCTGAGAAGGAGCC TAAG	CAACACCAACAGCAACAGTCT	Løvda ve Lillo, 2009	49-58
<i>Actin (referans)</i>	GAAATAGCATAAGATGGC AGACG	ATACCCACCATCACACCAGTAT	Løvda ve Lillo, 2009	49-58

3.6.4. RT-qPCR Analizleri

Real Time qPCR analizlerinde “ABT One-Step RT-qPCR Kit” kullanılmıştır. Kit protokolüne göre; Reaksiyon karışımından 10 µL, forward primerden 0,2 µL, reverse primerden 0,2 µL alınarak reaksiyon oluşturulmuştur. Ardından DNaz uygulanmış RNA örneklerinden 2 µL alınarak 96'lık plakalara konulmuş ve üzerine 10µL reaksiyon karışımı eklenmiştir. Cihaza aktarılan örnekler için uygulanan sıcaklık şartları ise şu şekildedir: 1;48°C'de 20 dk, 2;95°C'de 5 dk, 3;95°C'de 15 saniye, 4;49 ya da 58°C'de 1 dk ve 3. adımdan itibaren 39 döngü. Analiz sonunda Cq değerleri elde edilerek ve 2-ΔΔCt metodu ile hesaplamalar yapılmıştır. Bu metot için referans gen olarak EF-1 kullanılmıştır.

3.7. İstatistiksel Değerlendirme Yöntemi

Tüm istatistiksel analizler, SPSS İstatistik programı kullanılarak Tek Yönlü ANOVA (Analysis of variance) yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Analizlere başlamadan önce, veri setindeki örneklerin homojenliği ve varyansların önem dereceleri incelenmiştir. Elde edilen bulgular doğrultusunda, eşit dağılım gösteren varyans analizleri

için Duncan Çoklu Karşılaştırma Metodu uygulanmıştır. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p < 0,005$ olarak belirlenmiş ve tüm sonuçlar bu kriter çerçevesinde değerlendirilmiştir.

Bitkilerin morfolojik özellikleriyle ilgili analizler, her genotip için 6 bitkinin ortalama değerleri karşılaştırılarak yapılmıştır. Diğer biyokimyasal ve genetik analizler ise üç tekrar halinde gerçekleştirilerek sonuçların güvenilirliği artırılmıştır. Bu yöntem, her bir değişkenin genotipler arasındaki varyasyonunu istatistiksel olarak belirgin bir şekilde değerlendirmeyi sağlamış, düşük sıcaklık stresine karşı genotiplerin gösterdiği farklılıkların anlamlılığını net bir şekilde ortaya koymuştur.



4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Ön Değerlendirme Kriterlerinin Bulguları

Her bir genotipe ait fideler, 2-3 gerçek yapraklı olduğu dönemde deneysel uygulamalar için iki farklı gruba ayrılmıştır. Bir grup fideler kontrol serasına, diğer grup ise düşük sıcaklık koşullarını simüle etmek için kullanılan iklim odasına alınmıştır. İklim odasında, bitkiler 3°C (± 2) sıcaklıkta tutulmuş ve burada 12 saat gündüz, 12 saat gece fotoperiyotunda bir hafta boyunca muhafaza edilmiştir. Uygulama 13 Mayıs 2022 tarihinde sabah saat 10:00'da başlamış ve bitkiler 20 Mayıs 2022 tarihinde yine saat 10:00'da iklim odasından çıkarılmıştır.

Düşük sıcaklık uygulaması boyunca, her iki grubun bulunduğu ortam koşulları düzenli olarak kayıt altına alınmıştır. Ortam sıcaklığı ve nem değerleri *DATA LOGGER* cihazları kullanılarak ölçülmüş ve analiz edilmiştir. Kontrol serasında, sıcaklık değerleri tüm deney süresi boyunca 25-30°C aralığında sabit kalmıştır. Bu sıcaklık değişimleri, kontrol serasına ait Çizelge 4.1 ve Şekil 4.1'de detaylı olarak sunulmuştur. Öte yandan, iklim odasındaki düşük sıcaklık uygulaması sırasında sıcaklık değerleri ortalama olarak 2,2-3,4°C arasında seyretmiştir. Nem değerleri de dahil olmak üzere, iklim odasında ölçülen veriler Çizelge 4.2 ve Şekil 4.2'de görselleştirilmiştir.

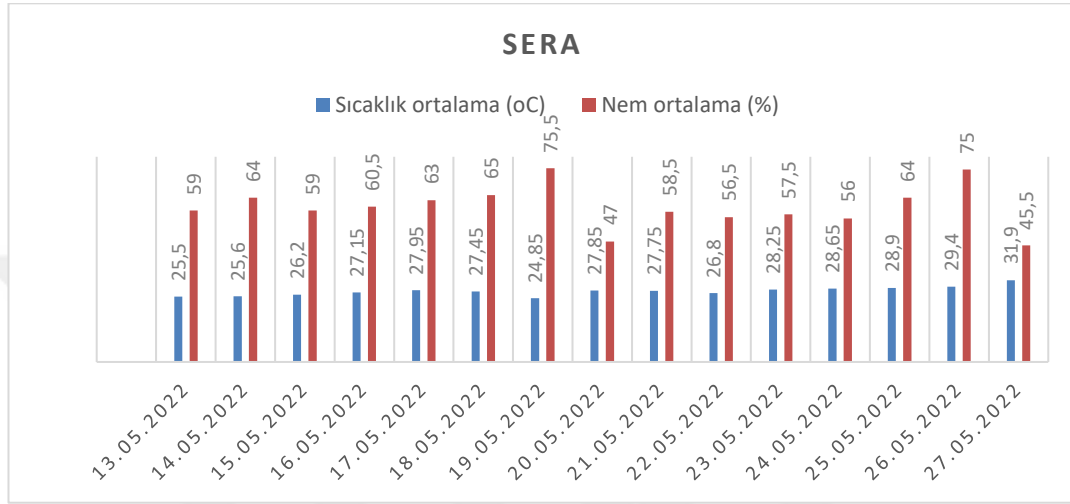
Uygulama süresi boyunca, her iki gruptaki bitkilerin gelişimleri dikkatle izlenmiştir. Düşük sıcaklık uygulanan bitkilerin gelişim durumu, iklim odasında bulundukları süre boyunca yakından takip edilmiş, aynı zamanda kontrol grubu bitkilerinin sera ortamındaki gelişimleri de paralel olarak gözlemlenmiştir. Her iki gruba da aynı gübreleme programı uygulanmış olup, böylece besin açısından herhangi bir farklılık oluşmasının önüne geçilmiştir. Deneysel süreç boyunca kontrol ve deney grupları arasında yalnızca sıcaklık farklılıklarının etkileri incelenmiştir.

Çizelge 4.1. Ziraat Fakültesi Modern Seralar Kompleksindeki kompartmanın uygulama süresince alınan ısı ve nem değerleri

Tarih	Gece		Gündüz		Sıcaklık ortalama (°C)	Oransal Nem ortalama (%)
	Sıcaklık (°C)	Oransal Nem (%)	Sıcaklık (°C)	Oransal Nem (%)		
13.05.2022	18,5	79	32,5	39	25,5	59
14.05.2022	17,4	82	33,8	46	25,6	64
15.05.2022	18,2	68	34,2	50	26,2	59
16.05.2022	20	70	34,3	51	27,15	60,5
17.05.2022	21	78	34,9	48	27,95	63
18.05.2022	19,4	84	35,5	46	27,45	65
19.05.2022	19,7	90	30	61	24,85	75,5
20.05.2022	19,3	56	36,4	38	27,85	47
21.05.2022	19	73	36,5	44	27,75	58,5
22.05.2022	18,5	71	35,1	42	26,8	56,5
23.05.2022	20,1	82	36,4	33	28,25	57,5
24.05.2022	20,6	76	36,7	36	28,65	56

Çizelge 4.1'nin devamı,

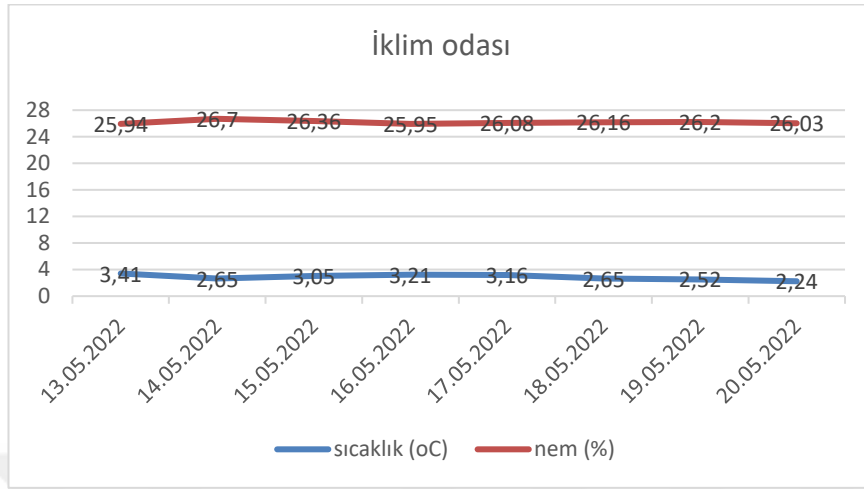
25.05.2022	21	74	36,8	54	28,9	64
26.05.2022	21,3	90	37,5	60	29,4	75
27.05.2022	25,7	51	38,1	40	31,9	45,5



Şekil 4.1. Modern Sera Kompleksindeki kompartmanda kontrol bitkilerinin takibi esnasında alınan ısı ve nem değerlerinin grafiği

Çizelge 4.2. Soğuk uygulamanın yapıldığı süre boyunca iklim odasının sıcaklık ve nem değerleri

Tarih	Gece		Gündüz		Sıcaklık ortalama (°C)	Nem ortalama (%)
	Sıcaklık (°C)	Oransal Nem (%)	Sıcaklık (°C)	Oraansal Nem (%)		
13.05.2022			3,41	25,94	3,41	25,94
14.05.2022	2,28	27,41	3,02	25,99	2,65	26,70
15.05.2022	2,56	26,89	3,55	25,84	3,05	26,36
16.05.2022	2,81	26,10	3,62	25,81	3,21	25,95
17.05.2022	2,78	26,35	3,55	25,82	3,16	26,08
18.05.2022	2,31	26,28	2,99	26,04	2,65	26,16
19.05.2022	2,10	26,36	2,95	26,05	2,52	26,20
20.05.2022	2,24	26,03			2,24	26,03

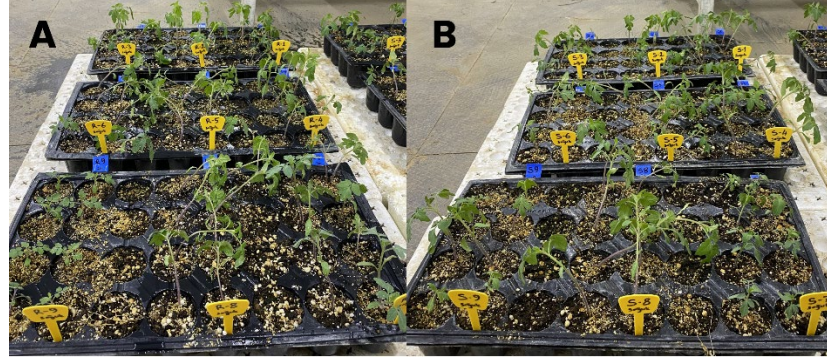


Şekil 4.2. İklim odasındaki sıcaklık ve nem değerleri grafiği

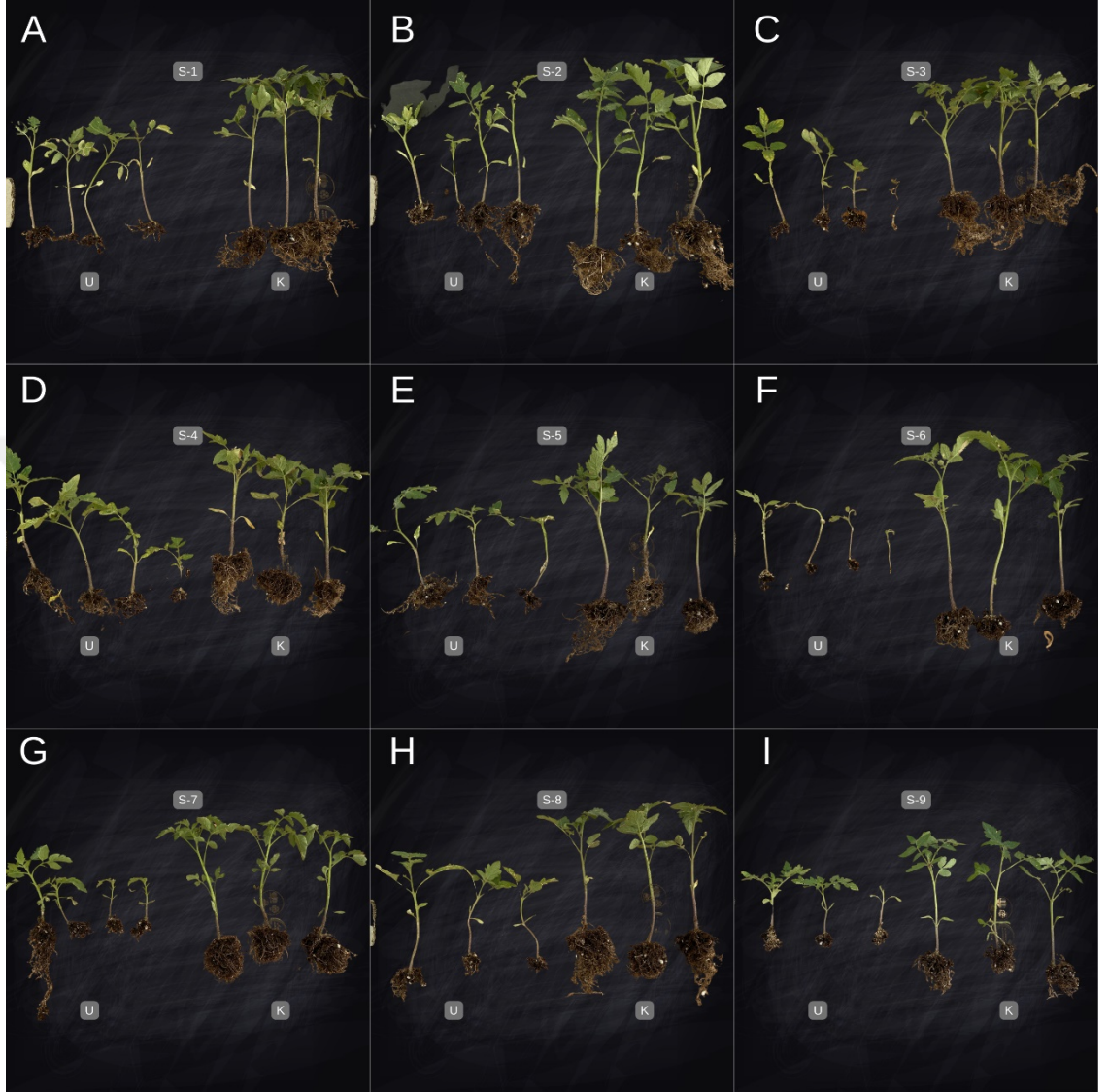
Düşük sıcaklık uygulamasında ($3^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$), hassas bitkilerin neredeye tamamının ve tolerant gruplar içerisinde de birkaçının bu koşullardan ilk günden itibaren yoğun bir şekilde etkilendiği gözlemlenmiştir. Uygulamanın başlangıcından itibaren yapraklarda ve gövdede belirgin su kaybı meydana gelmiş, özellikle yaprak kenarlarında renk değişiklikleri ve kıvrılmalar dikkat çekmiştir. Bu durum, bitkilerin düşük sıcaklığa verdiği fizyolojik ve morfolojik tepkinin temel bir göstergesi olmuştur. Uygulamanın ilerleyen günlerinde bu belirtilerin şiddetinin arttığı ve bazı genotiplerin bu stres koşullarına tolerans gösteremediği anlaşılmıştır. Özellikle 7. günün sonunda bazı genotiplerde bitkilerin bir kısmının tamamen öldüğü kaydedilmiştir.

Düşük sıcaklık uygulaması tamamlandıktan sonra, oksidatif stres düzeyini ölçmek amacıyla malondialdehit (MDA) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) analizleri için yaprak örnekleri toplanmıştır. Bu örnekler, metabolik aktivitelerin minimum seviyeye indirgenmesi ve numunelerin bozulmadan muhafaza edilmesi için sıvı azotta dondurulmuş ve hemen ardından -80°C 'de saklanmıştır.

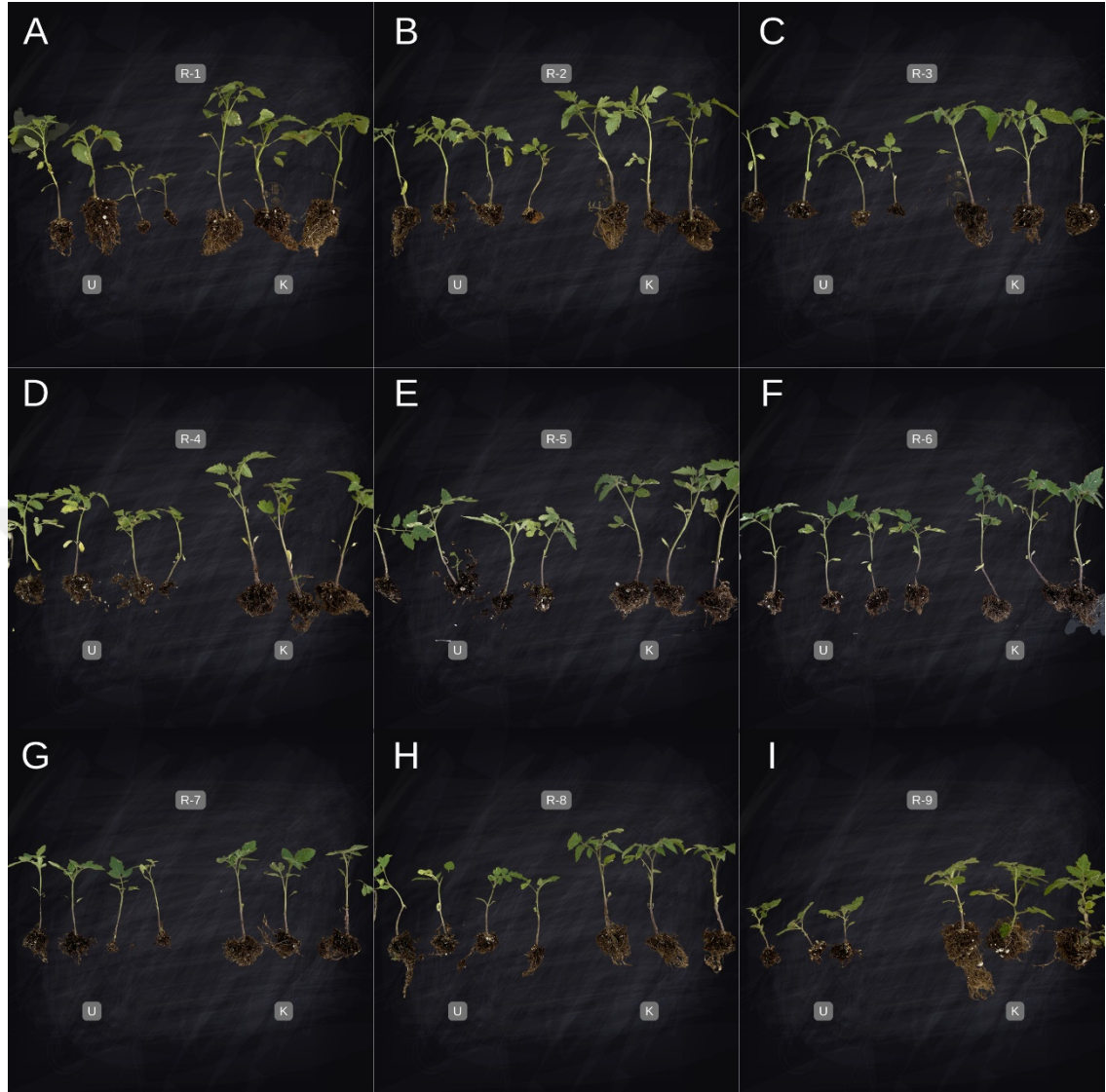
Görsel değerlendirme ve klorofil ölçümleri yapılmak üzere, düşük sıcaklık uygulamasına maruz kalan bitkiler (Şekil 4.3) kontrollü seraya taşınmıştır. Bu serada, kontrol grubuyla yan yana yerleştirilen bitkilerin durumları karşılaştırmalı olarak incelenmiştir (Şekil 4.4 ve Şekil 4.5). Görsel değerlendirme sırasında, bitki yapılarındaki fiziksel değişiklikler kayıt altına alınmış; klorofil ölçümleri ile fotosentetik aktivitedeki değişimler belirlenmiştir. Bu süreç, düşük sıcaklığın bitkiler üzerindeki etkilerini daha kapsamlı bir şekilde anlamak ve stres toleransı gösteren genotipleri belirlemek amacıyla gerçekleştirilmiştir.



şekil 4.3. İklim odasında 7. günde bitkilerin durumu. **A:** Hassas olarak testlenen genotipler. **B:** Tolerant olarak testlenen genotipler



Şekil 4 4. Hassas olarak denemeye alınan genotiplerin düşük sıcaklık uygulama sonrası kontrol bitkileriyle beraber karşılaştırması. U: Düşük sıcaklık uygulanmış bitkiler, K: Uygulama yapılmamış kontrol bitkileri, A: S-1, B: S-2, C: S-3, D: S-4, E: S-5, F: S-6, G: S-7, H: S-8, I: S-9



Şekil 4.5. Tolerant olarak denemeye alınan genotiplerin düşük sıcaklık uygulama sonrası kontrol bitkileriyle beraber karşılaştırması. U: Düşük sıcaklık uygulanmış bitkiler, K: Uygulama yapılmamış kontrol bitkileri, A: R-1, B: R-2, C: R-3, D: R-4, E: R-5, F: R-6, G: R-7, H: R-8, I: R-9

4.1.1. Görsel değerlendirme bulguları

Görsel Değerlendirme İndeksi (GDİ), bitkilerin düşük sıcaklık stresine maruz kaldığında ortaya çıkan fizyolojik zararlanmaları doğrudan ve güvenilir bir şekilde yansıtan kritik bir parametre olarak tanımlanmıştır (Rahman vd., 2013; Cao vd., 2015). Bu çalışmada GDİ, bitkilerin düşük sıcaklık stresine verdikleri tepkileri değerlendirmek için temel bir araç olarak kullanılmıştır. İklim odasında düşük sıcaklık stresine maruz bırakılan bitkiler, 5 günlük bir adaptasyon sürecinin ardından 25 Mayıs 2022 tarihinde

seraya alınmış ve Çizelge 3.2’de belirtilen skalaya göre değerlendirilmiştir. Değerlendirme, her bir grup için 8 bitki üzerinden gerçekleştirilmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre, Çizelge 8’de de görüldüğü üzere, S-2 (3,75), S-3 (4,00) ve S-6 (4,50) genotipleri düşük sıcaklık stresine karşı en yüksek GDİ skorlarına sahip olmuş ve bu durum, bu genotiplerin düşük sıcaklık stresine karşı daha duyarlı olduğunu göstermiştir. Bunun aksine, dayanıklı grupta yer alan R-5 (1,38), R-6 (1,38) ve R-7 (1,25) genotipleri, en düşük zararlanma indeksi skorlarına sahip olarak, düşük sıcaklık stresine karşı tolerans gösterme kapasitesini açıkça ortaya koymuştur. Bu durum, bu genotiplerin stres koşulları altında üstün bir fizyolojik dayanıklılık sergilediğini göstermektedir.

Çalışmada kontrol grubu olarak kullanılan R-9 (*Solanum habrochaites*- LA1777) genotipi ise 1,63’lük bir GDİ skoruna sahiptir. R-9 genotipinin düşük sıcaklığa karşı dayanıklılık özellikleri, daha önce yapılan çalışmalarda da rapor edilmiştir. Örneğin, Cao ve arkadaşlarının (2015) çalışmasında, LA1777 genotipi, en düşük Chilling Injury Index (CII) değeri ile düşük sıcaklık stresine tolerans bakımından en iyi performansı göstermiştir. Bu bulgu, çalışmamızdaki sonuçlarla uyumlu olup LA1777’nin düşük sıcaklık stresine karşı yüksek tolerans kapasitesini doğrulamaktadır.

Çalışmada dikkat çeken bir diğer önemli bulgu, kültür formu olarak kullanılan *S. lycopersicum* genotiplerinin (R-5, R-6 ve R-7), kontrol genotipine kıyasla daha düşük zararlanma indeksi skorlarına sahip olmasıdır. Bu durum, kültür genotiplerinin düşük sıcaklık stresine karşı beklenenden daha iyi bir tolerans göstermiş olabileceğini işaret etmektedir. Bunun nedenleri, bu genotiplerin genetik yapısında bulunan tolerans mekanizmaları veya düşük sıcaklık koşullarına adaptasyon kapasitesinden kaynaklanıyor olabilir. Bu bulgu, kültür domates genotiplerinin stres toleransı konusunda daha fazla araştırma yapılmasını teşvik etmektedir.

GDİ değerlendirmesi, düşük sıcaklık stresinin bitki genotipleri üzerindeki etkilerini anlamak ve dayanıklı genotipleri belirlemek açısından etkili bir yöntem olarak öne çıkmıştır. Bu çalışmada, özellikle R-5, R-6 ve R-7 genotiplerinin düşük sıcaklık stresine karşı dayanıklılık potansiyelleri, gelecek çalışmalar için umut vaat etmektedir. Bu genotiplerin genetik ve fizyolojik mekanizmalarının daha ayrıntılı bir şekilde diğer kriterler bakımından da incelenerek net karar verilmiş olacaktır.

Çizelge 4.3. Genotiplerin görsel değerlendirme indeks skorları

Genotip	GDİ	Genotip	GDİ
S-1	3,25	R-1	2,63
S-2	3,75	R-2	2,13
S-3	4,00	R-3	3,50
S-4	3,13	R-4	1,75
S-5	3,63	R-5	1,38
S-6	4,50	R-6	1,38

Çizelge 4.3'ün devamı,

S-7	2,50	R-7	1,25
S-8	3,13	R-8	2,00
S-9	3,50	R-9	1,63

GDİ: Görsel değerlendirme indeksi

4.1.2. Yapraktan klorofil ölçümü bulguları

Hassas genotip grubunun iklim odasından çıkarılmasının ardından yapılan klorofil ölçümleri, SPAD502 Plus cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu ölçümler, genotiplerin düşük sıcaklık stresine verdikleri fizyolojik yanıtları değerlendirme açısından önemli veriler sağlamıştır. Ölçüm sonuçlarının yer aldığı Çizelge 4.4 ve Şekil 4.6 incelendiğinde, klorofil içeriğinde ilk ölçüm günlerinde bir artış eğilimi olduğu, ancak 5. gün itibarıyla bu eğilimin düşüşe geçtiği görülmüştür. Örneğin S-2 genotipinde düşük sıcaklık uygulanan genotiplerde 0. Gün SPAD değeri 27,60, 3. Gün 29,84, 5. Gün 38,20 olarak ölçülmüş iken 7. Gün bu değer 36,78 olarak ölçülmüştür. Bu eğilim S-1, S-3, S-6 ve S-7, genotiplerinde de gözlenmiştir. Diğer genotiplerde ise 5. ve 7. gündeki klorofil içerikleri yakın seyretmiştir. Görsel değerlendirmeler de bu sonuçları desteklemiş ve 5. gün itibarıyla bitkilerde fizyolojik çöküş belirtilerinin başladığı gözlemlenmiştir.

Hassas genotiplerin bu davranışı, düşük sıcaklık koşullarında ortaya çıkan oksidatif stres, hücre zarlarının zarar görmesi ve fotosentetik sistemlerin bozulması gibi biyokimyasal süreçlerle ilişkilendirilebilir. Bu süreçler sonucunda bitkiler, fizyolojik olarak zayıflayarak klorofil içeriğini koruyamaz hale gelmiştir.

Tolerant genotip grubunda ise farklı bir dinamik gözlemlenmiştir. Bu grupta, klorofil içeriği 7. gün itibarıyla toparlanma eğilimi göstermiştir. Çizelge 4.5 ve Şekil 4.7'de görülebileceği üzere, tolerant genotiplerin klorofil içeriğindeki toparlanma, düşük sıcaklık stresine adaptasyon mekanizmalarının aktiflediğini göstermektedir. Bu durum, tolerant genotiplerin düşük sıcaklık koşullarında fizyolojik uyum süreçlerini başlatabildiğini ve fotosentetik sistemlerini yeniden düzenleyerek stres koşullarında yaşamlarını sürdürebildiklerini ortaya koymaktadır.

Barrero-Gil vd. (2016)'nin yılında elde ettikleri modele göre, bitkiler, optimalin altındaki büyüme sıcaklıklarına maruz kaldıklarında hızlı bir şekilde sinyal mekanizmalarını devreye sokar. Bu süreç, bir dizi transkripsiyon faktörü ve hormonlar aracılığıyla gerçekleşir. Bu sinyalleme mekanizması, bitkilerde kapsamlı bir transkripsiyonel yeniden programlama başlatır. Bu yeniden programlama, metabolik ve fizyolojik süreçlerin soğuğa adaptasyon yönünde yeniden düzenlenmesine yol açar. Bu mekanizmalar arasında:

a) Komponent Bileşiklerin Birikimi: Soğuk stresine yanıt olarak bazı metabolik bileşikler birikir. Bu bileşikler, hücrelerin zarar görmesini önleyerek koruyucu bir rol üstlenir.

b) Antioksidan Sistemlerin Aktifleştirilmesi: Soğuk stresine maruz kalan bitkilerde oksidatif stresin etkilerini en aza indirmek için antioksidan sistemler devreye girer. Bu sistemler, reaktif oksijen türlerinin (ROS) birikimini engeller ve hücre zarlarının bütünlüğünü korur.

c) Fotosentetik Aktivitenin Yeniden Düzenlenmesi: Fotosentetik mekanizmalar, düşük sıcaklık koşullarında adaptasyon gösterecek şekilde yeniden yapılandırılır. Fotosistem II'nin zarar görmesini önlemek ve enerji dengesini sağlamak için bu süreç kritik önem taşır.

Bu metabolik ve fizyolojik ayarlamalar sonucunda, bitkiler soğuğa uyum sağlamayı başarır ve bu adaptasyon, artan soğuk toleransı olarak gözlemlenir. Bu süreçler, tolerant genotiplerin klorofil içeriğindeki toparlanmayı açıklamakta ve düşük sıcaklık koşullarında bu genotiplerin neden daha dirençli olduğunu göstermektedir. Özetle, hassas ve tolerant genotiplerin klorofil içeriği değişimleri, düşük sıcaklık stresine verdikleri fizyolojik tepkileri ve adaptasyon yeteneklerini yansıtan önemli bir parametre olarak değerlendirilmiştir. Barrero-Gil vd. (2016) modeline uygun olarak tolerant genotiplerde gözlemlenen toparlanma eğilimi, bu gruptaki bitkilerin düşük sıcaklık koşullarında adaptasyon mekanizmalarını başarılı bir şekilde devreye sokabildiğini kanıtlamaktadır.

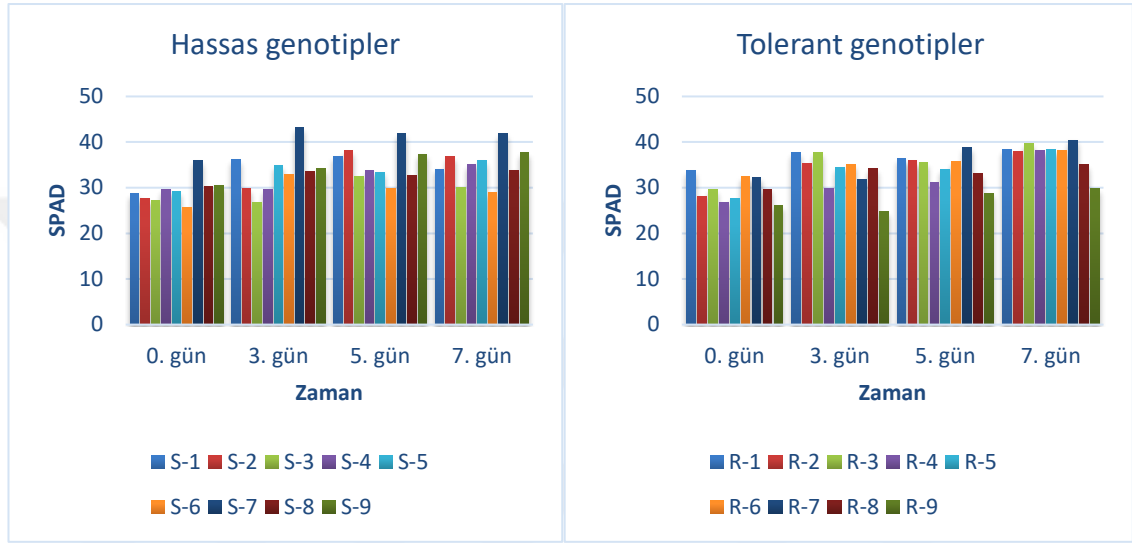
Çizelge 4.4. Dört farklı zamanda, 2 gruba ait bitkilerin SPAD 502 Plus cihazıyla yapılan klorofil ölçümleri

Genotip	0.Gün		3.Gün		5.Gün		7.Gün	
	K	U	K	U	K	U	K	U
S-1	33,17	28,72	44,54	36,22	43,14	36,84	46,58	34,10
S-2	40,25	27,60	47,12	29,84	43,42	38,20	42,98	36,78
S-3	40,25	27,15	39,12	24,34	42,38	32,38	43,44	30,12
S-4	37,50	29,63	40,62	29,62	38,66	33,78	39,02	34,98
S-5	39,68	29,15	37,08	34,88	37,18	33,42	35,14	35,88
S-6	40,05	25,62	36,44	32,86	35,92	29,80	40,72	28,92
S-7	40,95	35,97	45,44	43,26	43,12	41,95	43,48	41,82
S-8	42,82	30,32	43,56	33,54	42,00	32,76	39,64	33,88
S-9	39,87	30,57	39,10	34,23	39,22	37,38	40,34	37,76
R-1	37,95	33,77	37,44	37,63	36,56	36,42	46,54	38,42
R-2	41,90	28,08	37,38	35,36	40,40	35,94	42,88	37,96
R-3	38,48	29,65	35,60	37,63	40,56	33,52	39,84	39,72
R-4	35,13	26,75	35,70	29,73	37,14	31,04	34,44	38,20
R-5	36,20	27,67	40,54	34,43	40,60	34,04	38,60	38,42
R-6	38,65	32,57	45,08	35,15	38,56	35,66	40,96	38,10

Çizelge 4.4'ün devamı,

R-7	41,27	32,20	43,16	31,74	44,46	38,74	40,36	40,44
R-8	37,78	29,70	35,74	34,23	35,90	33,04	33,18	34,98
R-9	30,82	26,10	30,88	24,78	33,22	28,82	32,04	29,86

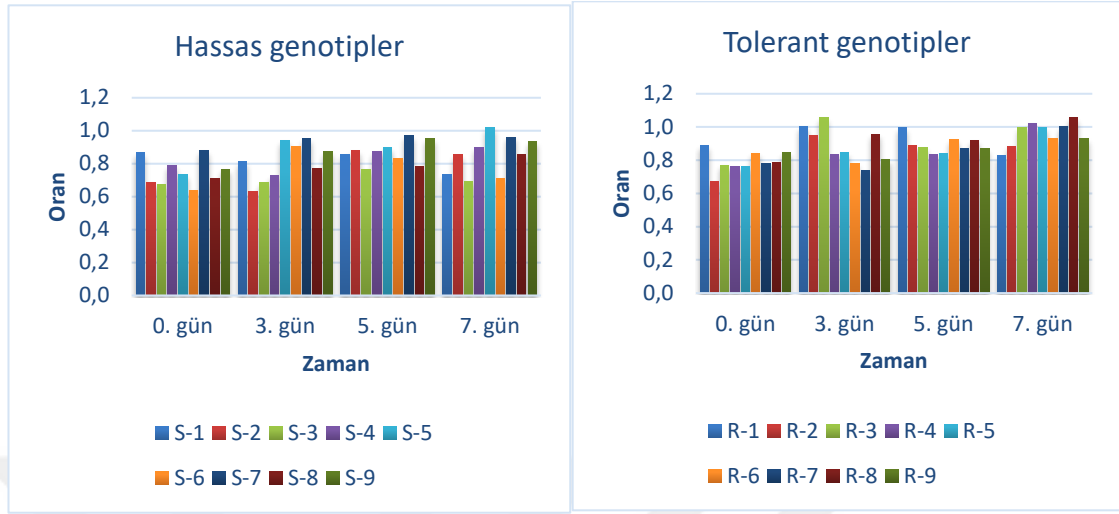
K: Kontrol; U: Uygulama (İklim odasında düşük sıcaklık uygulaması)



Şekil 4.6. Genotiplerin klorofil içeriğinin ölçüm günlerine göre değişim grafiği

Çizelge 4.5. Genotiplere ait SPAD 502 Plus ile klorofil ölçümleri sonucu indeks değerleri (uygulama/kontrol)

Hassas Genotip	0.gün	3.gün	5.gün	7.gün	Tolerant Genotip	0.gün	3.gün	5.gün	7.gün
S-1	0,87 ^a	0,81 ^b	0,85 ^{ab}	0,73 ^{de}	R-1	0,89 ^a	1,00 ^{ab}	1,00 ^a	0,83 ^b
S-2	0,69 ^b	0,63 ^d	0,88 ^{ab}	0,86 ^{bc}	R-2	0,67 ^b	0,95 ^{ab}	0,89 ^{ab}	0,89 ^{ab}
S-3	0,67 ^b	0,68 ^{cd}	0,76 ^b	0,69 ^e	R-3	0,77 ^{ab}	1,06 ^a	0,88 ^{ab}	1,00 ^{ab}
S-4	0,79 ^{ab}	0,73 ^{bc}	0,87 ^{ab}	0,90 ^{ac}	R-4	0,76 ^{ab}	0,83 ^b	0,84 ^b	1,02 ^{ab}
S-5	0,73 ^b	0,94 ^a	0,90 ^{ab}	1,02 ^a	R-5	0,76 ^{ab}	0,85 ^b	0,84 ^b	1,00 ^{ab}
S-6	0,64 ^b	0,90 ^a	0,83 ^{ab}	0,71 ^e	R-6	0,84 ^a	0,78 ^b	0,92 ^{ab}	0,93 ^{ab}
S-7	0,88 ^a	0,95 ^a	0,97 ^a	0,96 ^{ab}	R-7	0,78 ^{ab}	0,74 ^b	0,87 ^{ab}	1,00 ^{ab}
S-8	0,71 ^b	0,77 ^b	0,78 ^b	0,85 ^{cd}	R-8	0,79 ^{ab}	0,96 ^{ab}	0,92 ^{ab}	1,05 ^a
S-9	0,77 ^{ab}	0,88 ^a	0,95 ^a	0,94 ^{ac}	R-9	0,85 ^a	0,80 ^b	0,87 ^{ab}	0,93 ^{ab}
CV	6,26	6,37	6,51	7,09	CV	6,63	5,58	4,49	6,33



Şekil 4.7. Genotiplerin klorofil içeriğinin kontrol bitkilerine göre oransal değişim grafiği

Tolerant genotip grubunda (Şekil 4.7) başlangıçta klorofil içeriği yaklaşık 30-40 SPAD birim arasında olup, 3. günde çoğu genotipte hafif bir artış gözlenmiştir. 5. ve 7. günlerde ise klorofil içeriği genel olarak artış eğiliminde olup, 40 SPAD birime yakın bir seviyede istikrar kazanmıştır. Bu artış ve stabilite, tolerant genotiplerin stres koşullarında klorofil içeriğini koruma veya artırma yeteneğine sahip olduğunu göstermektedir.

Hassas genotip grubunda (Şekil 4.7), başlangıç klorofil seviyeleri 30-35 SPAD birim arasında değişmektedir. 3. günde, birkaç genotipte dikkat çekici bir artış gözlenmiş olsa da 5. gün itibarıyla bazı genotiplerde klorofil içeriğinde düşüş yaşanmıştır. 7. günde, klorofil seviyeleri genel olarak başlangıç seviyelerine dönmüş veya hafif bir düşüş göstermiştir. Bu eğilim, hassas genotiplerin stres koşullarına karşı daha az dirençli olduğunu ve klorofil içeriklerini koruma konusunda zorluk yaşadıklarını göstermektedir.

Klorofil içeriğinin düşük sıcaklık uygulaması sonrasındaki kontrol bitkilerine göre oranı incelendiğinde iklim odasından çıkarılır çıkarılmaz yapılan 0. Gün ölçümlerinde S-2 (0,69), S-3 (0,67) ve S-6 (0,64) genotiplerinin değerleri kontrol bitkilerine göre oranı arasında oldukça net farklar olduğu görülmüştür. S-2 (0,63) ve S-3 (0,68) genotiplerinin 3. günde en fazla farka sahip oldukları görülmüştür. Düşük sıcaklık uygulamasının devamındaki 7. günde S-2 genotipindeki oran 0,86 ile toparlama eğilimi gösterirken S-3 genotipinde 0,69 ile 3. gün ile 7. gün arasındaki değerler hemen hemen aynı kalmıştır.

Bu analiz, tolerant genotiplerin stres altında klorofil içeriklerini daha iyi muhafaza ettiğini veya artırdığını, hassas genotiplerin ise stres karşısında klorofil seviyelerinde düşüş yaşadığını göstermektedir. Bir çalışmada, domates bitkisinin yaprak gelişimi esnasında aynı seviyede devam eden bir üşüme stresinin yaprak klorofil içeriğinde

dramatik düşüşlere ve akabinde de fotosentez kapasitesinin giderek azalmasına neden olduğunu ortaya koymuşlar (Fracheboud ve Hadimann, 1994).

Klorofil değerlerindeki değişimi kontrol bitkileriyle kıyaslamak için yapılan hesaplama ait veriler Çizelge 10'da, grafik olarak da Şekil 16'da verilmiştir. Tolerant bitkilerde klorofil ölçümlerinde günler bazında soğuk uygulanan bitkilerin kontrol bitkilerine oranındaki değişimi kapanma eğilimindeyken hassas bitkilerin oranlarında özellikle S-1, S-2, S-3 ve S-6'da makasın açıldığı görülmüştür.

4.1.3. Lipid Peroksidasyon (MDA) analiz bulguları

Lipid peroksidasyon (MDA) analizi, bitkilerde hücrel stres seviyesinin değerlendirilmesinde önemli bir araçtır. Çalışmada, spektrofotometrik ölçüm sonuçları Okhawa vd. (1979)'nin geliştirdiği yöntem kullanılarak analiz edilmiştir. Bu yöntemde, spektrofotometrik ölçümle elde edilen değerler, kullanılan formül yardımıyla indeks değerlerine dönüştürülmüş ve bu değerler daha sonra tolerant ve hassas genotipler arasında istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. Analiz sonuçları, dayanıklılık ve hassasiyet açısından genotipler arasında belirgin farklar olduğunu göstermiştir.

Tolerant genotipler arasında R-3 (1,14), R-5 (1,12), R-6 (1,15), R-7 (1,21) ve kontrol genotipi R-9 (1,13) gibi indeks değerleriyle dikkat çeken genotipler ön plana çıkmıştır. Bu genotiplerin nispeten düşük indeks değerleri, hücrel zar bütünlüğünü daha iyi koruduklarını ve lipid peroksidasyon düzeylerinin daha düşük olduğunu göstermektedir. Buna karşılık, hassas genotipler negatif yönde S-6 (1,81), S-9 (1,68) ve S-8 (1,64) gibi daha yüksek indeks değerleri sergileyerek çevresel stres koşullarına karşı daha savunmasız olduklarını ortaya koymuştur. Bu bulgular, Çizelge 11'de sunulmaktadır.

Malondialdehit (MDA), hücrel zar lipidlerinin oksidatif bozulması sırasında oluşan bir yan ürün olup, hücrel zar bütünlüğünün önemli bir göstergesidir. Aynı zamanda bağlı elektrolit sızıntısı ile birlikte, bitkilerin çevresel streslere (örneğin soğuk veya kuraklık) toleransını ölçmek için yaygın olarak kullanılan analiz yöntemlerinden biridir. Çalışmada, hassas kontrol genotipi ile karşılaştırıldığında, tolerant genotiplerin MDA seviyelerinin anlamlı derecede daha düşük olduğu bulunmuştur. Bu durum, tolerant genotiplerin stres koşulları altında zar hasarını minimumda tuttuğunu ve oksidatif stresle daha etkili bir şekilde başa çıktığını göstermektedir. Ayrıca, bu genotiplerde prolin içeriği de hassas genotiplere göre düşük bulunmuş olup, bu bulgu Yu vd. (2018)'nin benzer bir çalışmadaki sonuçlarıyla uyum göstermektedir. Prolin, bitkilerde osmoregülasyon ve stres adaptasyonunda önemli bir rol oynamaktadır ve düşük düzeyleri, tolerant genotiplerin enerji metabolizmasında ve stres yönetiminde daha verimli olduklarını düşündürmektedir.

Bu çalışma, MDA analizinin ve ilişkili biyokimyasal parametrelerin bitki stres toleransının değerlendirilmesinde ne kadar kritik bir rol oynadığını bir kez daha vurgulamaktadır. Tolerant genotiplerin düşük MDA indeks değerleri, zar bütünlüğünün korunmasına yönelik daha iyi mekanizmalara sahip olduklarını ve bu özelliklerinin

tarımsal üretimde sürdürülebilirlik açısından önemli potansiyel taşıdığını göstermektedir. Tolerant genotipler içerisinde en iyi indeks puanlarını R-9 (kontrol) (1,13), R-5 (1,12), R-6 (1,15) ve R-3 (1,15) genotipleri alarak dikkat çekmiştir. Hassas genotipler içerisinde S-7 genotipi 1,20 indeks puanıyla diğerlerinden ayrılmıştır. Bu değer hücre zar bütünlüğünün büyük ölçüde korunmuş olduğunu gösterse de düşük sıcaklığa tolerans bakımından tek başına yeterli bir veri olarak değerlendirilmemiştir.

Çizelge 4.6. Genotiplerin lipid peroksidasyon (MDA) analiz bulguları sonucu indeks değerleri (uygulama/kontrol)

Grup	Genotip	MDA	Grup	Genotip	MDA
Tolerant	R-1	1,3200	Hassas	S-1	1,3077
	R-2	1,5491		S-2	1,5400
	R-3	1,1484		S-3	1,4188
	R-4	1,2475		S-4	1,5917
	R-5	1,1223		S-5	1,4492
	R-6	1,1500		S-6	1,8065
	R-7	1,2174		S-7	1,2070
	R-8	1,2411		S-8	1,6372
	R-9	1,1258		S-9	1,6792

4.1.4. Hidrojen Peroksit (H₂O₂) analiz bulguları

Çalışmamızda, MDA (Malondialdehit) analizi için yapılan ölçümlerde olduğu gibi, H₂O₂ analizi de spektrofotometrik yöntem kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu yöntem, düşük sıcaklık stresine maruz kalan bitki dokularında oluşan hidrojen peroksit düzeylerinin hassas ve güvenilir bir şekilde tespit edilmesine olanak sağlamaktadır. Ölçüm sonuçları, genotiplerin düşük sıcaklık stresine verdikleri tepkileri karşılaştırmalı olarak değerlendirme imkânı sunmuştur.

Analiz sonuçlarına göre, Çizelge 4.7’de belirtildiği üzere, tolerant genotiplerden özellikle R-9 kontrol (1,10), R-6 (1,16), R-7 (1,16), R-8 (1,17) ve R-5 (1,18) indeks değerleriyle ön plana çıkmıştır. Bu genotiplerin, düşük sıcaklık stresine karşı hidrojen peroksit birikimi açısından daha dirençli bir profil sergilediği gözlemlenmiştir. Öte yandan, hassas genotiplerde hidrojen peroksit birikiminin daha yüksek olduğu görülmüştür. Özellikle S-2 (1,74), S-6 (1,65) ve S-8 (1,65) genotiplerinin indeks değerleri, düşük sıcaklık stresine karşı daha duyarlı olduklarını ortaya koymaktadır.

Genotiplerin MDA ve H₂O₂ analiz sonuçları bir arada değerlendirildiğinde, genotiplerin düşük sıcaklığa verdikleri tepki bakımından benzer eğilimler gösterdiği

tespit edilmiştir. Bu bulgu, her iki analiz yönteminin de düşük sıcaklık stresine karşı genotiplerin tepkilerini belirlemede tutarlı ve tamamlayıcı veriler sunduğunu göstermektedir.

Düşük sıcaklık stresinin bitki fizyolojisi üzerindeki etkileri, literatürde geniş bir şekilde incelenmiştir. Özellikle kloroplastlarda elektron taşıma zincirinin bozulması, reaktif oksijen türlerinin (ROS) aşırı birikimine yol açan birincil mekanizma olarak tanımlanmıştır. Bu türler arasında hidrojen peroksit (H_2O_2), süperoksit anyon radikalleri (O_2^-) ve hidroksil radikalleri (OH) yer almaktadır. Literatürde Allen ve Ort (2001), Apel ve Hirt (2004) ve Wang vd. (2020)'nin tarafından da belirtildiği üzere, bu mekanizma düşük sıcaklık stresinin karakteristik bir sonucu olarak öne çıkmaktadır.

Çalışmamızda elde edilen H_2O_2 analiz bulguları, literatürde belirtilen bu mekanizmaları destekler niteliktedir. Tolerant genotiplerde daha düşük hidrojen peroksit birikimi, ROS temizleme mekanizmalarının daha etkili olduğunu, hassas genotiplerde ise bu mekanizmaların yetersiz kaldığını işaret etmektedir. Bu sonuçlar, düşük sıcaklık stresine karşı genetik dirençlilik ve fizyolojik tepkiler arasındaki ilişkiyi anlamak için önemli bir temel oluşturmaktadır. Sonuç olarak, H_2O_2 analizinden elde edilen veriler, düşük sıcaklık stresine karşı genotiplerin farklı tepkiler gösterdiğini açıkça ortaya koymuş ve tolerant genotiplerin bu stres koşullarına daha dayanıklı bir fizyolojik mekanizmaya sahip olduğunu göstermiştir. Bu tür analizler, genetik ıslah çalışmaları için değerli bilgiler sunarak düşük sıcaklık stresine dayanıklı yeni çeşitlerin geliştirilmesine katkı sağlamaktadır.

Çizelge 4.7. Genotiplerin Hidrojen peroksit (H_2O_2) analiz bulguları sonucu indeks değerleri (uygulama/kontrol)

Grup	Genotip	H_2O_2	Grup	Genotip	H_2O_2
Tolerant	R-1	1,2158	Hassas	S-1	1,4846
	R-2	1,2353		S-2	1,7372
	R-3	1,3672		S-3	1,3526
	R-4	1,2229		S-4	1,4266
	R-5	1,1880		S-5	1,3610
	R-6	1,1567		S-6	1,6518
	R-7	1,1654		S-7	1,3259
	R-8	1,1721		S-8	1,6498
	R-9	1,0954		S-9	1,4233

4.1.5. İndeks puanları ve tartılı derecelendirme analizi

Araştırmada ön değerlendirme sürecine dahil edilen toplam 18 genotip, dört farklı kriter açısından incelenmiştir. Bu kriterlere ilişkin tüm veriler toplandıktan sonra, analiz aşamasında bu verilerin temel bileşen analizi (PCA) yöntemiyle değerlendirilmesi gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda, dört farklı kriter doğrultusunda genotiplerin hem stres hassasiyeti hem de tolerans potansiyeli açısından sıralanması için tartılı derecelendirme yöntemi tercih edilmiştir. Bu yöntem, her bir kriterin genotip performansına olan katkısının ağırlığını göz önünde bulundurmayı sağlayarak daha güvenilir bir analiz sunmaktadır. Çizelge 4.8’de, bu yöntemle hesaplanan genotiplerin her bir kriter için elde ettiği indeks puanları sunulmuştur.

Bu analiz, kullanılan kriterlerin genotiplerin performanslarını belirlemede hangi dereceye kadar etkili olduğunu ortaya koyarken, kriterlerin önem derecelerine dayalı olarak göreceli puanların hesaplanmasını mümkün kılmıştır. Çizelge 4.9’de sunulan bu göreceli puanlar, kriterler arasındaki önem sırasını açık bir şekilde göstermiştir.

Elde edilen indeks puanları temel alınarak, genotiplerin sınıf aralıkları belirlenmiş ve bu sınıf aralıkları çerçevesinde her bir genotip için göreceli puanlar ve sınıf değerleri hesaplanmıştır. Bu aşamada, dört kriterden özellikle MDA (malondialdehit) analizi ve H₂O₂ (hidrojen peroksit) analizi sonuçlarının, genotiplerin stres tepkilerini anlamada daha belirleyici olduğu görülmüştür. Bu nedenle, bu iki kriterin indeks puanlarına dayalı ağırlıkları, diğer iki kriter olan SPAD502 cihazı ile klorofil ölçümü ve görsel değerlendirme sonuçlarına göre daha yüksek olacak şekilde ayarlanmıştır.

Bu durum, genotiplerin stres koşulları altındaki performanslarının daha doğru bir şekilde sınıflandırılmasını ve hassas ile tolerant olanların net bir şekilde ayrılmasını sağlamıştır. Böylece, kriterlerin ağırlıklarının dikkatli bir şekilde belirlenmesi ve buna uygun derecelendirme yapılması, genotiplerin genel performans değerlendirmesinde daha tutarlı ve objektif bir yaklaşım sunmuştur.

Çizelge 4.8. Tolerant ve hassas grupların indeks puanları

Grup	Genotip	MDA	H2O2	Görsel D.	Klorofil
Tolerant	R-1	1,32 ^b	1,22 ^{bc}	2,63 ^b	0,83 ^b
	R-2	1,55 ^a	1,24 ^b	2,13 ^{bc}	0,89 ^{ab}
	R-3	1,15 ^{de}	1,37 ^a	3,5 ^a	1,00 ^{ab}
	R-4	1,25 ^{ce}	1,22 ^{bc}	1,76 ^{cd}	1,02 ^{ab}
	R-5	1,12 ^e	1,19 ^{cd}	1,38 ^d	1,00 ^{ab}
	R-6	1,15 ^{de}	1,16 ^e	1,38 ^d	0,93 ^{ab}
	R-7	1,22 ^{cd}	1,17 ^{de}	1,25 ^d	1,00 ^{ab}
	R-8	1,24 ^c	1,17 ^{de}	2,00 ^{bc}	1,05 ^a
	R-9	1,13 ^e	1,10 ^f	1,63 ^{cd}	0,93 ^{ab}
	CV	3,9	1,5	16,1	6,3
Hassas	S-1	1,31 ^c	1,48 ^c	3,26 ^d	0,73 ^{de}
	S-2	1,54 ^{bc}	1,74 ^a	3,75 ^{bc}	0,86 ^{bc}

Çizelge 4.8'in devamı,

	S-3	1,42 ^c	1,35 ^{de}	4,00 ^b	0,69 ^e
	S-4	1,60 ^{bc}	1,43 ^{cd}	3,13 ^{cd}	0,90 ^{ac}
	S-5	1,45 ^c	1,36 ^c	3,63 ^{bd}	1,02 ^a
	S-6	1,81 ^a	1,65 ^b	4,50 ^a	0,71 ^c
	S-7	1,21 ^d	1,33 ^e	2,50 ^e	0,96 ^{ab}
	S-8	1,64 ^{ab}	1,65 ^b	3,13 ^d	0,85 ^{cd}
	S-9	1,68 ^{bc}	1,42 ^{cd}	3,50 ^{bd}	0,94 ^{ac}
	CV	6,4	2,8	8,7	7,1

Sınıf aralıklarına göre genotiplerin aldıkları sınıf değerlerinin, göreceli puanla çarpılmasıyla elde edilen tartılı derecelendirme puanları hesaplanarak genotiplerin puanlaması yapılmış ve Çizelge 14'de kriterlere göre göreceli puanlar, sınıf değerleri ve sınıf aralıkları detaylı olarak verilmiştir.

Çizelge 4.9. Tolerant ve hassas gruba göre göreceli puanları, sınıf değerleri ve aralıkları

Kriter	Göreceli Puan	Sınıf Değerleri	Sınıf Aralıkları	
			Tolerant	Hassas
MDA	35	10	1,1223 – 1,1650	1,2070 – 1,2650
		9	1,1651 – 1,2077	1,2671 – 1,3269
		8	1,2078 – 1,2504	1,3270 – 1,3869
		7	1,2505 – 1,2930	1,3870 – 1,4468
		6	1,2931 – 1,3357	1,4469 – 1,5067
		5	1,3358 – 1,3784	1,5068 – 1,5667
		4	1,3785 – 1,4211	1,5668 – 1,6266
		3	1,4212 – 1,4637	1,6267 – 1,6866
		2	1,4638 – 1,5064	1,6867 – 1,7465
		1	1,5065 – 1,5491	1,7466 – 1,8065
H2O2	30	10	1,0954 – 1,1226	1,3259 – 1,3671
		9	1,1227 – 1,1498	1,3672 – 1,4082
		8	1,1499 – 1,1769	1,4083 – 1,4493
		7	1,1770 – 1,2041	1,4494 – 1,4904
		6	1,2042 – 1,2313	1,4905 – 1,5316
		5	1,2314 – 1,2585	1,5317 – 1,5727
		4	1,2586 – 1,2856	1,5728 – 1,6138
		3	1,2857 – 1,3128	1,6139 – 1,6549

Çizelge 4.9'un devamı,

		2	1,3129 – 1,3400	1,6550 – 1,6961
		1	1,3401 – 1,3672	1,6962 – 1,7372
Klorofil (SPAD)	20	10	1,0500 – 1,0280	1,0200 – 0,9870
		9	1,0279 – 1,0060	0,9860 – 0,9540
		8	1,0059 – 0,9840	0,9530 – 0,9210
		7	0,9839 – 0,9620	0,9200 – 0,8880
		6	0,9619 – 0,9400	0,8870 – 0,8550
		5	0,9399 – 0,9180	0,8540 – 0,8220
		4	0,9179 – 0,8960	0,8210 – 0,7890
		3	0,8959 – 0,8740	0,7880 – 0,7560
		2	0,8739 – 0,8520	0,7550 – 0,7230
		1	0,8519 – 0,8300	0,7220 – 0,6900
Görsel D.	15	10	1,2500 – 1,4750	2,500 – 2,700
		9	1,4751 – 1,7000	2,701 – 2,900
		8	1,7001 – 1,9250	2,901 – 3,100
		7	1,9251 – 2,1250	3,101 – 3,300
		6	2,1251 – 2,3750	3,301 – 3,500
		5	2,3751 – 2,6000	3,501 – 3,700
		4	2,6001 – 2,8250	3,701 – 3,900
		3	2,8251 – 3,0500	3,901 – 4,100
		2	3,0501 – 3,2750	4,101 – 4,300
		1	3,2751 – 3,5000	4,301 – 4,500

Çalışmamızda, genotiplerin stres koşullarına karşı tolerans veya hassasiyet düzeylerini belirlemek amacıyla çeşitli ölçüm ve değerlendirme yöntemleri bir arada kullanılmıştır. Bu kapsamda, tolerant ve hassas genotip gruplarına göre genotiplerin göreceli puanları hesaplanmıştır. Bu hesaplamalarda, her genotipin Malondialdehit (MDA), Hidrojen Peroksit (H_2O_2) düzeyleri, SPAD502 Plus cihazıyla yapılan klorofil ölçümleri ve görsel değerlendirme kriterleri dikkate alınmıştır. Bu kriterlere göre her genotipin aldığı toplam puanlar Çizelge 4.10'da sunulmuştur.

Toplam puanlar üzerinden genotiplerin sıralaması yapılmış ve bu sıralama Çizelge 4.11'de gösterilmiştir. Tartılı derecelendirme analizi yöntemi kullanılarak yapılan bu değerlendirmelerde, tolerant ve hassas genotiplerin puanlama sistemleri, her grup kendi içinde ele alınacak şekilde düzenlenmiştir. Bu yöntem, gruplar arasında homojen bir değerlendirme sağlamak amacıyla uygulanmıştır ve genotiplerin stres koşullarına adaptasyon seviyelerinin daha net bir şekilde ortaya konulmasını sağlamıştır.

Elde edilen verilere göre tolerant genotipler arasında en yüksek puan alanlar, sırasıyla: R-9 şahit genotipi (890 puan), R-5 genotipi (895 puan), R-6 genotipi (875 puan), R-7 genotipi (870 puan) olarak belirlenmiştir. Bu genotipler, stres koşullarına karşı en dayanıklı olanlar olarak öne çıkmış ve diğer genotiplere kıyasla daha yüksek tolerans göstermiştir. Bu durum, bu genotiplerin özellikle kuraklık, tuzluluk ve benzeri çevresel stres faktörlerine karşı dirençli olabileceğini göstermektedir.

Hassas genotipler arasında ise en düşük puan alanlar; S-6 genotipi (130 puan), S-2 genotipi (325 puan), S-8 genotipi (330 puan) şeklinde belirlenmiştir. Bu genotipler, stres koşullarına karşı en savunmasız olanlar olarak belirlenmiştir. Özellikle düşük derecelendirme puanları, bu genotiplerin çevresel stres faktörlerine karşı duyarlılığının yüksek olduğunu ortaya koymaktadır.

Bu değerlendirme sonuçları, düşük sıcaklık stresi toleransı veya hassasiyeti açısından genotipler arasında belirgin farklılıklar olduğunu ve bu farklılıkların bitki ıslah programları için önemli bir bilgi kaynağı olduğunu göstermektedir. Bu çalışma, stres toleransı açısından umut vadeden genotiplerin belirlenmesi ve hassas genotiplerin yönetimi konusunda önemli bir referans noktası sunmakta ve gen ifade analizleri için kiritik bir önem taşımaktadır.

Çizelge 4.10. Tolerant ve Hassas genotiplerin kriterlere göre aldıkları puanlar

	Genotip	MDA	H ₂ O ₂	Klorofil	Görsel D.	Toplam Puan
Tolerant	R-1	150	150	15	140	455
	R-2	25	125	45	245	440
	R-3	250	25	120	35	430
	R-4	200	150	135	280	765
	R-5	250	175	120	350	895
	R-6	250	200	75	350	875
	R-7	200	200	120	350	870
	R-8	200	200	150	245	795
	R-9	250	250	75	315	890
Hassas	S-1	225	175	30	105	535
	S-2	150	25	90	60	325
	S-3	175	250	15	45	485
	S-4	125	200	105	105	535
	S-5	150	250	150	75	625
	S-6	25	75	15	15	130
	S-7	250	250	135	150	785
	S-8	75	75	75	105	330
	S-9	75	200	120	90	485

Çizelge 4.11. Tartılı derecelendirme toplam puanlarına göre tolerant ve hassas genotiplerin sıralanması

Tolerant		Hassas	
Genotip Sıralaması	Toplam Puan	Genotip Sıralaması	Toplam Puan
R-5	895	S-7	785
R-9	890	S-5	625
R-6	875	S-1	535
R-7	870	S-4	535
R-8R	795	S-3	485
R-4	765	S-9	485
R-1	455	S-8	330
R-2	440	S-2	325
R-3	430	S-6	130

Tartılı derecelendirme analizi sonucunda tolerant genotiplerden en yüksek puanı alan R-5 (895), R-6 (875), R-7 (870) ve kontrol R-9 (890) en tolerant genotipler olarak ikinci aşama için seçilmişlerdir. Hassas genotiplerden ise S-6 (130), S-2 (325) ve S-8 (330) puanlarına göre en hassas genotipler olarak çalışmanın ikinci aşaması için seçilmişlerdir.

4.2. Seçilen Genotiplerde Düşük Sıcaklık Uygulaması Sonrasına Ait Bulgular

4.2.1 Tohuma düşük sıcaklık uygulaması

Düşük sıcaklık koşullarında yapılan çimlenme denemelerinde, seçilen genotiplerin farklı sıcaklıklara verdikleri tepkiler değerlendirilmiştir. Çalışma kapsamında tohumlar, düşük sıcaklık toleranslarını belirlemek amacıyla 3°C, 13°C ve 25°C’de çimlendirme ortamına alınmış ve genotiplerin çimlenme performansları incelenmiştir.

Buna göre 3°C’de çimlendirme denemesine alınan tüm genotiplere ait tohumların çimlenme sayıları arasında S-2 genotipi (4,3) haricinde istatistiki olarak bir fark gözlenmemiştir. Diğer taraftan 13°C uygulamasında tolerant olarak değerlendirilen genotiplerin tamamı ile hassas olarak değerlendirilen genotipler arasında istatistiki olarak bir ayrım görülmüş, sadece hassas genotiplerden S-8 tolerant grupla aynı tepkiyi vermiştir. Son olarak 25°C uygulamasında ise tolerant ve hassas genotiplerin çimlenme sayıları arasındaki fark istatistiksel olarak net bir şekilde ayrılmıştır (Çizelge 4.12). Bununla birlikte 25 °C’de ki uygulamada çimlenme oranı ortalama %86 bulunmuştur. Nafees vd. (2019) yapmış oldukları çalışmada da 25 °C’nin üzerindeki sıcaklıklara çıkıldıkça domates tohumlarının çimlenme performanslarının arttığı belirtilmiştir.

Çizelge 4.12. Genotiplerin 3 farklı sıcaklık derecesinde, 50 tohum üzerinden çimlenme sayılarının ortalamalarının karşılaştırılması

<i>Genotipler</i>	<i>3°C</i>	<i>13°C</i>	<i>25°C</i>
S-2	4,3 ^{ab}	23 ^e	38 ^{cd}
S-6	0 ^b	7,4 ^f	35 ^{ce}
S-8	0 ^b	29,3 ^d	39 ^{bc}
R-5	0 ^b	18,6 ^e	48 ^a
R-6	0 ^b	30 ^{cd}	47 ^a
R-7	0,6 ^b	32,6 ^{bd}	46,6 ^a
R-9	0 ^b	34,6 ^{ad}	43,6 ^{ab}
<i>CV</i>	3,4	6,9	5,3

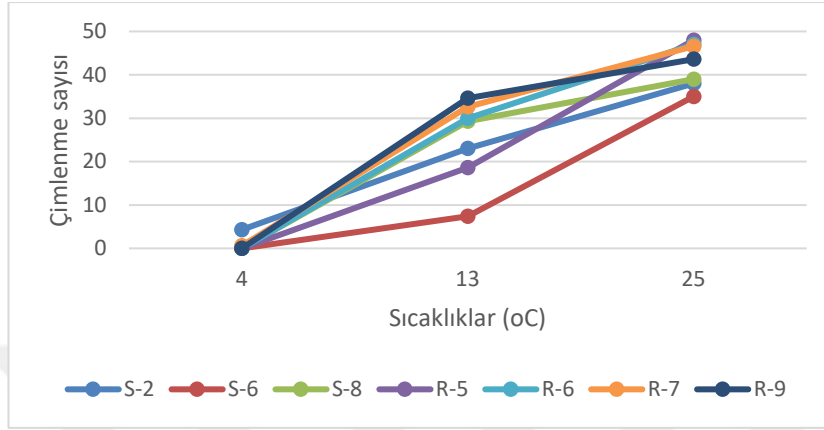
3°C Uygulaması: 3°C’de yapılan çimlenme denemelerinde, genotipler arasında belirgin bir istatistiksel fark gözlenmemiştir. Ancak bu durum, S-2 genotipi (4,3 ortalama çimlenme sayısı) için istisnai bir durum oluşturmuştur. S-2 genotipinin diğer genotiplere kıyasla düşük sıcaklıkta çimlenme açısından daha farklı bir davranış sergilediği belirlenmiştir. Bu durum, S-2’nin genetik yapısından kaynaklanan potansiyel bir özelliği ya da düşük sıcaklığa karşı sınırlı toleransını işaret edebilir.

13°C Uygulaması: 13°C’de yapılan denemelerde ise genotipler arasında daha belirgin ayrımlar gözlenmiştir. Tolerant olarak değerlendirilen genotipler ile hassas genotipler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur. İlginç bir şekilde, hassas genotiplerden biri olan S-8, tolerant gruptaki genotiplerle benzer bir çimlenme tepkisi göstermiştir. Bu durum, S-8’in düşük sıcaklıklara kısmi bir adaptasyon kapasitesine sahip olabileceğini göstermektedir.

25°C Uygulaması: Daha yüksek sıcaklıkta, 25°C’de yapılan çimlenme denemelerinde ise tolerant ve hassas genotipler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark ortaya çıkmıştır. Bu sıcaklık seviyesinde çimlenme oranları oldukça yükselmiş ve genel ortalama %86 olarak belirlenmiştir. Çimlenme performansındaki bu artış, sıcaklığın çimlenme sürecinde önemli bir parametre olduğunu göstermektedir. Özellikle domates tohumlarının optimal çimlenme sıcaklığına yaklaştığında, tüm genotiplerde çimlenme oranlarının arttığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.8).

Bu bulgular literatürle de uyumluluk göstermektedir. Örneğin, Nafees vd. (2019) tarafından yapılan bir çalışmada, 25°C ve üzerindeki sıcaklık koşullarında domates tohumlarının çimlenme performanslarının kayda değer şekilde arttığı ifade edilmiştir. Bunun nedeninin, yüksek sıcaklıklarda enzimatik aktivitelerin hızlanması ve metabolik süreçlerin daha etkin bir şekilde gerçekleşmesi olduğu düşünülmektedir. Farklı sıcaklık uygulamaları sonucunda genotiplerin çimlenme performansları arasında belirgin farklar olduğu ve bu farkların sıcaklık seviyesine bağlı olarak daha net bir şekilde ortaya çıktığı görülmüştür. Özellikle 25°C uygulaması, genotipler arasındaki tolerans farklarını açıkça

ortaya koymuştur. Bu bulgular, düşük sıcaklık toleransı üzerine yapılacak ıslah çalışmaları için önemli bir temel oluşturabileceğini ortaya koymaktadır.



Şekil 4.8. Tohuma düşük sıcaklık uygulaması sonrası çimlenme durumları

4.2.2. Düşük sıcaklığın çiçeklenme ve meyve üzerine etkilerine ait bulgular

Çiçeklenme döneminde bitkilerin olağan dışı düşük sıcaklığa maruz bırakılmasının meyve tutumunu sekteye uğrattığı ve nihayetinde ürün verimini olumsuz etkilediği bildirilmiştir (Adams vd. 2001; Hedhly 2011). İkinci çiçek salkımlarına düşük sıcaklık uygulaması sonrasında 3. çiçek salkımlarındaki tutan meyvelerin oranı hesaplanmış, meyvede şekil bozukluğu gözlemi salkımdaki toplam meyve sayısına oranı alınarak yapılmıştır. Bitki başına salkımdaki meyve ve tohum sayısı alınmıştır. Salkımda kaç meyvede kaç tohum bağladığı da sayılmış ve istatistiki olarak tüm değerler analiz edilmiş, varyans kaynakları Çizelge 4.13'te verilmiştir.

Çiçeklenme döneminde bitkilerin düşük sıcaklıklara maruz kalması, bitki fizyolojisi ve üreme süreçleri üzerinde önemli olumsuz etkiler yaratabilmektedir. Literatürde, olağan dışı düşük sıcaklıkların çiçeklenme sürecini yavaşlattığı, meyve tutumunu azalttığı ve nihayetinde ürün veriminde ciddi düşüslere neden olduğu bildirilmektedir (Adams vd., 2001; Hedhly, 2011). Bu olumsuz etkiler, özellikle tozlanma ve döllenme süreçlerinin hassas olduğu dönemde, bitkilerin çevresel stres faktörlerine karşı duyarlılığını artırmaktadır.

Araştırma kapsamında, bitkilerin ikinci çiçek salkımlarına düşük sıcaklık uygulaması gerçekleştirilmiş ve bu uygulamanın üçüncü çiçek salkımlarındaki meyve tutum oranına etkisi incelenmiştir. Meyve tutum oranının hesaplanması sırasında, tutan meyve sayısının toplam çiçek sayısına oranı alınarak değerlendirilmiştir. Bunun yanı sıra, meyvelerde meydana gelen şekil bozuklukları da dikkate alınmış ve şekil bozukluğu olan meyvelerin oranı salkımdaki toplam meyve sayısına göre hesaplanmıştır. Bitki başına

düşen çiçek salkımlarındaki toplam meyve sayısı ve bu meyvelerde oluşan tohum sayıları kayıt altına alınmıştır. Ayrıca her bir salkımda, kaç meyvede kaç tohum bağlandığı tek tek sayılarak veriler istatistiksel analizlere tabi tutulmuştur. Bu analizler sonucunda elde edilen varyans kaynakları, Çizelge 4.13'te ayrıntılı olarak sunulmuştur.

Düşük sıcaklık uygulaması sonucunda, çiçek salkımlarındaki meyve tutum oranında genel bir düşüş gözlenmiştir. Tutan meyve sayılarının açan çiçek sayılarına oranları (TMS/AÇS) incelendiğinde S-2 genotipinde bu oran 0,62, S-6'da 0,36 ve S-8'de 0,69 olmuştur. Tolerant olan R-5'te 74, R-6'da 0,66 ve R-7'de bu oran 0,70 olarak hesaplanmıştır. Ayrıca tutan meyvelerin bir kısmında meyve şekil bozuklukları (MŞB) görülmüş, bu durum meyve kalitesinde kayda değer bir azalmanın göstergesi olmuştur (Şekil 4.9 ve Şekil 4.10). Çizelge 4.13'de görüldüğü gibi tolerant genotiplerde MŞB değerleri sıfır olarak kaydedilirken hassas genotiplerden oranlar S-2'de 0,13, S-6'da 0,75 ve S-8'de ise 0,00 olarak hesaplanmıştır. Şekil bozukluklarının, düşük sıcaklığın tozlanma sırasında çiçek organlarında neden olduğu stresle ilişkili olduğu düşünülmektedir. Özellikle erkek organların düşük sıcaklığa daha duyarlı olduğu, bu durumun polen canlılığını ve tozlanma etkinliğini azalttığı bilinmektedir (Çömlekçioğlu ve Şimşek 2014).

Tohum bağlama oranında da düşük sıcaklıkların etkisi açıkça görülmüştür. Hassas genotiplerden Tohum sayısının tutan meyve sayısına oranı (TS/TMS) değerlerine bakıldığında tolerant genotiplerin tamamı istatistiki olarak aynı grupta yer alarak ön plana çıkmıştır. Hassas genotiplerden S-6 da istatistiki olarak a grubunda yer almış fakat tutan meyve sayısının açan çiçek sayısı oranı (TMS/AÇS) değerlendirmesine bakıldığında tüm gruptan eksi yönde ayrılmıştır. Bu durum S-6 genotipinin genetik olarak tohum bağlama özelliğinin diğer genotiplerden daha üstün olduğunu ve bunun düşük sıcaklıktan olumsuz etkilenmediğini göstermektedir. Salkımlarda bulunan meyve sayısı ile bu meyvelerdeki tohum sayıları arasındaki ilişki analiz edilmiştir. Bulgular, düşük sıcaklık stresinin kullandığımız genotipler arasında Meyve şekil bozukluğu (MŞB) bakımından istatistiki olarak önemli derecede etki yapmadığını ortaya koymuştur.

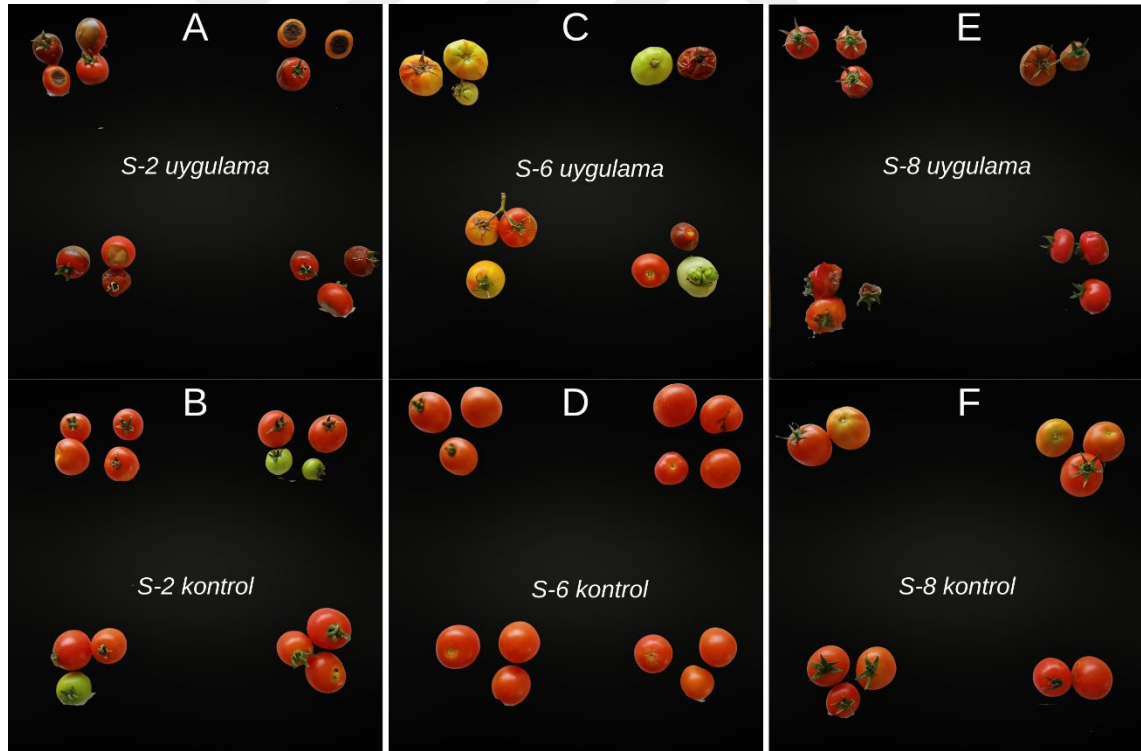
Meyvenin iriliği ile ilgili değerlendirmelerde düşük sıcaklık uygulamasının etkileri hassas ve tolerant tüm genotiplerde etkisini göstermiştir. Fakat R-6 genotipi tolerant grupta olmasına rağmen meyve iriliği bakımından en fazla etkilenen genotip olmuştur. Düşük sıcaklık, domatesin hücre zarlarını ve protein yapılarını etkilemektedir. Bu stres yanıtında, bitki antioksidanlar, osmoregülasyon ve soğuğa dayanıklı proteinler üretir. Bu da bitkinin soğuk şartlar altında hayatta kalmasını sağlar. Fotosentez verimliliği düşük sıcaklıkların etkisiyle yavaşlar, bu da bitkinin büyüme hızını etkiler. Fotosentez verimliliği azalırsa, meyve büyümesi de olumsuz etkilenebilir. Birçok araştırma sonuçları, düşük sıcaklık stresinin domates bitkilerinde çiçeklenme ve meyve gelişimi üzerinde önemli olumsuz etkiler yarattığını ortaya koymaktadır (Barten vd. 1992; Adams vd. 2001; Li-yun vd. 2017).

Çizelge 4.13. Seçilen genotiplerin çiçek ve meyve gözlemlerine ait uygulama/ kontrol ortalamalarının karşılaştırılması

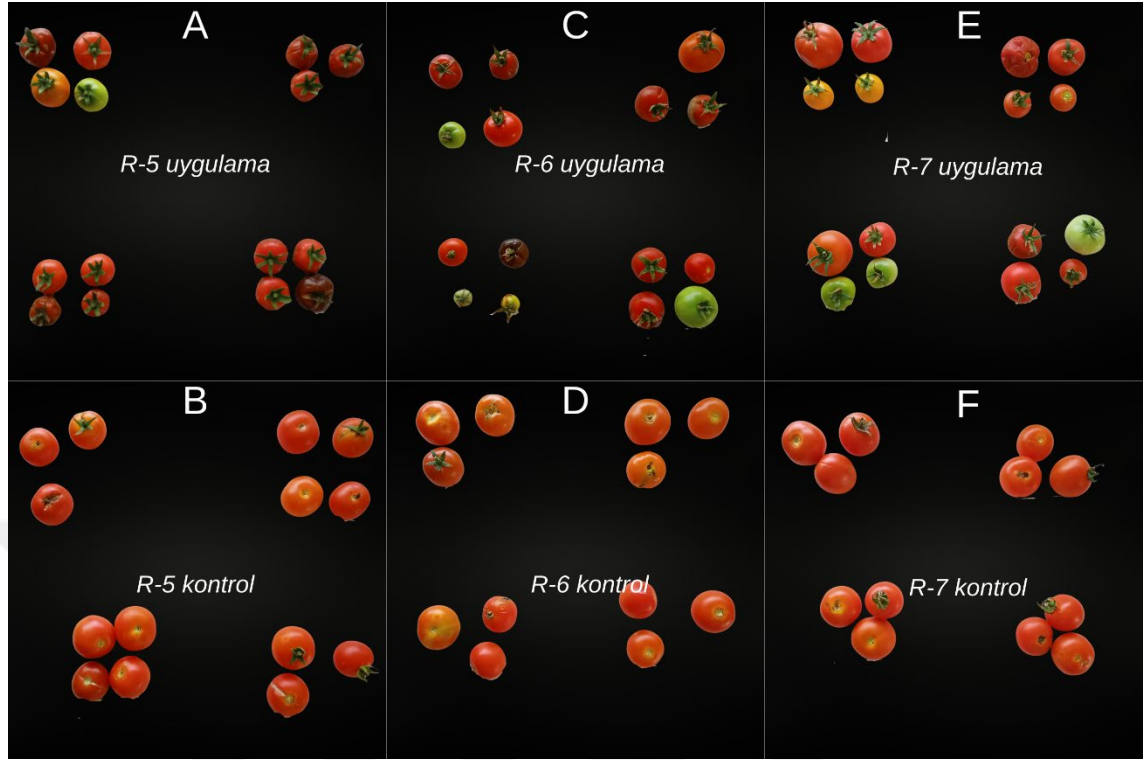
Genotip	TMS/AÇS	TS/TMS	ÇBC	MŞB	ME	MB	MA
S-2	0,62 ^a	0,90 ^b	1,75 ^{bc}	0,13	0,82 ^c	0,71 ^{cd}	0,45 ^d
S-6	0,36 ^b	0,97 ^b	0,63 ^c	0,75	0,99 ^b	1,16 ^{bc}	0,88 ^c
S-8	0,69 ^a	0,82 ^c	3,13 ^a	0,00	0,97 ^b	0,86 ^{bd}	0,95 ^c
R-5	0,74 ^a	0,99 ^a	2,13 ^{ab}	0,00	1,51 ^a	1,67 ^a	1,58 ^a
R-6	0,66 ^a	0,97 ^b	1,38 ^{bc}	0,00	0,69 ^c	0,71 ^d	0,40 ^{cd}
R-7	0,70 ^a	0,90 ^{bc}	1,25 ^{bc}	0,00	1,10 ^b	1,22 ^b	1,54 ^a
CV	23	9,2	26	Ö.D.	9,8	13,9	14,4

TMS/AÇS: Tutan meyve sayısının açan çiçek sayısına oranı; TS/TMS: Tohum sayısının tutan meyve sayısına oranı; ÇBC: Çiçek burnu çürüklüğü; MŞB: Meyve şekil bozukluğu; ME: Meyve eni; MB: Meyve boyu; MA: Meyve ağırlığı

*Sütunlarda farklı harflere sahip olan uygulamalar $p<0,005$ önem seviyesinde farklıdır.



Şekil 4.9. Hassas genotiplerin çiçeklenme dönemindeki düşük sıcaklık uygulaması sonrası meyve görüntüleri. A: S-2 uygulama, B: S-2 kontrol, C: S-6 uygulama, D: S-6 kontrol, E: S-8 uygulama, F: S-8 kontrol



Şekil 4.10. Tolerant genotiplerin çiçeklenme dönemindeki düşük sıcaklık uygulaması sonrası meyve görüntüleri. A: R-5 uygulama, B: R-5 kontrol, C: R-6 uygulama, D: R-6 kontrol, E: R-7 uygulama, F: R-7 kontrol

4.3. RNA Kalitesine Dair Bulgular

RNA izolasyonu sonrasında RNA örneklerine DNaz işlemi uygulanmış ve bu işlem ile DNA kontaminasyonunun ortadan kaldırılması hedeflenmiştir. Bu işlem sonrasında, örneklerin optik yoğunluk (OD) değerleri ile A260/280 oranları ölçülmüştür. Ölçüm sonuçları, Çizelge 4.14 ve Çizelge 4.15'te sunulmuştur.

RNA ve DNA saflığını değerlendirmede yaygın olarak kullanılan A260/280 oranı, numunelerin saflık durumunu anlamak açısından önemli bir göstergedir. Genel olarak, saf DNA'nın A260/280 oranının yaklaşık 1,8 olması, saf RNA'nın ise yaklaşık 2,0 değerine sahip olması beklenir. Eğer A260/280 oranı 1,8'in üzerinde ise RNA kontaminasyonu olduğu; 260/230 oranı 1,8'in altında ise protein kontaminasyonu bulunduğu anlamına gelir (Yegül ve Baloğlu, 2020). Bu nedenle, analiz sırasında bu oranların dikkatlice değerlendirilmesi, RNA kalitesinin güvenilir şekilde ölçülebilmesi için kritik öneme sahiptir.

Ayrıca, DNaz işlemi sonrasında elde edilen ürünlerin yapısal bütünlüklerinin doğrulanabilmesi için agaroz jel elektroforezi yöntemi kullanılmıştır. Jel elektroforez analizi, RNA'nın bozulmamış olup olmadığını ve kontaminasyon içerip içermediğini

görsel olarak değerlendirmek için etkili bir yöntemdir. Analiz sonuçlarına ait jel görüntüleri Şekil 4.11'de sunulmuştur. Bu görüntüler, DNaz işleminin etkinliğini ve RNA'nın saflığını görsel olarak doğrulamak açısından önem taşımaktadır. Alınan bu sonuçlar, RNA izolasyonunda kullanılan yöntemin güvenilirliğini desteklemekte ve elde edilen RNA'nın hem saflık hem de bütünlük açısından yüksek kaliteye sahip olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.14. Hassas genotiplerin RNA izolasyonu sonrası ölçülen OD değerleri

	Uygulama	OD (ng/μL)		A260/A280	
		Yaprak	Çiçek	Yaprak	Çiçek
S-2	0	71,20	-	1,9	-
		54,40	-	1,89	-
		64,00	448,00	1,92	1,91
	1	60,40	335,20	1,9	1,94
		292,00	442,40	1,95	1,99
		230,40	263,20	1,98	2,03
	12	195,20	48,00	1,91	2,05
		96,00	428,00	1,99	1,98
		132,00	336,80	1,94	1,96
	48	47,60	320,80	1,94	2,02
		54,40	494,40	2,02	1,98
		108,00	471,20	1,98	1,94
S-6	0	68,80	298,4	1,97	1,92
		57,20	-	1,94	-
		88,80	189,60	1,95	1,91
	1	132,80	448,00	1,92	1,9
		88,80	210,40	1,88	1,9
		161,60	425,60	1,94	1,92
	12	120,80	-	1,92	-
		50,80	423,20	1,97	1,94
		352,80	219,20	1,97	2,01
	48	357,60	161,60	1,94	2,01
		175,20	268,00	1,91	1,9
		364,80	461,60	1,9	1,9
S-8	0	378,80	413,60	1,94	2
		312,60	-	2	-
		60,40	350,40	1,94	1,99
	1	247,20	276,80	1,9	1,91
		78,80	408,80	1,92	1,96
		296,00	465,60	1,95	1,97
	12	-	86,40	-	1,9
		306,40	205,60	1,94	1,92
		167,20	413,60	1,92	1,91
	48	333,60	356,80	1,9	1,97

Çizelge 4.14'ün devamı,

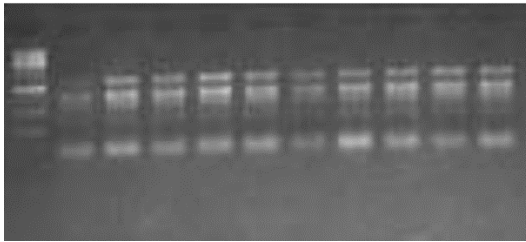
		313,60	109,60	1,97	2,02
		141,60	410,40	1,95	2,03

Çizelge 4.15. Tolerant genotiplerin RNA izolasyonu sonrası ölçülen OD değerleri

	Uygulama	OD (ng/μL)		Yaprak	Çiçek
		Yaprak	Çiçek		
R-5	0	198,40	394,40	1,9	2
		220,00	414,40	1,91	1,96
		-	430,40	-	2,01
	1.Saat	133,60	410,40	2,02	1,99
		79,60	222,40	1,95	1,9
		-	399,20	-	1,9
	12.Saat	-	447,20	-	2,05
		40,00	329,60	1,95	1,91
		236,00	249,60	1,92	1,9
	48.Saat	431,20	442,40	1,88	1,9
		323,20	246,40	1,94	1,92
		140,80	312,80	1,92	1,89
R-6	0	100,80	312,00	1,9	1,92
		313,60	143,20	1,99	2,06
		372,80	321,60	1,9	2,01
	1	59,60	253,60	1,91	1,92
		227,20	424,80	1,97	1,99
		241,60	219,20	1,94	2,03
	12	311,20	427,20	1,9	1,98
		365,60	148,00	1,99	1,99
		41,20	131,20	1,91	2
	48	475,20	367,20	2	1,91
		374,40	-	1,9	
		44,60	349,60	1,97	1,9
R-7	0	167,20	497,60	1,94	-
		272,80	-	1,95	-
		81,60	476,20	1,92	1,92
	1	339,20	312,00	1,89	1,91
		73,60	454,40	1,94	1,92
		244,80	109,60	1,92	1,99
	12	64,40	52,80	1,9	1,91
		244,00	493,60	1,91	2,04
		228,80	407,20	1,94	2,01
	48	351,20	-	1,95	-
		295,20	379,20	1,94	1,99

Çizelge 4.15'in devamı,

		73,60	271,20	1,89	2,07
R-9	0	179,20	226,40	1,94	1,92
		224,00	-	1,9	-
		70,40	-	1,89	-
	1	392,00	172,00	1,94	1,92
		88,80	-	1,92	
		302,40	165,60	1,92	1,92
	12	396,00	152,80	1,91	2,01
		254,40	78,40	1,99	2,05
		340,00	-	1,94	-
	48	35,60	143,20	1,89	1,97
		-	217,60	-	2
		76,80	344,00	2,04	1,89



Şekil 4.11. DNaz uygulaması sonrası yaprak dokularına ait RNA'ların jel görüntüleri

4.4. qPCR Optimizasyon Çalışmaları

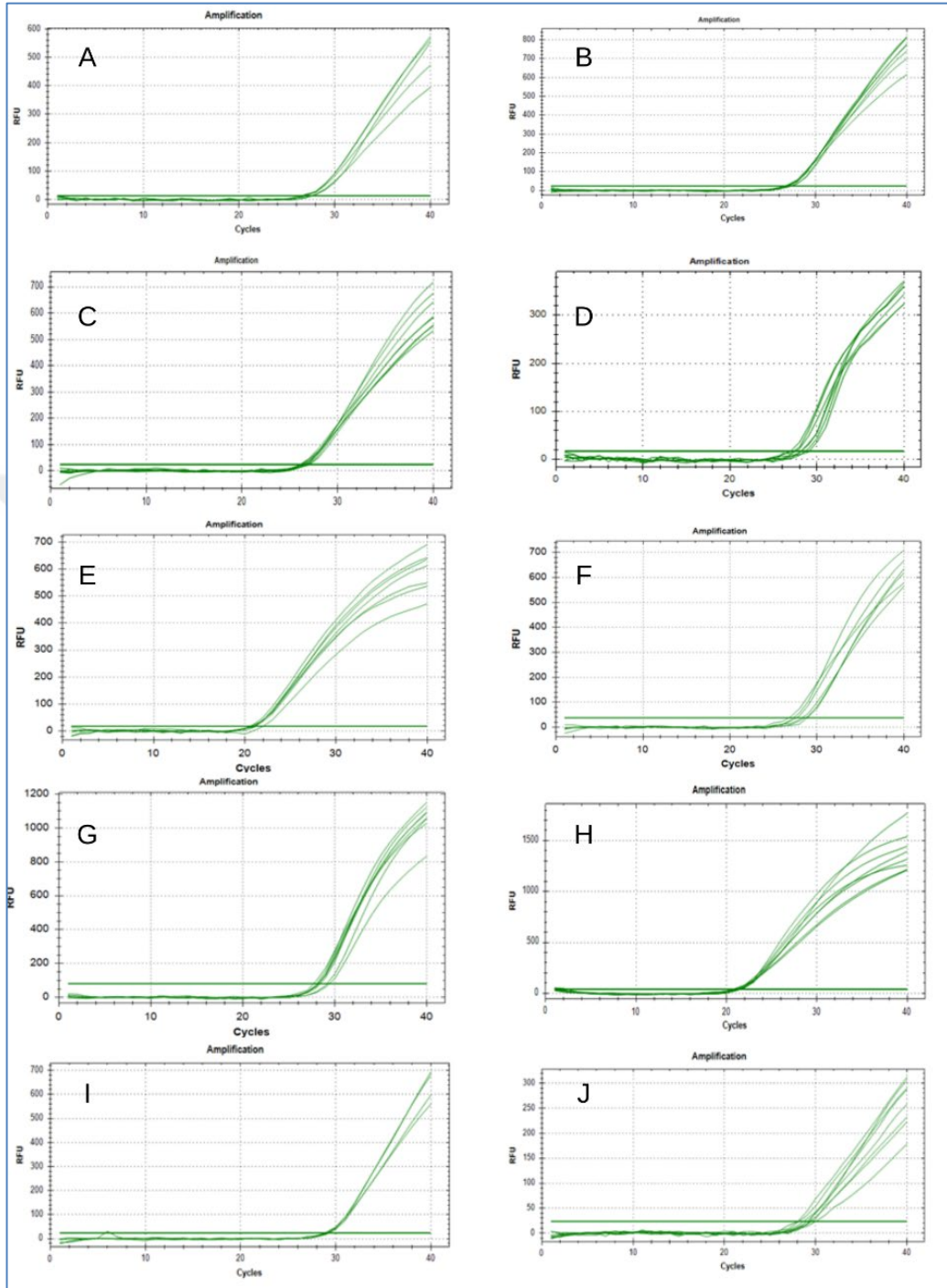
4.4.1. Primer Bağlanma Sıcaklıklarının Optimizasyonu

Tüm genler için ayrı ayrı kurulan gradient qPCR denemelerinde, farklı sıcaklıklarda primerlerin etkinliği dikkatlice incelenmiştir. Bu analizlerin amacı, kullanılan primerlerin amplifikasyon süreçlerinde optimal performans gösterdiği sıcaklık aralıklarını belirlemektir. Yapılan gradient qPCR çalışmaları sırasında, belirlenen sıcaklıklarda her bir genin primerinin uygun şekilde çalışıp çalışmadığı gözlemlenmiştir. Bu çalışmanın sonucunda, yeterli amplifikasyon göstermeyen bazı genlere ait primerler elenmiştir. Bu kapsamda *LebZIP2*, *C₂H₂ Zing finger protein*, *LeCOR413PM2* ve *SIREC2* genlerine ait primerler beklenen düzeyde amplifikasyon sağlamadığı için çalışma dışı bırakılmıştır. Geriye kalan 9 gene ait primerler ile çalışmalara devam edilmiştir.

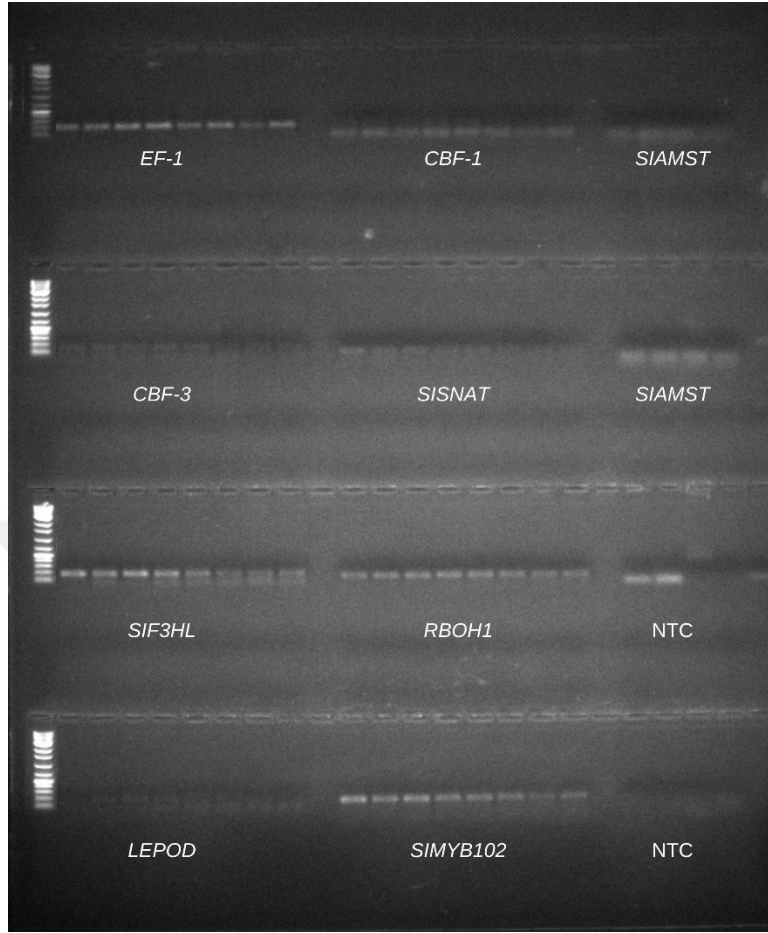
Optimizasyon çalışmaları sırasında, *CBF-1*, *CBF-3* ve *LePOD* genlerinin primerlerinin optimum bağlanma sıcaklığının 49°C olduğu belirlenmiştir. Diğer yandan, *RBOH1*, *SIMYB102*, *LeLTP1*, *SISNAT* ve *SIAMST* genlerine ait primerlerin optimum bağlanma sıcaklığı ise 58°C olarak tespit edilmiştir. Ayrıca, referans gen primerleri

değerlendirilirken, *EF-1* primerlerinin, farklı sıcaklıklarda yapılan analizlerde *Actin* primerine kıyasla daha iyi amplifikasyon sağladığı gözlemlenmiştir. Bu nedenle, deneylerde referans primer olarak *EF-1* kullanılmıştır (Şekil 4.12).

Gradient qPCR çalışmaları sonrasında, elde edilen amplifikasyonların spesifikliği ve doğruluğunu değerlendirmek amacıyla agaroz jel elektroforezi kullanılarak bant görüntüleri incelenmiştir. Bu analizlerde, tüm primerlerin amplifikasyon ürünleri dikkatlice değerlendirilmiş ve istenmeyen amplifikasyonlar ile olası non-spesifik ürünlerin varlığı kontrol edilmiştir. Görüntü analizleri sonucunda, yalnızca *SIF3HL* genine ait primerlerin amplifikasyon ürünlerinde ekstra bantlar tespit edilmiştir. Bu durum, primerin istenmeyen amplifikasyonlara yol açtığını ve belirli sıcaklıklarda spesifik çalışmadığını göstermektedir. Yapılan detaylı incelemeler ve qPCR analizlerinden elde edilen Cq değerleri dikkate alınarak, *SIF3HL* primeri için en temiz bantların gözlemlendiği bağlanma sıcaklığı 58°C olarak belirlenmiştir (Şekil 4.13).



şekil 4.12. Belirli sıcaklık aralığında (49-60°C) primerlere ait amplifikasyon grafikleri. A: *Actin*, B: *EF-1*, C: *CBF-1*, D: *CBF-3*, E: *SISNAT*, F: *SIAMST*, G: *LePOD*, H: *SIMYB102* I: *SIF3HL*, J: *RBOH1*

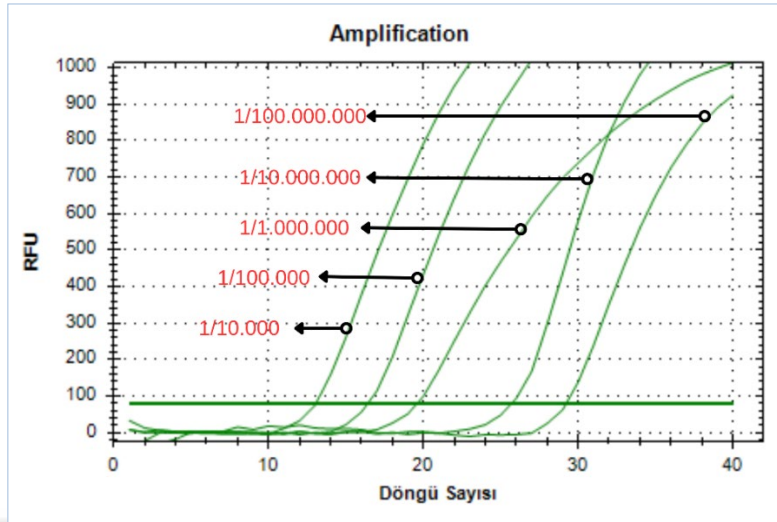


Şekil 4.13. Gradient PCR ürünlerine ait agaroz görüntüleri

4.4.2. Standartların oluşturulması

Standartlar grafiği incelendiğinde, ürün yoğunluğunun artmasıyla birlikte Cq (döngü sayısı) değerinin azaldığı gözlemlenmiştir. Bu durum, Cq değerinin düşük olmasının, ilgili genlerin ifade düzeylerinin yüksek olduğu anlamına geldiğini ortaya koymaktadır. Diğer bir deyişle, bir genin ifade düzeyi arttıkça, onun tespit edilmesi için gereken döngü sayısı azalmakta, bu da genin daha erken bir döngüde amplifiye edildiğini göstermektedir.

Örneğin, Şekil 4.14'te *LePOD* genine ait standartlar grafiği incelendiğinde, ürün yoğunluğu ile Cq değeri arasındaki ters ilişki açıkça görülebilmektedir. Bu grafik, hem kullanılan primerlerin etkinliğini hem de deneyin doğruluğunu doğrulayan önemli bir kanıt niteliğindedir. Standart eğrinin doğrusal bir ilişki göstermesi, primerlerin optimize edilmiş koşullarda çalıştığının bir göstergesidir. Sonuç olarak, bu analizler ışığında primerlerin ideal bir şekilde çalıştığına kanaat getirilmiş ve böylelikle örneklerin analizine güvenle başlanmıştır.



Şekil 4.14. *LePOD* geni için hazırlanmış standartlara ait Cq değerlerini gösteren grafik

4.5. Genlerin İfade Düzeyleri

Yüksek bitkilerde düşük sıcaklık, çevresel stres faktörlerinden biri olarak bitki büyüme ve gelişmesini olumsuz etkileyebilen bir faktördür. Düşük sıcaklık, özellikle don olaylarının görüldüğü bölgelerde, bitkilerin verimini ve sağlığını tehdit eden önemli bir çevresel stres kaynağıdır. Bu bağlamda, bitkiler bu tür stres koşullarına karşı genetik ve biyokimyasal tepkiler gösterirler. Düşük sıcaklık, hücredeki metabolik süreçleri, enzim aktivitesini ve hücre zarlarının yapısını etkileyerek hücre içi dengeyi bozabilir. Bu tür stresler bitkilerde, gen ekspresyonunda belirli değişikliklere yol açarak, bitkilerin soğuğa dayanıklılık geliştirmelerine yardımcı olabilir. Özellikle, düşük sıcaklığa maruz kalan bitkilerde çeşitli genlerin ifade düzeylerinde önemli değişiklikler gözlemlenmiştir. Knight ve Knight (2012) tarafından yapılan araştırmalar, bitkilerde düşük sıcaklığa maruz kalma süresine bağlı olarak bu genlerin ifade düzeylerinin değişebileceğini ve bunun bitkilerin soğuk stresiyle başa çıkma mekanizmaları üzerinde etkili olduğunu ortaya koymuştur. Bu bağlamda, düşük sıcaklık stresi sırasında belirli genlerin aktive olması, soğuğa karşı tolerans gelişmesini sağlayan biyolojik süreçleri başlatabilir. Örneğin, soğuk şok proteinleri (CSP), antioksidan enzimleri ve osmoregülasyonla ilgili genler bu süreçte önemli rol oynayan genlerden bazılarıdır.

4.5.1. Yaprak dokularında genlerin ifade düzeyleri

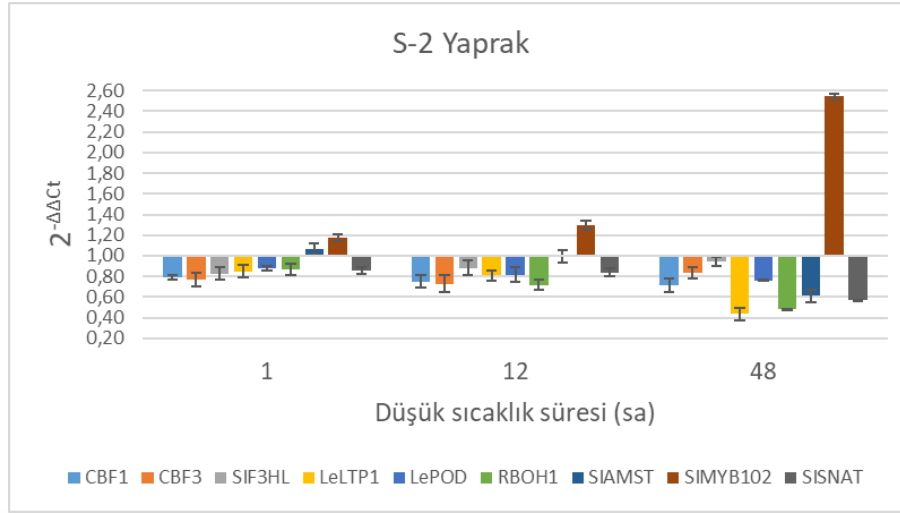
Domatesin de içinde olduğu birçok bitki düşük sıcaklığa maruz kaldığında bir adaptasyon oluşturmak için bu şartlara cevap olarak bir tolerans geliştirir. Bu mekanizma derinlemesine incelendiğinde altta yatanın “CBF cold response patway” olarak adlandırılan bir yolağı içerdiği görülmüştür. Bu yolağın temel aktörleri arasında *CBF1*, *CBF2* ve *CBF3* genlerinin olduğu ve bunların soğuğa cevap olarak hızlı bir şekilde ifade edildikleri ve böylece toleransı artırdıkları bildirilmiştir (Zhang vd. 2004). *CBF1* ve

CBF3 genlerinin hassas ve tolerant genotiplere göre ifade düzeylerinin değiştiği Çizelge 4.16- 4.23'lerden anlaşılmaktadır. Hassas olarak değerlendirilen genotiplerden S-2'de; *CBF1* geninin 48 saatte 0,71 kat ifade düzeyi düşmüş iken tolerant genotiplerden R-5'te ifade seviyesinin 1,16 kata kadar arttığı görülmüştür. Aynı zamanda düşük sıcaklığa maruz kalma süresi bakımından hassas ve tolerant genotipler arasında ifade düzeyi bakımından fark olduğu net bir şekilde görülmüştür. Örneğin *CBF3* geninin, S-6 genotipinde uygulamanın 48 saatinde ifade düzeyi 0,73 (Çizelge 4.17) oranında düşmüşken, R-6 genotipinde uygulamanın 12 saatinde 1,21 (Çizelge 4.20) kat arttığı görülmüştür. Genlerin ifade düzeylerine genel olarak bakıldığında en dramatik düşüş, S-2 genotipinde *LeLTP1* geninin 48 saatteki ifade düzeyi olan 0,44 kat (Çizelge 4.16, Şekil 24)) olarak belirlenirken en dikkat çekici ifade düzeyi yükselişi ise R-7 genotipinde *SIMYB102* genin 3,48 kat (Çizelge 4.21, Şekil 4.20)) artışı olarak kayıtlara geçmiştir.

SIF3HL geninin düşük sıcaklık stresine karşı bitki metabolizmasında kritik bir yanıt oluşturduğu ve bu genin aktivitesindeki değişikliklerin bitkinin stres toleransını doğrudan etkilediği bilinmektedir. Hu vd. (2019)'nin çalışmasında, *SIF3HL* geninin RNA interferaz yöntemiyle susturulmasının, bitkilerde düşük sıcaklık koşullarında malondialdehit (MDA) birikimi, reaktif oksijen türleri (ROS) düzeyi ve elektrolit sızıntısında artışa neden olduğu bildirilmiştir. Bu bulgular, genin susturulmasının bitki metabolizmasını olumsuz etkilediğini ve bitkide düşük sıcaklık stresine karşı ciddi bir hassasiyet oluşturduğunu açıkça ortaya koymaktadır. Benzer şekilde, mevcut çalışmada elde edilen bulgular, *SIF3HL* geninin düşük sıcaklık koşullarında genotipler arasında farklı ekspresyon seviyeleri sergilediğini göstermiştir.

Çizelge 4.16. S-2 genotipinde yaprak dokularında genlerinin ifade düzeyleri ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)

Uygulama	<i>CBF1</i>	<i>CBF3</i>	<i>SIF3HL</i>	<i>LeLTP1</i>	<i>LePOD</i>	<i>RBOH1</i>	<i>SIAMST</i>	<i>SIMYB102</i>	<i>SISNAT</i>
0	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
1	0,79	0,76	0,83	0,85	0,88	0,87	1,07	1,18	0,86
12	0,75	0,73	0,88	0,81	0,82	0,72	0,99	1,30	0,84
48	0,71	0,83	0,94	0,44	0,76	0,48	0,61	2,54	0,57



Şekil 4.15. Genlerin S-2 genotipinde yaprak dokularında ifade düzeyleri grafiği

Çalışmamızda S-2, S-6 ve S-8 gibi hassas genotiplerde düşük sıcaklığa maruz kalma süresine bağlı olarak *SIF3HL* gen ekspresyonunda belirgin bir düşüş gözlenmiştir. Özellikle S-2 genotipinde, düşük sıcaklık uygulamasının 1. saatinde gen ekspresyon seviyesinin başlangıç seviyesine göre 12. saatte 0,83 kat azalış gösterdiği ve bu azalmanın 48. saat sonunda 0,94 kata ulaştığı görülmüştür. Benzer şekilde, S-6 genotipinde (Şekil 4.16) gen ekspresyon seviyesi, 48 saat sonunda başlangıç değerine göre 0,78 kat azalırken, S-8 genotipinde bu düşüş 0,80 kat seviyesine kadar olmuştur (Şekil 4.17). Bu sonuçlar, hassas genotiplerin düşük sıcaklık stresi altında *SIF3HL* geninin düzenlenmesinde önemli derecede yetersizlik yaşadığını ve bu durumun bitkilerin düşük sıcaklık koşullarına adaptasyon kabiliyetini olumsuz yönde etkilediğini göstermektedir.

Hassas genotiplerde gözlemlenen bu düşüşe karşın, tolerant genotiplerde *SIF3HL* geninin ekspresyon profili oldukça farklı bir seyir izlemiştir. Örneğin, R-5 genotipinde düşük sıcaklık uygulamasının 48. saatinde *SIF3HL* gen ekspresyon seviyesinin başlangıç seviyesine göre 1,38 kata kadar yükseldiği kaydedilmiştir. Benzer şekilde, R-7 genotipinde bu artış 1,11, R-9 (kontrol) genotipinde ise 1,34 kat olmuştur. Bu durum, tolerant genotiplerde *SIF3HL* geninin düşük sıcaklık stresine adaptasyon sürecinde aktif bir şekilde regüle edildiğini ve artan ekspresyon seviyelerinin stres toleransında önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Bununla birlikte, R-6 genotipinde ekspresyon seviyesinin 0,76 kat azalması, tolerant genotipler arasında bile genetik ve moleküler yanıt mekanizmalarının farklılık gösterebileceğini ortaya koymaktadır.

Elde edilen bu sonuçlar, hassas ve tolerant genotipler arasındaki farklılaşan *SIF3HL* gen ekspresyon profillerinin, düşük sıcaklık stresine karşı adaptasyon kapasitesini belirleyen önemli bir faktör olduğunu göstermektedir. Tolerant genotiplerde gözlemlenen gen ekspresyonundaki artış, bu genotiplerin düşük sıcaklık koşullarında oksidatif stresle mücadele edebilmek için gen düzenleme mekanizmalarını aktif bir

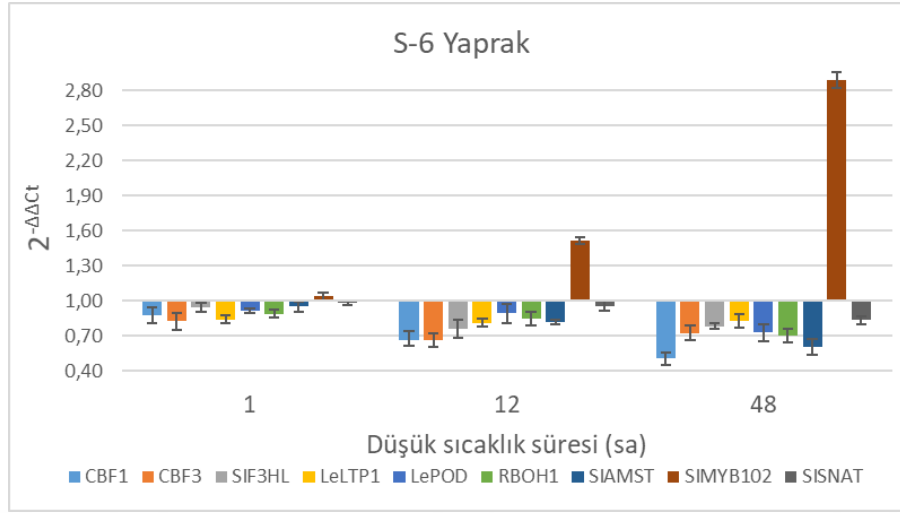
şekilde kullanabildiğini düşündürmektedir. Buna karşın, hassas genotiplerde ekspresyon seviyelerindeki düşüş, bu genotiplerin gen düzenleme kapasitesindeki yetersizlikler nedeniyle düşük sıcaklık stresine karşı duyarlılığının arttığını göstermektedir.

Hu vd. (2019)'nin çalışmasıyla uyumlu bir şekilde, *SIF3HL* geninin düşük sıcaklık stresine karşı bitki metabolizmasını etkileyen kritik bir gen olduğu, ancak bu genin regülasyon mekanizmalarının genotipler arasında farklılık gösterdiği ortaya konulmuştur. Bu bulgular, düşük sıcaklık stresine dayanıklı bitki genotiplerinin geliştirilmesinde *SIF3HL* geninin genetik düzenleme ve ıslah çalışmalarında potansiyel bir hedef olarak değerlendirilmesi gerektiğini vurgulamaktadır.

Zhang vd. (2021)'nin çalışması, *LeCOR413PM2* geninin aşırı ekspresyonunun transgenik domates bitkilerinde soğuk toleransını artırabileceğini, buna karşın RNA interferansı ile baskılanmış ekspresyonunun soğuk hassasiyetini artırabileceğini göstermiştir. Çalışmalarında, *LeCOR413PM2*'nin soğuk toleransına aracılık eden düzenleyici mekanizmaları anlamak için qRT-PCR kullanılarak ROS ve stres tepkisiyle ilişkili genlerin (*LePOD* ve *LeLTP1*) ekspresyonları analiz edilmiştir. Bu genlerin doğal koşullarda WT ve transgenik hatlar arasında benzer ekspresyon seviyelerine sahip olduğu, ancak düşük sıcaklık uygulamasının ardından OE hatlarında ekspresyon seviyelerinin WT ve RI hatlarına kıyasla daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.17. S-6 genotipinde yaprak dokularında genlerinin ifade düzeyleri ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)

Uygulama	<i>CBF1</i>	<i>CBF3</i>	<i>SIF3HL</i>	<i>LeLTP1</i>	<i>LePOD</i>	<i>RBOH1</i>	<i>SIAMST</i>	<i>SIMYB102</i>	<i>SISNAT</i>
0	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
1	0,88	0,83	0,95	0,84	0,92	0,89	0,95	1,04	0,98
12	0,66	0,66	0,76	0,81	0,89	0,85	0,82	1,52	0,96
48	0,51	0,73	0,78	0,83	0,73	0,70	0,60	2,88	0,84



Şekil 4.16. Genlerin S-6 genotipinde yaprak dokularında ifade düzeyleri grafiği

Bizim çalışmamızda *LeLTP1* geninin ekspresyon seviyelerine dair veriler, Zhang vd. (2021)'nin bulgularıyla hem benzerlikler hem de farklılıklar göstermektedir. Hassas genotiplerde, *LeLTP1* ekspresyon seviyelerinin genel olarak düşük sıcaklık stresi altında azaldığı görülmüştür. Özellikle S-2 genotipinde ekspresyon seviyesinin 48 saatte başlangıç değerine göre 0,44 kata kadar düştüğü dikkat çekicidir. S-6 genotipinde bu düşüş daha az belirgindir ve ekspresyon seviyesi başlangıca göre 0,81 kat olmuştur. S-8 genotipinde ise ekspresyon seviyesindeki dalgalanma daha belirgin olup, 12 saatte 0,794 kata kadar düşüş kaydedilmiş, ancak 48 saatte 0,80 kata ulaşmıştır.

Bu bulgular, hassas genotiplerde *LeLTP1* ekspresyonunun düşük sıcaklık stresine yeterince güçlü bir yanıt veremediğini ve bu durumun, bu genotiplerin düşük sıcaklıklara karşı duyarlılığını artırabileceğini göstermektedir. Zhang ve arkadaşlarının, *LeLTP1*'in OE hatlarında daha yüksek ekspresyonunun düşük sıcaklık stresine karşı koruyucu bir rol oynadığına dair bulguları, bizim hassas genotiplerimizde görülen düşük ekspresyon seviyeleriyle uyumlu görünmektedir.

Öte yandan, tolerant genotiplerde *LeLTP1*'in düşük sıcaklık stresine yanıt olarak daha yüksek seviyede ekspresyon gösterdiği tespit edilmiştir. Örneğin, R-5 genotipinde ekspresyon seviyesinin 12 saatte 1,48 kata kadar çıktığı ve 48 saatte 1,18 katta stabil kaldığı görülmüştür. Benzer şekilde, R-6 genotipinde 12 saatte 1,51 kata kadar çıkan ekspresyon seviyesi, 48 saatte 0,94 kata düşmesine rağmen başlangıç seviyesinin üzerinde kalmıştır. R-7 genotipinde ise ekspresyon seviyeleri genel olarak stabil bir seyir izlemiş ve düşük sıcaklık uygulamasından belirgin şekilde etkilenmemiştir.

Bu sonuçlar, tolerant genotiplerin düşük sıcaklık stresine karşı *LeLTP1* ekspresyon seviyesini dinamik bir şekilde düzenleyebildiğini ve bu düzenlemenin, genotiplerin soğuk toleransı ile ilişkili olabileceğini göstermektedir. Zhang vd. (2021)'nin çalışmasında OE transgenik hatlarda görülen yüksek ekspresyon seviyelerinin soğuk

toleransı ile doğrudan ilişkili olduğu bulgusu, bizim tolerant genotiplerde elde ettiğimiz verilerle uyumluluk göstermektedir.

Çalışmamız, *LeLTP1* geninin ekspresyon seviyelerindeki farklılıkların genotiplerin düşük sıcaklık stresine karşı tolerans veya duyarlılık göstermesinde önemli bir rol oynayabileceğini desteklemektedir. Zhang ve arkadaşlarının bulgularıyla birlikte değerlendirildiğinde, *LeLTP1* gibi genlerin ekspresyonunun genetik olarak düzenlenmesinin, domates bitkilerinde soğuk toleransını artırma potansiyeline sahip olduğu sonucuna varılabilir.

Çalışmadaki bir diğer gen olan *LePOD* gen ekspresyon seviyeleri incelendiğinde farklı genotiplerin stres koşullarına verdikleri yanıtların anlaşılmasına yönelik önemli ipuçları sunmaktadır. Sonuçlar, genotipler arasında belirgin farklılıklar olduğunu göstermiştir. Hassas genotipler (S-2, S-6 ve S-8) incelendiğinde, *LePOD* gen ekspresyon seviyelerinin uygulamanın 48. saatinde sırasıyla 0,76, 0,73 ve 0,79 kat seviyelerinde kaldığı görülmüştür. Bu genotiplerde ekspresyon seviyelerindeki değişimin düşük oranda olması, stres durumunda *LePOD* geninin etkili bir savunma mekanizması oluşturamadığını göstermektedir. Bu durum, hassas genotiplerin oksidatif stresle mücadelede sınırlı bir kapasiteye sahip olabileceğini düşündürmektedir.

Tolerant genotiplerde (R-5, R-6, R-7 ve R-9) ise gen ekspresyon seviyelerinde belirgin bir artış gözlenmiştir. R-5 genotipinde, ekspresyon seviyesi uygulamanın 12. saatinde 1,27 kata kadar yükselmiş ve 48. saatte 1,12 kat düşmesine rağmen yüksek seviyelerde kalmıştır. Benzer şekilde, R-6 genotipi 12. saatte 1,49 kat gibi yüksek bir ekspresyon seviyesi göstermiş ancak 48. saatte 0,97 kata düşmüştür. Bu genotiplerde erken dönemlerde görülen yüksek ekspresyon seviyeleri, oksidatif stresle mücadelede etkili bir savunma mekanizması olduğunu işaret etmektedir. Özellikle R-7 genotipinde ekspresyon seviyesinin sürekli artış göstererek 48. saatte 1,19 kata ulaşması, bu genotipin *LePOD* genine dayalı stres toleransında diğerlerinden daha etkin bir mekanizma geliştirdiğini düşündürmektedir. Kontrol genotipi olan R-9'da da ekspresyon seviyesinin 48. saatte 1,14'e ulaşması, bu genotipin de tolerant özellikler taşıdığını göstermektedir.

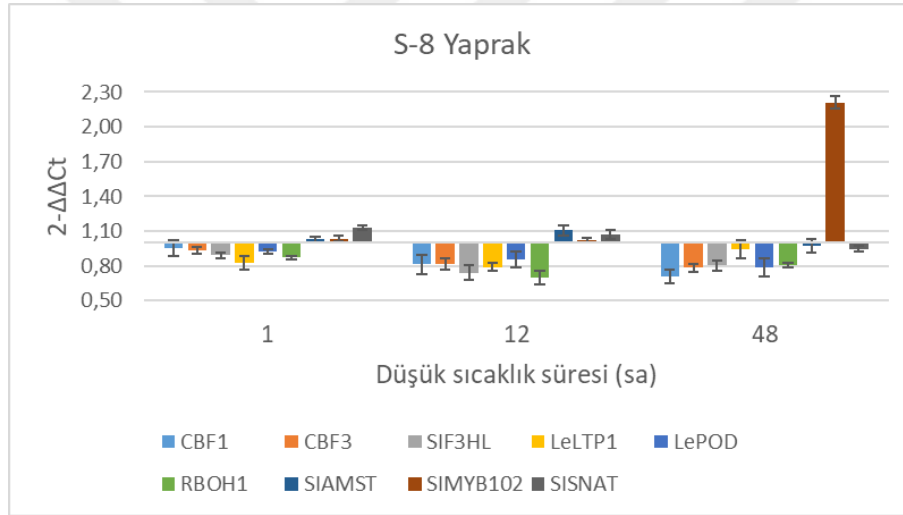
Bu veriler, tolerant genotiplerde *LePOD* geninin oksidatif stresle mücadelede etkin bir rol oynadığını ve hassas genotiplerle karşılaştırıldığında stres karşısında daha yüksek bir savunma mekanizması geliştirdiğini ortaya koymaktadır. Tolerant genotiplerde erken ve yüksek düzeyde *LePOD* gen ekspresyonu, stres sinyallerine karşı hızlı bir yanıt mekanizmasının işleyişini yansıtabilir. Hassas genotiplerde ise bu mekanizmanın yeterince etkin çalışmaması, bu genotiplerin stres koşullarında daha savunmasız olmasına yol açabilir. Bu bulgular, genetik varyasyonun ve gen ekspresyon dinamiklerinin bitkilerin stres toleransında belirleyici bir faktör olduğunu göstermektedir.

Li vd. (2019)'nin çalışması, flavonoidlerden biri olan Epigallocatechin-3-gallate'nin (EGCG), domates bitkilerinde çeşitli abiyotik streslere karşı geniş spektrumlu bir stres koruyucusu olarak işlev gördüğünü ve bu koruyucu etkinin, reaktif oksijen türlerinin (ROS) düzenlenmesi yoluyla sağlandığını ortaya koyuyor. Araştırmada, özellikle *RBOH1* geninin, NADPH oksidaz aracılığıyla apoplastik H₂O₂ üretimindeki

kritik rolü vurgulanmıştır. EGCG'nin, *RBOH1*'e bağlı ROS birikimini düzenlediği ve bu mekanizmanın stres toleransı için önemli olduğu belirtilmiştir. Bu bağlamda, çalışmamızdaki *RBOH1* genine ilişkin bulgularımız, hassas ve tolerant genotipler arasında belirgin farklar olduğunu ve tolerant genotiplerin *RBOH1* ekspresyon seviyelerini daha etkin bir şekilde düzenlediğini göstermektedir.

Çizelge 4.18. S-8 çeşidinde yaprak dokularında genlerinin ifade düzeyleri ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)

Uygulama	<i>CBF1</i>	<i>CBF3</i>	<i>SIF3HL</i>	<i>LeLTP1</i>	<i>LePOD</i>	<i>RBOH1</i>	<i>SIAMST</i>	<i>SIMYB102</i>	<i>SISNAT</i>
0	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
1	0,95	0,93	0,89	0,83	0,92	0,87	1,03	1,03	1,13
12	0,81	0,81	0,74	0,79	0,85	0,70	1,10	1,02	1,07
48	0,71	0,78	0,80	0,94	0,79	0,81	0,97	2,21	0,95



Şekil 4.17. Genlerin S-8 genotipinde yaprak dokularında ifade düzeyleri grafiği

Hassas genotipler olan S-2, S-6 ve S-8'de düşük sıcaklık uygulaması sırasında *RBOH1* ekspresyonunda belirgin bir azalma gözlenmiştir. Özellikle S-2 genotipinde bu düşüş 0,48 kata kadar ulaşmış, diğer hassas genotiplerde de benzer azalma eğilimleri izlenmiştir. Li vd. (2019)'nin çalışmasında, *RBOH1*'in baskılanmasının abiyotik stres kaynaklı ROS birikimini artırarak stres toleransını tehlikeye attığı gösterilmiştir. Bu bağlamda, bizim sonuçlarımız, hassas genotiplerde *RBOH1* ekspresyonundaki düşüşün, düşük sıcaklık stresine toleransın azalmasına neden olabileceğini düşündürmektedir. Azalan ekspresyon, ROS birikiminin etkili bir şekilde temizlenememesiyle sonuçlanabilir, bu da stresin zararlı etkilerini artırabilir.

R-5, R-6, R-7 ve kontrol genotipi R-9 tolerant olarak tanımlanmıştır ve bu genotiplerde *RBOH1* ekspresyonunun başlangıçta arttığı, daha sonra zamanla azaldığı görülmüştür. Örneğin, R-5 genotipinde (Şekil 4.18) ekspresyon seviyesi 12 saate kadar 1,31'e çıkarken, 48 saatte 0,99 kata gerilemiştir. Benzer şekilde, R-6 genotipi (Şekil 4.19) 1 saatte 1,11kata ulaşmış, 48 saatte ise 0,85 kat düşmüştür. Li ve arkadaşlarının çalışmasında, *RBOH1*'e bağlı H_2O_2 üretiminin EGCG kaynaklı stres toleransında kritik bir rol oynadığı belirtilmiştir. Tolerant genotiplerdeki bu artış, *RBOH1*'in strese adaptasyon sağlamak için aktive olduğunu ve başlangıçta ROS üretimini artırarak savunma mekanizmalarını harekete geçirdiğini göstermektedir. Ekspresyon seviyelerinin zamanla azalması ise, ROS dengesinin sağlandığını ve stresin hafifletildiğini işaret etmektedir.

Li vd. (2019)'nin çalışmasında, EGCG'nin antioksidan enzimlerin aktivitesini artırarak ROS dengesini düzenlediği ve bu süreçte *RBOH1*'in önemli bir rol oynadığı vurgulanmıştır. Bu, bizim tolerant genotiplerde gözlemlediğiniz *RBOH1* ekspresyonunun başlangıçta artması, ardından zamanla azalmasıyla uyumludur. EGCG'nin bu süreçte rol oynayıp oynamadığını test etmek için, EGCG uygulamalarıyla daha fazla deney yapılabilir.

Hassas genotiplerde düşük sıcaklık stresi altında *RBOH1* ekspresyonunun sürekli azalması, ROS dengesinin bozulduğunu ve bu genotiplerin stresle başa çıkamadığını gösterebilir. Tolerant genotiplerde ise *RBOH1*'in ekspresyonundaki artış, strese karşı savunma mekanizmalarının devreye girdiğini ve bu genotiplerin stresle daha etkin başa çıktığını göstermektedir. Li vd. (2019)'nin bulguları, *RBOH1*'in abiyotik stres toleransında kritik bir role sahip olduğunu ve EGCG'nin bu toleransı daha da artırabileceğini göstermektedir. Bizim bulgularımız da bu mekanizmaları desteklemektedir, ancak EGCG'nin rolünün tam olarak aydınlatılması için ek çalışmalara ihtiyaç duyulabilir.

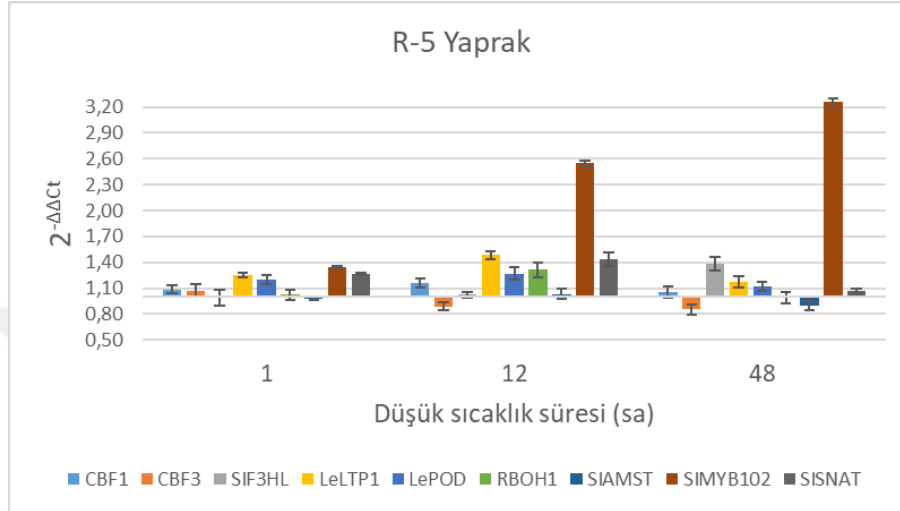
Ding vd. (2022)'nin çalışmasından elde edilen bulgular, jasmonik asit (JA) ve melatonin (MT) arasındaki çapraz iletişim ve bu bileşiklerin domates bitkilerinde soğuk toleransı üzerindeki sinerjik etkilerine ışık tutmaktadır. Çalışmada, JA ve MT'nin pozitif bir geri bildirim döngüsü oluşturarak bitkilerin soğuk stresine verdiği tepkiyi güçlendirdiği gösterilmiştir. Bu bağlamda, çalışmamızdaki genotiplerde *SIAMST* geninin düşük sıcaklık sonrası ekspresyon seviyelerinin analiz edilmesi, bu mekanizmanın genotip düzeyindeki etkilerini değerlendirmek için önemli bir fırsat sunmuştur.

Çizelge 4.19. R-5 çeşidinde yaprak dokularında genlerinin ifade düzeyleri ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)

Uygulama	<i>CBF1</i>	<i>CBF3</i>	<i>SIF3HL</i>	<i>LeLTP1</i>	<i>LePOD</i>	<i>RBOH1</i>	<i>SIAMST</i>	<i>SIMYB102</i>	<i>SISNAT</i>
0	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1
1	1,09	1,07	0,99	1,25	1,20	1,03	0,98	1,34	1,26
12	1,16	0,89	1,02	1,48	1,27	1,31	1,03	2,55	1,43

Çizelge 4.19'un devamı,

48	1,05	0,85	1,38	1,18	1,12	0,99	0,90	3,26	1,07
----	------	------	------	------	------	------	------	------	------



Şekil 4.18. Genlerin R-5 genotipinde yaprak dokularında ifade düzeyleri grafiği

Hassas genotiplerde (S-2, S-6, S-8) *SIAMST* gen ekspresyonunun düşük sıcaklık uygulaması sonrası azalması, Ding vd. (2022) JA ve MT'nin soğuk toleransındaki kritik rollerini ortaya koyan bulgularıyla uyumlu görünüyor. Özellikle 48 saatlik süre sonunda ekspresyon seviyelerinin 0,60- 0,97 kat gerilemesi, bu genotiplerin JA-MT sinerjisinden yeterince faydalanamadığını veya bu mekanizmanın etkili çalışmadığını düşündürülebilir. Ayrıca, MT veya JA biyosentezindeki bir engel, Ding'in çalışmasında olduğu gibi bu genlerin ekspresyonunu ve soğuk toleransını azaltabilir.

Tolerant genotiplerde (R-5, R-6, R-7, R-9) *SIAMST* ekspresyonunun düşük sıcaklıkta daha yüksek seviyelerde seyretmesi ve daha az düşüş göstermesi, bu genotiplerin JA ve MT sinerjisini daha etkin bir şekilde kullanabildiğini ortaya koymaktadır. Özellikle R-6 genotipinde 1 saatte 1,22 kata kadar yükselen ekspresyon seviyesi, soğuk stresine hızlı bir yanıt mekanizması geliştirdiğini göstermektedir. Bu durum, Ding vd. (2022), MT'nin JA birikimini teşvik ettiğini ve bu iki yolun pozitif bir geri bildirim döngüsü oluşturduğunu belirten bulgularıyla uyumludur. R-7 genotipinde ekspresyon seviyesinin (Şekil 4.20) 12 saat boyunca stabil seyredip 48 saatte belirgin bir şekilde düşmesi, bu genotipin JA-MT mekanizmasının soğuk stresine uzun süreli adaptasyonda bazı sınırlamalara sahip olabileceğini gösterebilir. R-9 genotipinde ise ekspresyon seviyesinin 48 saat boyunca nispeten yüksek seyretmesi, bu genotipin soğuk toleransını daha iyi koruyabildiğini göstermektedir.

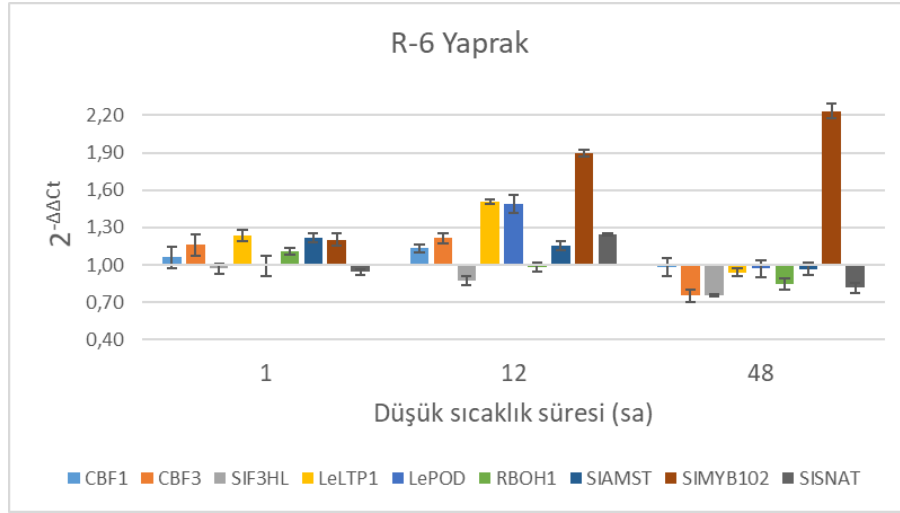
Ding vd. (2022)'nin bulguları ışığında, çalışmamızdaki genotiplerin *SIAMST*

ekspresyon dinamikleri, hassas genotiplerde düşük ekspresyon seviyeleri, JA veya MT biyosentez yollarında bir zayıflık olabileceğini düşündürmektedir. Bu genotiplerde JA veya MT uygulamalarının etkinliği test edilerek tolerans arttırılabileceği fikri ortaya çıkmaktadır. Tolerant genotiplerde ekspresyon seviyelerindeki stabilite ve yüksek başlangıç seviyeleri, JA ve MT'nin etkin bir geri bildirim döngüsüyle çalıştığını gösterebilir. Bu genotiplerdeki mekanizmaların genetik düzeyde detaylandırılması, soğuk toleransını arttırmaya yönelik ıslah programlarına katkı sağlayabilecektir. Bulgularımız Ding vd. (2022) çalışmasını destekler niteliktedir ve JA-MT etkileşiminin genotiplerinizdeki soğuk toleransı mekanizmalarındaki rolünü anlamak için daha fazla araştırma yapılmasını önermektedir. Bu mekanizmaları genetik manipülasyonlarla optimize etmek, soğuk dayanıklı domates çeşitleri geliştirilmesinde önemli bir katkı sağlayabileceği ortaya çıkmaktadır.

Hassas genotiplerde *SISNAT* gen ekspresyon seviyelerinin stres süresine bağlı olarak önemli ölçüde azaldığı görülmüştür. Örneğin, S-2 genotipinde ekspresyon seviyesi bir saat içinde 0,86'ya, 12 saatte 0,84'e ve 48 saat sonunda 0,57 kata kadar düşmüştür. Bu azalma, S-2 genotipinin uzun süreli stres altında *SISNAT* gen ekspresyonunu sürdüremediğini ve bu nedenle düşük bir stres toleransı sergilediğini göstermektedir. Benzer şekilde, S-6 genotipinde ekspresyon seviyelerindeki düşüş daha sınırlı olsa da (0,98 → 0,84), bu genotipin de stres toleransı açısından sınırlı bir dayanıklılığa sahip olduğu anlaşılmaktadır. Diğer yandan, S-8 genotipinde ekspresyon seviyesi başlangıçta artış göstermiş (1,13), ancak 48 saat sonunda 0,95'kat gerilemiştir. Bu durum, S-8 genotipinin kısa süreli stresle daha iyi başa çıkabildiğini, ancak uzun vadeli stres altında sınırlı bir dayanıklılık sergilediğini düşündürmektedir.

Çizelge 4.20. R-6 çeşidinde yaprak dokularında genlerinin ifade düzeyleri ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)

Uygulama	<i>CBF1</i>	<i>CBF3</i>	<i>SIF3HL</i>	<i>LeLTP1</i>	<i>LePOD</i>	<i>RBOH1</i>	<i>SIAMST</i>	<i>SIMYB102</i>	<i>SISNAT</i>
0	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
1 saat	1,06	1,16	0,97	1,24	0,99	1,11	1,22	1,20	0,94
12 saat	1,13	1,21	0,87	1,51	1,49	0,98	1,16	1,89	1,24
48 saat	0,98	0,75	0,76	0,94	0,97	0,85	0,97	2,23	0,82



Şekil 4.19. Genlerin R-6 genotipinde yaprak dokularında ifade düzeyleri grafiği

Tolerant genotipler incelendiğinde, çalışmamızda kullanılan genler bakımından gen ekspresyon seviyelerinde istikrarlı bir yükseliş olduğu gözlenmiştir. R-5 genotipinde ekspresyon 1. saatte 1,26 kat, 12. saatte 1,43 kat ve 48. saat sonunda 1,07 kat artmıştır. Bu bulgu, R-5 genotipinin, stres koşullarına karşı güçlü bir adaptif yanıt gösterdiğini ve *SISNAT* gen ekspresyonunu uzun süre yüksek seviyelerde sürdürebildiğini ortaya koymaktadır. Benzer şekilde, R-6 genotipinde ekspresyon bir saatte 0,94, 12 saatte 1,24 ve 48 saatte 0,82 kat azaldığı kaydedilmiştir. R-7 genotipinde ise ekspresyonun ilk saatlerde 0,79 kat azalmasına rağmen, 48 saat boyunca görece istikrarlı bir seyir izlediği (0,83 kat azaldığı) gözlenmiştir. Kontrol grubu olan R-9 genotipi (Şekil 4.19), ekspresyon seviyelerini ilk saatlerde 0,90, 12 saatte 0,83 ve 48 saatte 1,01 kat ve bu durum, genotipin strese karşı belirgin bir duyarlılık göstermediğini işaret etmektedir.

Ding ve ark. (2022) tarafından yapılan çalışmada da benzer bir şekilde *SISNAT* geninin stres toleransı üzerindeki etkisi vurgulanmıştır. Bu çalışma, *SISNAT* gen ekspresyonunun özellikle oksidatif stres koşullarında artış gösterdiğini ve genotipler arasında belirgin farklar olduğunu ortaya koymuştur. Özellikle tolerant genotiplerde, *SISNAT* gen ekspresyonunun uzun süreli stres altında yüksek seviyelerde korunmasının, hücrel savunma mekanizmalarının etkinliğini artırdığı bildirilmiştir. Bu bağlamda, Ding vd. (2022)'nin bulguları, tolerant genotiplerimizin *SISNAT* gen ekspresyon seviyelerindeki yüksekliği ile uyum göstermektedir. Ancak, hassas genotiplerde ekspresyon seviyelerindeki düşüşün, strese karşı zayıf adaptif yanıtların bir göstergesi olduğu ve bu genotiplerin daha kırılgan yapıya sahip oldukları bu çalışmayla daha net bir şekilde ortaya konulmuştur.

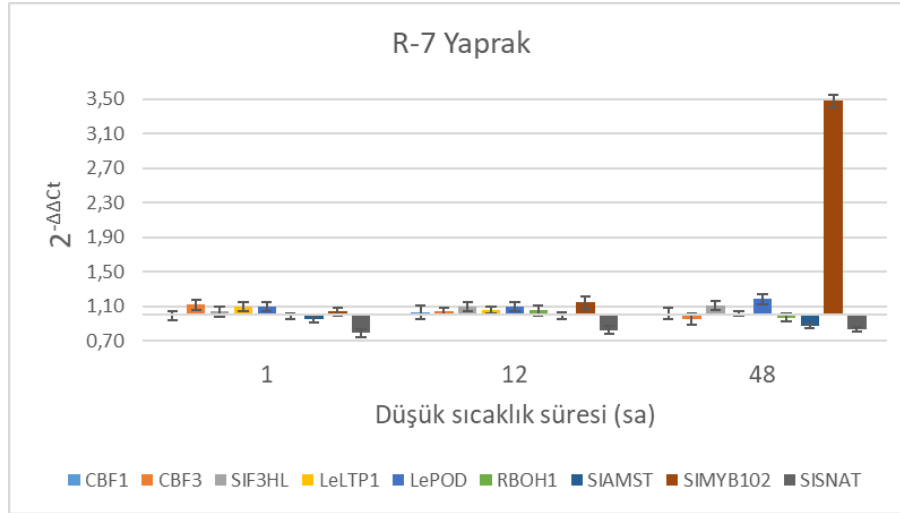
Bu sonuçlara göre *SISNAT* gen ekspresyonu ile stres toleransı arasında doğrudan bir ilişki olduğu görülmektedir. Özellikle tolerant genotiplerde ekspresyon seviyelerinin sürekliliği, genotiplerin stres koşullarında hayatta kalma stratejileri açısından kritik bir

role sahiptir. Hassas genotiplerin ekspresyon seviyelerinde gözlenen düşüş, bu genotiplerin stres toleransını artırmaya yönelik ıslah çalışmalarında dikkate alınması gereken önemli bir hedef olduğunu göstermektedir.

Wang vd. 2020 yılında yaptıkları çalışmada, domates *SIMYB102* genini *R2R3-MYB* alt ailesinin bir *MYB* ailesi transkripsiyon faktörü olarak tanımlanmıştır. Ayrıca, *SIMYB102* promotör bölgesinin fototepkisel, abiyotik strese tepkisel ve hormona tepkisel düzenleyici elemanlar içerdiğini belirlemişler ve domatesin üreme organlarında vejetatif organlardakinden daha yüksek *SIMYB102* ekspresyonu tespit edilmiş, ekspresyon olgun meyvelerde ve köklerde en yüksek olarak belirlenmiştir. *SIMYB102* ekspresyonunun ayrıca soğukla indüklenebilir olduğu gösterilmiştir. *SIMYB102* tarafından kodlanan protein, hedef genlerin transkripsiyonel aktivasyonunu C-terminal alanı aracılığıyla aracılık ettiği bulunan çekirdeğe yerleşik olduğu bulunmuştur. Domates bitkilerinde *SIMYB102*'nin aşırı ekspresyonu, soğuk stresine karşı gelişmiş tolerans sağladığı bulunmuştur. Bu tür soğuk stres koşulları altında, *SIMYB102* aşırı ekspresyonu olan transgenik bitkilerin yapraklarındaki prolin seviyelerinin WT bitkilerindekinden daha yüksek olduğunu bulunmuştur. Ek olarak, *SIMYB102* aşırı ekspresyonu *SICBF1*, *SICBF3*, *SIDREB1*, *SIDEB2* ve *SIICE1* dahil olmak üzere soğuk tepkisi genlerinin artan ekspresyonuyla ilişkilendirilmiştir. Ayrıca *SIMYB102*'nin aşırı ekspresyonunun *SIP5CS* ve *SLAPX2*'nin soğuk kaynaklı yukarı regülasyonunu daha da artırdığını bulunmuştur. Birlikte ele alındığında, bu sonuçlar *SIMYB102*'nin C-tekrar bağlayıcı transkripsiyon faktörü (*CBF*) ve prolin sentez yollarında yer alabileceğini ve böylece domates bitkisinin soğuk direncini iyileştirebileceğini göstermektedir.

Çizelge 4.21. R-7 çeşidinde yaprak dokularında genlerinin ifade düzeyleri ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)

Uygulama	<i>CBF1</i>	<i>CBF3</i>	<i>SIF3HL</i>	<i>LeLTP1</i>	<i>LePOD</i>	<i>RBOH1</i>	<i>SIAMST</i>	<i>SIMYB102</i>	<i>SISNAT</i>
0	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
1	0,99	1,12	1,04	1,09	1,09	0,99	0,95	1,04	0,79
12	1,03	1,05	1,10	1,06	1,10	1,05	0,99	1,15	0,82
48	1,02	0,95	1,11	1,02	1,19	0,97	0,87	3,48	0,83



Şekil 4.20. Genlerin R-7 genotipinde yaprak dokularında ifade düzeyleri grafiği

Bizim çalışmamızda *SIMYB102* geninin hassas grubun yaprak dokularındaki ekspresyon seviyeleri incelendiğinde tüm genotiplerde ilgi çekici düzeyde artışlar göze çarpmaktadır. Hassas genotiplerden S-2’de ekspresyon seviyesi 1 saatte 1,18, 12 saatte 1,30, 48 saatte 2,54 kat olmuştur. S-6 genotipinde 1 saatte 1,04 kat, 12 saatte 1,52 kat, 48 saatte 2,88 kat artış olmuştur. S-8 genotipinde ise 1 saatte 1,03 kat, 12 saatte 1,02kat ve 48 saatte 2,21 kat artış olmuştur.

Tolerant genotiplerde ise; R-5 genotipinde 1 saatte 1,34, 12 saatte 2,55 ve 48 saatte 3,26 kat artış olmuştur. R-6 genotipinde 1 saatte 1,20, 12 saatte 1,89 ve 48 saatte 2,23 kat artış seviyesi alınmıştır. R-7 genotipinde 1 saatte seviye 1,04, 12 saatte 1,15 ve 48 saatte 3,48 kat artış olmuştur. Kontrol genotipi olan R-9’da ise 1 saatte 1,08, 12 saatte 1,07 ve 48 saatte 2,80 kat artış olmuştur.

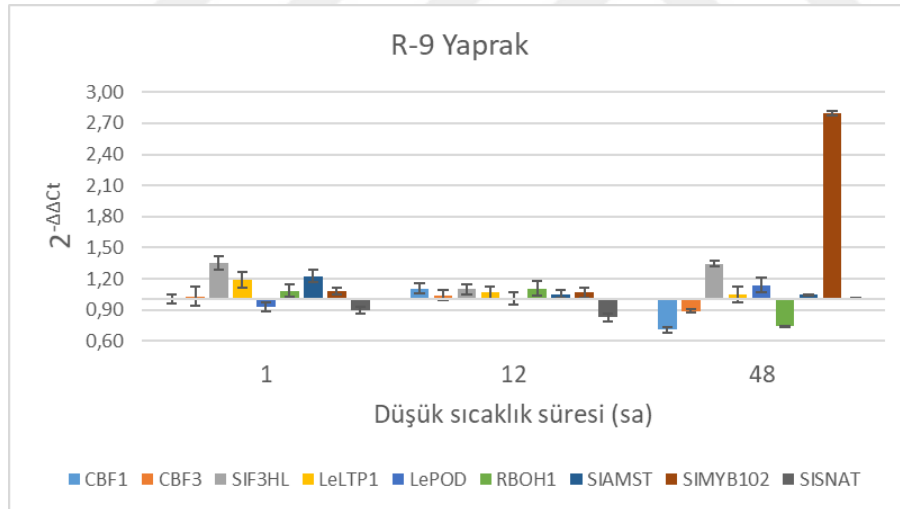
Wang vd. (2020)’nin çalışması, *SIMYB102* geninin domates bitkisinde soğuk stresine karşı geliştirdiği moleküler mekanizmaları ortaya koymuş ve bu genin soğuk toleransındaki rolünü detaylı bir şekilde incelemiştir. Çalışmamız, bu bulgularla paralel olarak *SIMYB102*’nin soğuk stres koşullarında farklı genotiplerdeki ekspresyon seviyelerini analiz etmiş ve genin düzenleyici rolünü daha geniş bir genetik çeşitlilik temelinde değerlendirmiştir. Her iki çalışma da *SIMYB102*’nin soğuk strese yanıt veren genetik ağların bir parçası olduğunu bizim çalışmamızda doğrulamış ancak genotipik farklılıkların bu yanıt üzerindeki etkilerini de vurgulamıştır.

SIMYB102 geninin domatesin üreme organlarında ve olgun meyvelerinde daha yüksek düzeyde ekspresyon gösterdiğini, ayrıca soğuk stres altında bu ekspresyonun köklere kadar yaygın bir artış sergilediğini rapor edilmiştir (Hu vd. 2019). Çalışmamız, genin özellikle yaprak dokularındaki ekspresyon seviyelerini incelemiş ve bu dokuda hem hassas hem de tolerant genotiplerde soğuk stresin etkisiyle dikkat çekici bir artış tespit etmiştir. Ancak, tolerant genotiplerde (örneğin R-7) 48 saat sonunda ekspresyon

seviyelerinin daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir (Ct:3,48). Bu sonuç, Wang vd. (2020)'nin bulgularındaki genel ifadeyle uyumlu olmakla birlikte, genetik materyal bazında daha spesifik farklılıkları ortaya koymaktadır. *SIMYB102*'nin prolin birikimi, *CBF* (*C-Repeat Binding Factor*) ve diğer soğuk yanıt genlerinin ekspresyonunu artırarak soğuk toleransına katkıda bulunduğunu belirtmişlerdir. Çalışmamızda, hassas genotiplerde (örneğin S-2), ilk saatlerdeki (1,18) hızlı bir ekspresyon artışı gözlenmiş olmasına rağmen, bu artışın tolerant genotiplere kıyasla daha sınırlı kaldığı ve genellikle daha düşük düzeylerde seyrettiği tespit edilmiştir. Tolerant genotiplerdeki daha yüksek ekspresyon artışları (R-5: 3,26 kat, R-7: 3,48 kat) bu genotiplerin soğuk stresine yanıt kapasitesinin genetik dayanıklılıkla doğrudan ilişkili olabileceğini düşündürmektedir.

Çizelge 4.22. R-9 çeşidinde yaprak dokularında genlerinin ifade düzeyleri ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)

Uygulama	<i>CBF1</i>	<i>CBF3</i>	<i>SIF3HL</i>	<i>LeLTP1</i>	<i>LePOD</i>	<i>RBOH1</i>	<i>SIAMST</i>	<i>SIMYB102</i>	<i>SISNAT</i>
0	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
1	1,01	1,03	1,35	1,19	0,93	1,08	1,22	1,08	0,90
12	1,11	1,04	1,10	1,07	1,01	1,10	1,05	1,07	0,83
48	0,71	0,89	1,34	1,05	1,14	0,74	1,04	2,80	1,01



Şekil 4.21. Genlerin R-9 genotipinde yaprak dokularında ifade düzeyleri grafiği

Wang vd. (2020)'nin rapor ettiği gibi, *SIMYB102* geninin promotör bölgesindeki abiyotik stres yanıtı düzenleyici elementler, genin stres koşullarına verdiği yanıtı belirlemede kritik rol oynamaktadır. Çalışmamız, bu düzenleyici mekanizmaların genotipik farklılıklarla şekillenebileceğini ve bu farklılıkların ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkilerinin ıslah çalışmalarında dikkate alınması gerektiğini göstermektedir. Örneğin, tolerant genotiplerde gen ekspresyonunun daha uzun süreli ve yüksek düzeyde

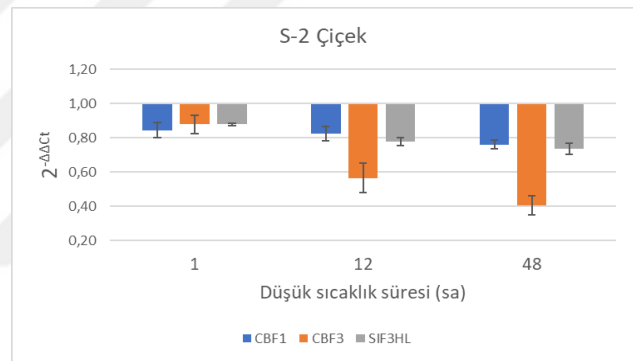
olması, bu genotiplerin soğuk stresine uyum sağlamada daha avantajlı olduğunu ortaya koymuştur. Sonuç olarak, Wang vd. (2020)'nin çalışması, *SlMYB102* geninin soğuk stresine karşı genel mekanizmasını ortaya koyarken, çalışmamız bu mekanizmayı genotipik çeşitlilik temelinde detaylandırmıştır. *SlMYB102* geninin ekspresyon seviyelerindeki farklılıklar, soğuk stresine dayanıklı yeni domates çeşitlerinin ıslahında genetik materyal seçiminde kritik bir öneme sahiptir.

4.5.2. Çiçek dokularında genlerin ifade düzeyleri

CBF1 geninin ifade düzeyleri, genotiplerin düşük sıcaklık stresine verdikleri tepkilerin anlaşılmasında önemli bir gösterge olmuştur (Yuasa vd. 2014). Çiçek dokularında elde edilen sonuçlar, genotiplerin hassas veya tolerant olma durumlarının çiçek dokularında da açık bir şekilde gözlemlenebildiğini göstermektedir.

Çizelge 4.23. S-2 çeşidinde çiçek dokularında genlerinin ifade düzeyleri ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)

Uygulama	<i>CBF1</i>	<i>CBF3</i>	<i>SIF3HL</i>
0	1,00	1,00	1,00
1	0,84	0,88	0,88
12	0,83	0,57	0,78
48	0,76	0,41	0,74



Şekil 4.22. Genlerin S-2 genotipinde çiçek dokularında ifade düzeyleri grafiği

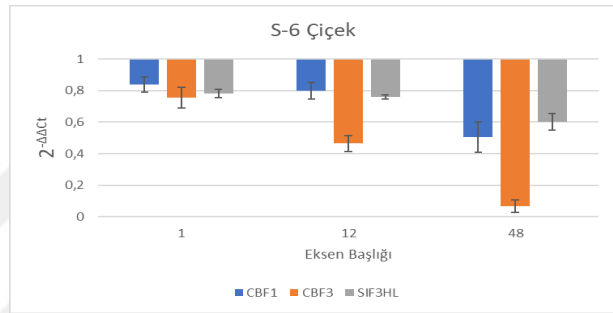
Hassas genotipler arasında S-2, S-6 ve S-8 incelendiğinde, düşük sıcaklık stresine karşı *CBF1* geninin ifade seviyelerinde belirgin bir düşüş olduğu görülmüştür. (Çizelge 4.23) S-2 genotipi başlangıçta yüksek bir ifade düzeyi (0,84 kat artmış) göstermiş, ancak bu düzey zamanla azalarak 48 saatin sonunda 0,76'kat düşmüştür (Şekil 4.22). Benzer şekilde S-6 genotipi, 1 saat sonunda 0,84 seviyesinde ifade gösterirken, 48 saat sonunda 0,50'ye kadar azalmıştır. S-8 genotipi ise en çarpıcı azalmayı göstermiş, başlangıçta 0,98 olan ifade düzeyi 48 saat sonunda 0,44 kat azalmıştır. Bu sonuçlar, hassas genotiplerde stres yanıtının kısa süreli olduğunu ve uzun süreli bir adaptasyon mekanizmasının etkin olmadığını ortaya koymaktadır.

Tolerant genotiplerde ise çiçek dokularındaki *CBF1* gen ifadesi daha güçlü ve stabil bir yanıt sergilemiştir. Örneğin, R-5 genotipinde ifade düzeyi 1 saat sonunda 1,16'kaya kadar yükselmiş, ancak 48 saat sonunda 0,56'kat düşmesine rağmen belirgin

bir yanıt devam etmiştir (Çizelge 4.26, Şekil 4.25). R-6 genotipinde ise başlangıçta 1,19’kata kadar çıkan ifade düzeyi, 48 saat sonunda 0,46’kat inmiştir (Çizelge 4.27, Şekil 4.26). İlginç bir şekilde, R-7 genotipi düşük sıcaklık stresine karşı en stabil yanıtı göstermiş ve ifade düzeyini 48 saat boyunca 0,90 kat civarında koruyabilmiştir (Çizelge 4.28, Şekil 4.27). R-9 kontrol genotipi de 1 ve 12 saatlerde ifade seviyeleri yükselirken (1,14 ve 1,17kat) bu yanıt 48 saatte 0,95 kat artış ile devam etmiştir (Çizelge 4.29, Şekil 4.28).

Çizelge 4.24. S-6 çeşidinde çiçek dokularında genlerinin ifade düzeyleri ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)

Uygulama	<i>CBF1</i>	<i>CBF3</i>	<i>SIF3HL</i>
0	1	1	1
1	0,84	0,75	0,78
12	0,80	0,47	0,76
48	0,50	0,07	0,60

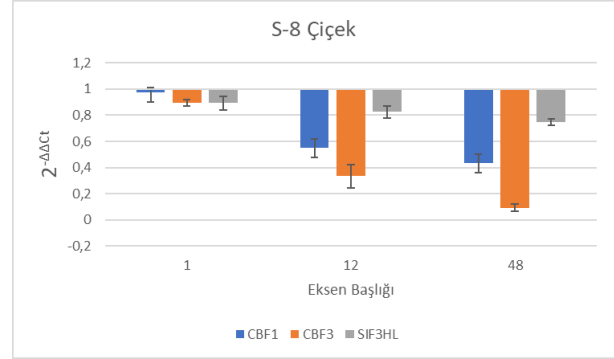


Şekil 4.23. Genlerin S-6 genotipinde çiçek dokularında ifade düzeyleri grafiği

Yaprak dokularında daha önce yapılan çalışmalarda da benzer bir durum gözlenmişti; hassas genotiplerde *CBF1* gen ifadesi çabuk azalırken, tolerant genotiplerde daha uzun süreli ve stabil bir ifade düzeyi izlenmiştir. Örneğin, S-6 genotipi yaprak dokularında 48. saatte 0,51 düzeyinde bir ifade azalışı göstermişti; bu değer çiçek dokularında kaydedilen 0,50’lik ifade seviyesiyle oldukça benzerlik göstermektedir. Bu durum, genotiplerin düşük sıcaklık stresine karşı verdikleri genetik yanıtın dokuya özgü bazı farklılıklar göstermekle birlikte genel bir adaptasyon stratejisini yansıttığını düşündürmektedir. Sonuç olarak, tolerant genotiplerin *CBF1* gen ifadesi açısından çiçek ve yaprak dokularında daha uzun süreli bir yanıt gösterdiği, bu genotiplerin düşük sıcaklık stresine karşı adaptasyon mekanizmalarının daha etkili olduğunu ortaya koymaktadır. Özellikle R-7 ve R-9 genotiplerinin stabil yanıtları, bu genotiplerin düşük sıcaklık stresine karşı dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesinde önemli adaylar olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.25. S-8 çeşidinde çiçek dokularında genlerinin ifade düzeyleri ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)

Uygulama	<i>CBF1</i>	<i>CBF3</i>	<i>SIF3HL</i>
0	1	1	1
1	0,98	0,90	0,89
12	0,55	0,34	0,82
48	0,44	0,09	0,75

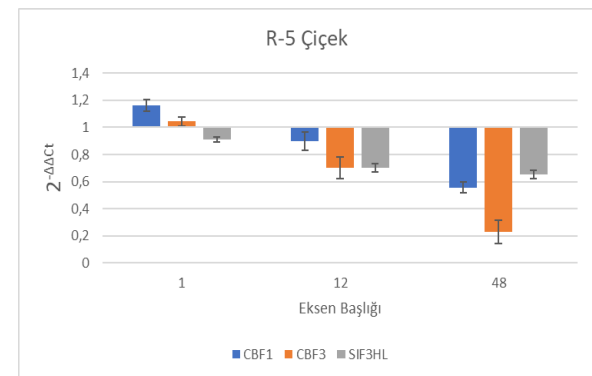


Şekil 4.24. Genlerin S-8 genotipinde çiçek dokularında ifade düzeyleri grafiği

CBF3 geninin çiçek dokularındaki ifade seviyeleri, stres koşullarına verilen tepkilerin genotipler arasında önemli farklılıklar gösterdiğini ortaya koymaktadır. Özellikle hassas genotipler arasında S-2, S-6 ve S-8 genotiplerinde çiçek dokularındaki ekspresyon seviyelerinin zamanla azaldığı gözlemlenmiştir. S-2 genotipinde 1 saatte 0,88 ekspresyon seviyesi, 48 saatte 0,41kat düşmüştür. Benzer şekilde, S-6 genotipinde ekspresyon seviyesi 1. saatte 0,75'kat 48. saatte 0,07'kat azalmış, S-8 genotipinde ise 1. saatte 0,90 kat 48. saatte 0,09 kat düşmüştür. Bu sonuçlar, hassas genotiplerde *CBF3* geninin çiçek dokularındaki ekspresyonunun stresin erken evrelerinde aktif olduğunu, ancak uzun vadede etkisinin hızla azaldığını göstermektedir.

Çizelge 4.26. R-5 çeşidinde çiçek dokularında genlerinin ifade düzeyleri ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)

Uygulama	<i>CBF1</i>	<i>CBF3</i>	<i>SIF3HL</i>
0	1	1	1
1	1,16	1,04	0,91
12	0,90	0,70	0,70
48	0,56	0,23	0,65



Şekil 4.25. Genlerin R-5 genotipinde çiçek dokularında ifade düzeyleri grafiği

Tolerant genotiplerde ise farklı bir desen gözlemlenmiştir. Örneğin, R-5

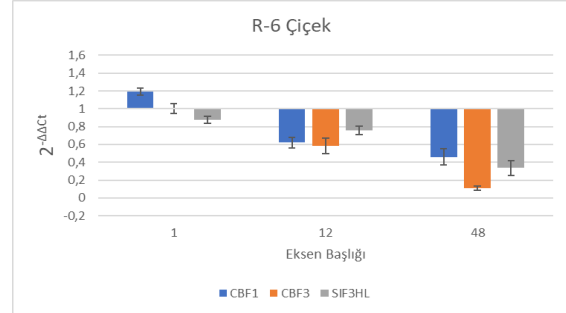
genotipinde *CBF3* ekspresyonu 1 saatte 1,04'kat yükselmiş, ancak 48 saat sonunda 0,23'kat düşmüştür. R-6 genotipinde ekspresyon seviyesi 1 saatte 1,00 kat seviyesini korumuş, fakat 48 saatte 0,11'e kadar gerilemiştir. R-7 genotipinde ise daha dengeli bir düşüş gözlemlenmiş, 1 saatte 1,02 olan ekspresyon seviyesi 48 saatte 0,41 kat olarak kalmıştır. Kontrol genotipi R-9'da da benzer bir durum gözlenmiş, ancak 48 saat sonunda ekspresyon seviyesi 0,27'ye düşmüştür. Bu veriler, tolerant genotiplerin çiçek dokularında *CBF3* ekspresyonunu daha uzun süre sürdürebildiğini ve stresle mücadelede daha etkili bir adaptasyon mekanizmasına sahip olduklarını göstermektedir.

Yaprak dokularındaki *CBF3* gen ekspresyon seviyeleri ile karşılaştırıldığında, genin dokular arası ifade düzeylerinde farklılıklar olduğu dikkat çekmektedir. Hassas genotiplerde yaprak dokularında da benzer şekilde ekspresyon seviyelerinin hızlı bir düşüş gösterdiği, tolerant genotiplerde ise daha dengeli bir azalma eğilimi olduğu görülmüştü. Ancak, çiçek dokularında gen ekspresyonunun stresin başlangıcında daha hızlı bir artış gösterdiği ve tolerans seviyesine bağlı olarak bu artışın sürdürülebilirliğinin değişiklik gösterdiği anlaşılmaktadır. Bu durum, bitkilerde *CBF3* geninin stres koşullarında doku spesifik olarak farklı tepkiler verebileceğini düşündürmektedir.

Literatürde, *CBF* gen ailesinin özellikle abiyotik streslere karşı bitki savunmasında önemli bir role sahip olduğu vurgulanmıştır. Örneğin, (Novillo vd. 2007), *CBF3* geninin düşük sıcaklık stresine maruz kalan *Arabidopsis* bitkilerinde hem yaprak hem de çiçek dokularında farklı ekspresyon paternleri sergilediğini rapor etmişlerdir. Çalışmalar, tolerant genotiplerin gen ekspresyonunu daha uzun süre yüksek seviyelerde tutarak osmoregülasyon ve hücre koruma mekanizmalarını aktive ettiğini göstermektedir. Bizim sonuçlarımız, bu literatür bulgularını destekler niteliktedir. Hem çiçek hem de yaprak dokularında gözlenen *CBF3* gen ekspresyon seviyelerinin, genotipin stres toleransı ile doğrudan ilişkili olduğu ve gen ekspresyonunun zamansal paterninin bu toleransı belirleyen kritik bir faktör olduğu söylenebilir.

Çizelge 4.27. R-6 çeşidinde çiçek dokularında genlerinin ifade düzeyleri ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)

Uygulama	<i>CBF1</i>	<i>CBF3</i>	<i>SIF3HL</i>
0	1	1	1
1	1,19	1,00	0,88
12	0,62	0,58	0,76
48	0,46	0,11	0,34

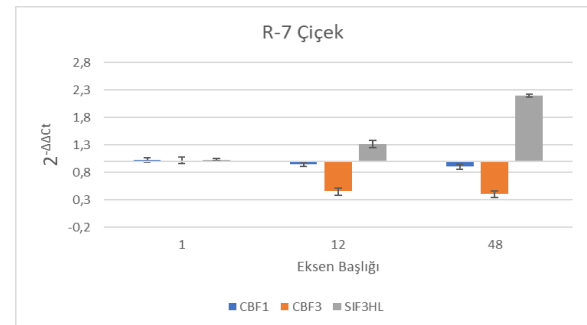


Şekil 4.26. Genlerin R-6 genotipinde çiçek dokularında ifade düzeyleri grafiği

Çiçek dokularında değerlendirilen *SIF3HL* geninin ifade düzeyleri, hassas ve tolerant genotipler arasında belirgin farklılıklar göstermektedir. Hassas genotiplerde (S-2, S-6 ve S-8), gen ifadesinin zamanla azalma eğiliminde olduğu dikkat çekmektedir. Örneğin, S-2 genotipinde 1 saatte 0,88 olan ifade düzeyi, 48 saate gelindiğinde 0,74'e gerilemiştir. Benzer şekilde, S-6 genotipinde 1 saatlik sürede 0,78 olarak ölçülen gen ifadesi, 48 saatte 0,60'a kadar düşmüştür. S-8 genotipinde ise gen ifadesinin başlangıçta 0,89 gibi yüksek bir seviyede olduğu ancak zamanla azalarak 48 saatte 0,78'e gerilediği görülmüştür. Bu durum, hassas genotiplerin stres koşullarına karşı daha sınırlı bir tepki verdiğini ve gen ifadesini uzun süre sürdüremediğini göstermektedir. Nitekim literatürde de benzer şekilde hassas genotiplerin stres koşullarında gen regülasyonunu sürdüremediği ve bu durumun fizyolojik yanıtları olumsuz etkilediği belirtilmiştir (Ma vd. 2017).

Çizelge 4.28. R-7 çeşidinde çiçek dokularında genlerinin ifade düzeyleri ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)

Uygulama	<i>CBF1</i>	<i>CBF3</i>	<i>SIF3HL</i>
0	1	1	1
1	1,03	1,02	1,03
12	0,95	0,46	1,32
48	0,90	0,41	2,20



Şekil 4.27. Genlerin R-7 genotipinde çiçek dokularında ifade düzeyleri grafiği

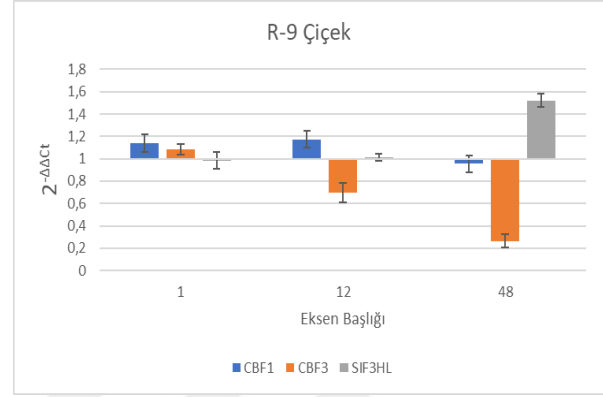
Tolerant genotiplerde ise gen ifadesinin dinamik bir seyir izlediği gözlenmiştir. R-5 genotipinde ifade düzeyleri, 1 saatte 0,91 kat artış ile yüksek bir başlangıç gösterirken, zamanla düşerek 48. saatte 0,65’kat gerilemiştir. R-6 genotipinde bu azalma daha belirgindir; 1 saatte 0,88 kat olan ifade düzeyi, 48 saatte 0,34’e kadar düşmüştür. Ancak dikkat çekici bir şekilde R-7 genotipi, diğer tolerant genotiplerden ayrılarak gen ifadesinde sürekli bir artış göstermiştir. Bu genotipte ifade düzeyi, 1 saatte 1,03’ten başlayarak 48 saatte 2,20’ye ulaşmıştır. Benzer şekilde R-9 genotipi, kontrollü bir artış sergileyerek 1 saatte 0,98, 12 saatte 1,01 ve 48 saatte 1,52 ifade düzeyi ile istikrarlı bir düzenleme mekanizmasına sahip olduğunu göstermiştir. Literatürde tolerant genotiplerin stres sinyallerini algıladıktan sonra genetik mekanizmalarını uzun süre aktif tutabildiği ve bu durumun bitkilerin adaptasyon yeteneklerini artırdığı ifade edilmiştir (Bhargava ve Sawant 2013). Özellikle R-7 genotipindeki bu güçlü ifade artışı, genin stres altındaki koruyucu ve düzenleyici rolünü açıkça ortaya koymaktadır.

Yaprak dokularında değerlendirilen *SIF3HL* gen ifadesi, çiçek dokularında gözlenen eğilimlerle benzerlikler taşımaktadır. Hassas genotiplerde zamanla azalan gen ifadesi, bu genotiplerin stresle başa çıkmada zayıf bir regülasyon gösterdiğini desteklemektedir. Buna karşılık, tolerant genotiplerde gen ifadesinin artış veya sabitleme eğilimi, bu genlerin daha etkin bir adaptif mekanizma geliştirdiğini ortaya koymaktadır. Örneğin, yaprak dokularında da R-7 genotipinde yüksek ifade artışları gözlenmiş, bu da onun güçlü bir stres dayanıklılığı profiline sahip olduğunu göstermiştir. Literatürde gen ifadesinin dokular arası değişkenliği, stres yanıtlarının çeşitliliği ile ilişkilendirilmiş ve bu durum bitkilerin çevresel zorluklara verdiği tepkilerin dokuya özgü olduğunu göstermiştir (Tack vd. 2020).

Genel olarak, *SIF3HL* geninin ifade düzeyleri genotipler arasında önemli farklılıklar sergilemekte ve bu durum, genotiplerin stres koşullarına karşı geliştirdiği adaptif mekanizmaların bir göstergesi olarak değerlendirilebilir. Hassas genotiplerdeki sınırlı gen regülasyonu, bu genotiplerin stres toleransını zayıflatırken, tolerant genotiplerin gen ifadelerini artırarak sürdürebilmesi, onların stres koşullarında üstün performans sergilemesine olanak tanımaktadır. Bu bulgular, stres toleransını artırmak için genetik iyileştirme çalışmalarında *SIF3HL* geninin önemini vurgulamaktadır.

Çizelge 4.29. R-9 çeşidinde çiçek dokularında genlerinin ifade düzeyleri ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)

Uygulama	<i>CBF1</i>	<i>CBF3</i>	<i>SIF3HL</i>
0	1	1	1
1	1,14	1,08	0,98
12	1,17	0,70	1,01
48	0,95	0,27	1,52



Şekil 4.28. Genlerin R-9 genotipinde çiçek dokularında ifade düzeyleri grafiği

5. SONUÇLAR

Bu araştırma, domates genotiplerinin düşük sıcaklık stresine karşı gösterdiği fenotipik, genotipik ve biyokimyasal tepkileri kapsamlı bir şekilde incelemiştir. Çalışmada elde edilen bulgular, düşük sıcaklık stresinin bitkiler üzerindeki etkilerinin önemli ölçüde fenotipik farklılıklarla ilişkili olduğunu ve bu farklılıkların genetik yapıya dayalı adaptasyon yeteneklerini yansıttığını göstermektedir. Genomik veriler, genetik yapının stres toleransı üzerindeki etkilerini açıkça ortaya koyarken, fenotipik veriler de bu genetik farklılıkların bitki morfolojisi ve fizyolojisi üzerindeki yansımalarını sergilemiştir. Bitkilerin fenotipe dayalı tepkileri ile genotipe dayalı verileri arasındaki ilişki karşılaştırılmıştır. Fenotipik değerlendirmeler, bitkilerin düşük sıcaklık stresine karşı morfolojik ve fizyolojik tepkilerini gösterirken, genotipik veriler ise bu tepkilerin arkasındaki genetik mekanizmaları ortaya koymuştur. Görsel Değerlendirme İndeksi (GDI), bitkilerin düşük sıcaklık koşullarına verdiği tepkilerin fenotipik göstergelerinden biri olarak kullanılmış ve sonuçlar, genotipik farklılıkların fenotipik değişimlere nasıl yansıdığını belirlemek açısından kritik bir rol oynamıştır. Çalışmanın bulguları, düşük sıcaklık stresine dayanıklılığın genetik ifadeler, oksidatif stres yönetimi ve fotosentetik aktivitenin korunması gibi çok boyutlu mekanizmalarla ilişkili olduğunu göstermiştir. Bu mekanizmalar, genotipler arasında belirgin farklılıklar sergilemiş ve özellikle “*CBF*” gen ailesi ve “*LePOD*” gibi genlerin kritik roller üstlendiğini ortaya koymuştur.

Düşük sıcaklık stresine yanıt veren en önemli genetik mekanizmalar arasında “*CBF1*” ve “*CBF3*” genleri yer almaktadır. Bu genler, stres sırasında bitkilerin soğuğa karşı metabolik ve fizyolojik süreçlerini düzenleyen transkripsiyon faktörleri olarak görev yapmaktadır. Tolerant genotiplerde (R-5, R-6, R-7 ve R-9), *CBF3* geninin ekspresyon seviyeleri, stresin başlangıcından itibaren hızlı bir artış göstermiş ve 48 saat boyunca yüksek seviyelerde kalmıştır. Özellikle R-7 genotipi, bu genin ekspresyonunda %220’lik bir artış sergileyerek düşük sıcaklık stresine karşı üstün bir genetik yanıt örneği göstermiştir. Bu genin aktivasyonu, hücrel zarların stabilizasyonu ve kriyoproteinlerin üretimi gibi süreçleri destekleyerek bitkilerin düşük sıcaklık koşullarında zarar görmesini engellemiştir. Hassas genotiplerde (S-2, S-6 ve S-8) bu genin düşük ekspresyon seviyeleri, stres sırasında hücrel zar bütünlüğünün bozulması ve fotosentetik etkinliğin kaybı ile sonuçlanmıştır.

Oksidatif stres yönetiminde kilit rol oynayan *LePOD* geninin ekspresyonu, tolerant genotiplerde daha yüksek seviyelerde gerçekleşmiştir. Bu durum, bu genotiplerin reaktif oksijen türlerini (ROS) etkili bir şekilde temizleyerek hücrel zararları minimize ettiğini göstermektedir. Örneğin, R-5 ve R-6 genotiplerinde bu genin ekspresyon seviyeleri sırasıyla 1,27 ve 1,49 kat oranında artış göstermiştir. Buna karşın, hassas genotiplerde düşük *LePOD* ekspresyonu, oksidatif hasarın artmasına ve bitki gelişiminin gerilemesine yol açmıştır. *SISNAT* ve *SIF3HL* genlerinin düşük sıcaklık stresine karşı gösterdiği yanıtlar, genetik dayanıklılığı daha iyi anlamak açısından önemli bulgular sunmuştur. Özellikle R-9 genotipinde, *SISNAT* geninin 3,48 ct’lik ekspresyon artışı, bu genin stres koşullarında enerji metabolizmasını düzenleyerek bitkinin adaptasyon kapasitesini artırdığını göstermiştir.

Fizyolojik ve biyokimyasal tepkiler bakımından düşük sıcaklık stresinin bitki gelişimi üzerindeki en belirgin etkilerinden biri, fotosentetik aktivitenin azalmasıdır. Ön değerlendirme kriterlerinin sunduğu bulgulara göre, düşük sıcaklık stresine karşı R-5, R-6, R-7, R-9 gibi tolerant genotipler, daha az yaprak deformasyonu, daha düşük su kaybı ve daha iyi klorofil içeriği ile diğer genotiplere kıyasla daha dayanıklı olduklarını göstermiştir. Bu genotiplerin fenotipik özellikleri, düşük sıcaklık stresinin etkilerini minimize etme ve fotosentetik aktiviteyi sürdürme kapasitesini yansıtmaktadır. Özellikle R-9 genotipi, düşük sıcaklık koşullarına karşı gösterdiği olağanüstü dayanıklılık ile dikkat çekmiştir. Tolerant genotiplerde, klorofil seviyeleri stres sırasında büyük ölçüde korunmuş ve fotosentetik etkinlik sürdürülebilmıştır. Özellikle R-7 ve R-9 (kontrol) genotipleri, stresin 7. gününde klorofil içeriklerinde toparlanma eğilimi göstermiştir. Bu durum, fotosentetik mekanizmaların düşük sıcaklık koşullarında bile aktif kaldığını göstermektedir. Buna karşın, hassas genotiplerde klorofil seviyelerindeki hızlı düşüş, fotosentetik etkinliğin ciddi şekilde zarar gördüğünü ortaya koymuştur.

Oksidatif stres ve zar hasarı en iyi temsil edecek Malondialdehit (MDA) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) analizleri, düşük sıcaklık stresine maruz kalan bitkilerde oksidatif stresin şiddetini değerlendirmek için kullanılmıştır. Tolerant genotiplerde, bu parametrelerin daha düşük seviyelerde olması, hücrel zarların stabilitesinin korunduğunu ve oksidatif stres yönetiminde daha etkili mekanizmaların devreye girdiğini göstermektedir. Örneğin, R-5 genotipinde MDA seviyelerinin kontrol grubuna kıyasla %35 daha düşük olduğu belirlenmiştir.

Düşük sıcaklık stresinin çimlenme üzerine etkileri, tolerant genotiplerin adaptasyon kapasitelerini vurgulamıştır. R-5, R-6 ve R-9 (kontrol) genotipleri, 3°C ve 13°C'deki çimlenme deneylerinde yüksek çimlenme oranları göstermiştir. Bu genotiplerin genetik yapılarındaki adaptif mekanizmalar, düşük sıcaklık koşullarında bile metabolik süreçlerini sürdürebilme yeteneklerini ortaya koymuştur. Hassas genotiplerde ise düşük sıcaklık uygulaması ile çimlenme oranlarının belirgin şekilde düştüğü gözlemlenmiştir. Düşük sıcaklık stresine dayanıklı genotiplerin belirlenmesi, tarımsal üretimde sürdürülebilirlik sağlamak açısından kritik bir öneme sahiptir. Ayrıca, çiçeklenme ve meyve gelişimi üzerine yapılan gözlemler, düşük sıcaklıkların domateste meyve tutumu ve şekil bozukluğu üzerinde önemli olumsuz etkiler yarattığını göstermiştir. Tolerant genotiplerde, düşük sıcaklığın etkileri daha sınırlı iken, hassas genotiplerde meyve tutumu oranı azalmış ve şekil bozuklukları gözlemlenmiştir. R-9, R-5 ve R-7 genotipleri, çiçeklenme dönemi boyunca düşük sıcaklık etkilerine karşı daha dayanıklı olmuş, meyve gelişimi üzerinde daha az olumsuz etki gözlemlenmiştir.

Bu çalışma sonucunda, *CBF* gen ailesi ve *LePOD* gibi genlerin yüksek ekspresyon gösterdiği genotiplerin dahil olduğu programlar ile düşük sıcaklık toleransı öznesinde ıslah programları düzenlenebileceği ortaya çıkmıştır. Bu noktada tolerant genotiplerin geniş çaplı denemeleri ile tarımsal üretimdeki potansiyellerini doğrulamak mutlaka gereklidir.

Bu çalışmanın devamında düşük sıcaklık toleransını belirleyen moleküler mekanizmalar, omik yaklaşımlar (genomik, transkriptomik ve proteomik) kullanılarak

daha ayrıntılı bir şekilde incelenmelidir. Tolerant genotiplerin genetik yapılarının epigenetik düzenlemeleri, stres yanıtlarının sürdürülebilirliğini artırma potansiyeline sahiptir. Bu çalışmanın bulguları, çevresel streslere dayanıklı yeni bitki çeşitlerinin geliştirilmesi için bir yol haritası sunmaktadır.

Bu araştırma, genetik mekanizmaların düşük sıcaklık stresine karşı dayanıklılığın temelinde yer aldığını ve tolerant genotiplerin bu mekanizmaları etkin bir şekilde kullandığını göstermiştir. Özellikle *CBF* gen ailesi ve *LePOD* gibi genler, düşük sıcaklık toleransını artırmada kritik rol oynamıştır. Bu genotiplerin tarımsal uygulamalarda kullanımı, stres koşullarında yüksek verimlilik sağlamak için büyük bir potansiyel taşımaktadır. Sonuç olarak, bu çalışmada, düşük sıcaklık stresine karşı tolerant yeni domates çeşitlerinin geliştirilmesine katkı sağlayabilecek temel bilgiler elde edilmiş ve ileride yapılacak genetik haritalama ve markör geliştirme çalışmalarında kullanılabilecek materyal ve yol gösterici olma potansiyeli taşıyan aday genler belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar değişen iklim koşullarında sürdürülebilir tarıma katkı sağlayacak niteliktedir.

6. KAYNAKLAR

- 100 Tomato Genome Sequencing Consortium, Aflitos, S., Schijlen, E., de Jong, H., deRidder, D., Smit, S., Peters, S., 2014. Exploring genetic variation in the tomato (*Solanum section Lycopersicon*) clade by whole-genome sequencing. *The Plant Journal*, 80(1): 136-148.
- Adams, G., 2020. A beginner's guide to RT-PCR, qPCR ve RT-qPCR. *Biochemist*, 42(3): 48–53.
- Adams, S. R., Cockshull, K. E., Cave, C. R. J., 2001. Effect of temperature on the growth and development of tomato fruits. *Annals of botany*, 88(5): 869-877.
- Agarwal, M., Hao, Y.J., Kapoor, A., Dong, C.H., Fujii, H., Zheng, X.W., Zhu, J.K., 2006. A R2R3 type MYB transcription factor is involved in the cold regulation of CBF genes and in acquired freezing tolerance. *Journal of Biology and Chemistry*. 28(49):37636–37645.
- Akman, Y., Küçüködük, M., Düzenli, M., Tuğ, G. N., 2001. *Bitki Fizyolojisi*. 708- 747. Ankara.
- Allen, D.J., and Ort, D.R., 2001. Impacts of chilling temperatures on photosynthesis in warm-climate plants. *Trends in Plant Science* (6): 36–42.
- Anonim 2017. Safety Assessment Of Transgenic Organisms In The Environment: Oecd Consensus Documents, Volume 7 Chapter 2 Tomato. 71 p.
- Anonim 2: <https://arastirma.tarimorman.gov.tr/tepge/Belgeler/PDF%20Tarim%20Ürünleri%20Piyasaları/2021-Haziran%20Tarim%20Ürünleri%20Raporu/Domates,%20Haziran-2021,%20Tarim%20Ürünleri%20Piyasa%20Raporu,%20TEPGE.pdf> [Son erişim tarihi: 17.06.2024]
- Apel, K., Hirt, H., 2004. REACTIVE OXYGEN SPECIES: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 55: 373–399.
- Aydinoğlu, F., Akgül, B., 2019. Mısır (*Zea mays* L.) bitkisinin üşüme stresine toleransı sırasında yaprak büyüme bölgelerinde mikroRNA aracılıklı redoks regülasyonunun incelenmesi. *Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi*, 34(2): 172-183.
- Bai, Y.L., Lindhout, P., 2007. Domestication and breeding of tomatoes: What have we gained and what can we gain in the future? *Ann. Bot.* 100: 1085–1094
- Barone, A., Chiusano, M. L., Ercolano, M. R., Giuliano, G., Grandillo, S., Frusciante, L., 2008. Structural and functional genomics of tomato. *International journal of plant genomics*, (1): 820274.

- Barrero-Gill, J., Huertas, R., Rambla, J.L., Granell, A., Salinas, J., 2016. Tomato Plants Increase Their Tolerance To Low Temperature in a Chilling Acclimation Process Entailing Comprehensive Transcriptional and Metabolic Adjustments. *Plant, Cell and Environment* 39: 2303–2318.
- Barten, J. H. M., Scott, J. W., Kedar, N., Elkind, Y., 1992. Low temperatures induce rough blossom-end scarring of tomato fruit during early flower development. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 117(2): 298-303.
- Bhargava, S., and Sawant, K., 2013. Drought stress adaptation: metabolic adjustment and regulation of gene expression. *Plant breeding*, 132(1): 21-32.
- Blancard, D., 2012. *Tomato diseases* San Diego, CA, USA. Academic Press. 556-560 p.
- Caffagni, A., Pecchioni, N., Francia, E., Pagani, D., Milc, J., 2014. Candidate gene expression profiling in two contrasting tomato cultivars under chilling stress. *Biologia Plantarum*, 58: 283-295.
- Cao, X., Wu, Z., Jiang, F., Zhou, R., Yang, Z., 2014. Identification of chilling stress-responsive tomato microRNAs and their target genes by high-throughput sequencing and degradome analysis. *BMC Genomics*. (15):1130
- Cao, X., Jiang, F., Wang, X., Zang, Y., Wu, Z., 2015. Comprehensive evaluation and screening for chilling-tolerance in tomato lines at the seedling stage. *Euphytica*, 205(2): 569-584.
- Causse, M., Damidaux, R., Rousselle, P., 2007. Traditional and enhanced breeding for quality traits in tomato. *Genetic improvement of Solanaceous crops*, 2: 153-192.
- Çelik, İ., Kabaş, A., 2021. *Yazlık Sebze Islahı Kitabı 2. Bölüm. Domates Islahı*. 65 s.
- Chaudhary, J., Khatri, P., Singla, P., Kumawat, S., Kumari, A., Vikram, A., Deshmukh, R., 2019. Advances in omics approaches for abiotic stress tolerance in tomato. *Biology*, 8(4): 90.
- Chen, H., Chen, X., Chen, D., Li, J., Zhang, Y., Wang, A. 2015. A comparison of the low temperature transcriptomes of two tomato genotypes that differ in freezing tolerance: *Solanum lycopersicum* and *Solanum habrochaites*. *BMC Plant Biology* 15:132. DOI 10.1186/s12870-015-0521-6
- Chi, C., Li, X., Fang, P., Xia, X., Shi, K., Zhou, Y., Yu, J., 2020. Brassinosteroids act as a positive regulator of NBR1-dependent selective autophagy in response to chilling stress in tomato. *Journal of experimental botany*, 71(3): 1092-1106.
- Chitwood-Brown, J., Vallad, G. E., Lee, T. G., Hutton, S. F., 2021. Breeding for resistance to Fusarium wilt of tomato: A review. *Genes*, 12(11): 1673.

- Ciftci-Yilmaza, S., Mittler, R., 2008. The zinc finger network of plants. *Cell Mol Life Sci* 65:1150–1160
- Cooper, D. C., 1927. Anatomy and development of tomato flower. *Botanical Gazette*, 83(4), 399-411.
- Çömlekçioğlu, N., ve Şimşek, M., 2014. Yüksek sıcaklık koşullarında ve farklı su seviyesinde gibberellik asidin (GA3) sanayi domatesinde meyve tutumuna etkisi. *Yuzuncu Yıl University Journal of Agricultural Sciences*, 24(3): 270-279.
- Daşgan, H.Y., Abak, K. Ve Baytorun, N., 1994. İki farklı gece sıcaklığına sahip serada yetisen domates bitkilerinin çiçek tozu canlılık ve çimlenmeleri. *Türkiye II. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi Adana, Cilt II*, 12-16s.
- Demir, Ö., Ünlü, H., 2023. Bazı Beef Tipi Domates Hatlarının Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi. *Isparta U.B.Ü. Zir. Fak. Dergisi*, Cilt 18, Sayı 1: 59-65
- Demirkaya, M., 2017. Metil Jasmonat ve Deniz Yosunu (*Ascophyllum nodosum*) Ekstraktı ile Yapılan Ozmotik Koşullandırma Uygulamalarının Düşük Sıcaklıkta Domates Tohumlarının Çimlenme, Ortalama Çimlenme Süresi ve Çimlenme İndeksi Üzerine Etkileri. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Fen Bilimleri Dergisi*, 33(3): 83-89
- Ding, C.K., Wang, C.Y., Gross, K.C., Smith, D.L. 2002. Jasmonate and salicylate induce the expression of pathogenesis-related-protein genes and increase resistance to chilling injury in tomato fruit. *Planta*, Vol. 214, No. 6, pp. 895-901
- Ding, F., Ren, L., Xie, F., Wang, M., Zhang, S., 2022. Jasmonate and melatonin act synergistically to potentiate cold tolerance in tomato plants. *Frontiers in plant science*, 12, 763284.
- Doğru, A., 2019. Bitkilerde Düşük Sıcaklık Stresi ve Soğuğa Uyum. *Journal of Nat. & App. Sci.* 2-1: 45-52.
- Elkelish, A., Qari, S. H., Mazrou, Y. S., Abdelaal, K. A., Hafez, Y. M., Abu-Elsaoud, A. M., El Nahhas, N., 2020. Exogenous ascorbic acid induced chilling tolerance in tomato plants through modulating metabolism, osmolytes, antioxidants, and transcriptional regulation of catalase and heat shock proteins. *Plants*, 9(4): 431.
- Fang, P., Wang, Y., Wang, M., Wang, F., Chi, C., Zhou, Y., Yu, J., 2021. Crosstalk between brassinosteroid and redox signaling contributes to the activation of CBF expression during cold responses in tomato. *Antioxidants*, 10(4): 509.
- Fernandez, P., Rienzo, J.D., Fernandez, L., Hopp, H.E., Paniego, N., Heinz, R.A. 2008. Transcriptomic identification of candidate genes involved in sunflower responses to chilling and salt stresses based on cDNA microarray analysis. - *BMC Plant Biology*. 8:11.

- Foolad, M.R., Lin, G.Y., 1998. Genetic analysis of low-temperature tolerance during germination in tomato, *Lycopersicon esculentum* Mill. Plant Breeding 117: 171-176
- Foolad M.R., 2007. Tolerance to Abiotic Stresses. In: Razdan M.K. and Mattoo A.K. (Eds) Genetic Improvement of Solanaceous Crops: Tomato 523 p.
- Fracheboud, Y., Haldimann, P., 1994. Photosynthetic traits of maize during early development in the field. Crop adaptation to cool climates. ECSP-EEC-EAEC, Brüksel 467–474s.
- Gascuel, Q., Diretto, G., Monforte, A. J., Fortes, A. M., Granell, A., 2017. Use of natural diversity and biotechnology to increase the quality and nutritional content of tomato and grape. Frontiers in plant science, 8: 250157.
- Gilmour, S.J., Sebolt, A.M., Salazar, M.P., Everard, J.D., Thomashow, M.F., 2000. Overexpression of the Arabidopsis CBF3 transcriptional activator mimics multiple biochemical changes associated with cold acclimation. Plant Physiology. 124: 1854-1865.
- Gökmen, Ö.Ö., 2006. Domateste Soğuk Stresinin Antioksidatif Mekanizmalar Yönünden Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana, 60 s.
- Gould, W.A., 1983. Tomato Production, Processing and Quality Evaluation, 2ed. AVI Publishing Company, Inc. Westport, CT. pp 3-50.
- He, L.G., Wang, H.L., Liu, D.C., Zhao, Y.J., Xu, M., Zhu, M., Wei, G.Q., Sun Z.H. 2012. Isolation and expression of a cold responsive gene PtCBF in Poncirus trifoliata and isolation of citrus CBF promoters. - Biol. Plant. 56: 484-492.
- Hedhly, A., 2011. Sensitivity of flowering plant gametophytes to temperature fluctuations. Environmental and Experimental Botany, 74: 9-16.
- Hsu, C. C., Zhu, Y., Arrington, J. V., Paez, J. S., Wang, P., Zhu, P., Tao, W. A. 2018. Universal plant phosphoproteomics workflow and its application to tomato signaling in response to cold stress. Molecular & Cellular Proteomics, 17(10), 2068-2080.
- Hu, T., Wang, Y., Wang, Q., Dang, N., Wang, L., Liu, C., Zhan, X., 2019. The tomato 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase gene SlF3HL is critical for chilling stress tolerance. Horticulture research, 6.
- Iqbal, M., Ahmad, W., Shafi, J., Ayub, C. M., Atiq, M., Shahid, M., Saleem, M., 2013. Comparative genetic variability and heritability in some tomato varieties against fruit borer, shape disorders and their correlation. Bioengineering and Bioscience, 1(2): 17-23.

- İnak, E., Özdemir, E., Alpkent, Y. N., İnak, A., Özkan, C., 2019. Entegre zararlı yönetimi ve gelişmekte olan ülkelerdeki durumu. *Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, 23(1): 120-130.
- Junglee, S., Urban, L., Sallanon, H., Lopez-Lauri, F., 2014. Optimized Assay for Hydrogen Peroxide Determination in Plant Tissue Using Potassium Iodide. *Am J Anal Chem* (5):730–736.
- Kaloo, G. (Ed.). 2012. Genetic improvement of tomato (Vol. 14). 4-9 p. Springer Science & Business Media.
- Kandel, D. R., Marconi, T. G., Badillo-Vargas, I. E., Enciso, J., Zapata, S. D., Lazcano, C. A., Crosby, K., Avila, C. A., 2020. Yield and fruit quality of high-tunnel tomato cultivars produced during the off-season in South Texas. *Scientia Horticulturae*, 272: 109582
- Kaur, G., Abugu, M., Tieman, D., 2023. The dissection of tomato flavor: biochemistry, genetics, and omics. *Frontiers in Plant Science*, 14: 1144113.
- Kıran, S., Kuşvuran, Ş., Özkay, F., Ellialtıoğlu, Ş. Ş., 2015. Domates, patlıcan ve kavun genotiplerinin kuraklığa dayanım durumlarını belirlemeye yönelik olarak incelenen özellikler arasındaki ilişkiler. *Nevşehir Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 4(2): 9-25.
- Kimura, S., Sinha, N., 2008. Tomato (*Solanum lycopersicum*): a model fruit-bearing crop. *Cold Spring Harbor Protocols*, 11:105.
- Kissoudis, C., Chowdhury, R., van Heusden, S., van de Wiel, C., Finkers, R., Visser, R. G., van der Linden, G., 2015. Combined biotic and abiotic stress resistance in tomato. *Euphytica*, 202: 317-332.
- Klee, H. J., Giovannoni, J. J., 2011. Genetics and control of tomato fruit ripening and quality attributes. *Annual review of genetics*, 45(1): 41-59
- Knapp, S., Peralta, I. E., 2016. The tomato (*Solanum lycopersicum* L., *Solanaceae*) and its botanical relatives. *The tomato genome*, 7-21.
- Knight, M. R., Knight, H., 2012. Low-temperature perception leading to gene expression and cold tolerance in higher plants. *New Phytologist*, 195(4): 737-751.
- Løvda, T., and Lillo, C., 2009. Reference gene selection for quantitative real-time PCR normalization in tomato subjected to nitrogen, cold, and light stress. *Analytical biochemistry*, 387(2): 238-242.
- Li, X., Li, Y., Ahammed, G. J., Zhang, X. N., Ying, L., Zhang, L., Han, W. Y., 2019. RBOH1-dependent apoplastic H₂O₂ mediates epigallocatechin-3-gallate-induced abiotic stress tolerance in *Solanum lycopersicum* L. *Environmental and*

experimental botany, 161: 357-366.

- Liang, G., He, H., Nai, G., Feng, L., Li, Y., Zhou, Q., Ma, Z., Yue, Y., Chen, B., Mao, J. 2021. Genome-wide identification of BAM genes in grapevine (*kmlö* L.) and ectopic expression of VvBAM1 modulating soluble sugar levels to improve low-temperature tolerance in tomato. BMC Plant Biology 21:156 <https://doi.org/10.1186/s12870-021-02916-8>
- Lin, T., Zhu, G., Zhang, J., Xu, X., Yu, Q., Zheng, Z., Huang, S., 2014. Genomic analyses provide insights into the history of tomato breeding. Nature genetics, 46(11): 1220-1226.
- Li-yun, Z. H. U., Zai-qiang, Y. A. N. G., Jun, L. I., & Qin, W. A. N. G., 2017. Effect of low temperature and weak light at flowering stage on flower-fruit characteristics of tomato. Chinese Journal of Agrometeorology, 38(07): 456.
- Luria, N., Smith E., Reingold, V., Bekelman, I., Lapidot, M., Levin, I., 2017. A new Israeli Tobamovirys isolate infects tomato plants harboring TM-22 resistance genes. pLoS One 12(1): e0170429
- Lyons, J.M., 1973. Chilling injury in plants. Annual Review of Plant Physiology, 24; 445-466.
- Ma, X., Wang, G., Zhao, W., Yang, M., Ma, N., Kong, F., Meng, Q., 2017. SICOR413IM1: a novel cold-regulation gene from tomato, enhances drought stress tolerance in tobacco. Journal of plant physiology, 216: 88-99.
- Macedo, N. J., Ferreira, T. L., 2014. Maximizing total RNA yield from TRIzol reagent protocol: a feasibility study. In ASEE zone I conference (pp. 1-8). University of Bridgeport.
- Meena, Y.K., Khurana, D.S., Kaur, N., Singh, K., 2017. Towards enhanced low temperature stress tolerance in tomato: An approach. Journal of Environmental Biology 39: 529-535.
- Mesa, T., Polo, J., Arabia, A., Caselles, V., Munné-Bosch, S., 2022. Differential physiological response to heat and cold stress of tomato plants and its implication on fruit quality. Journal of Plant Physiology, 268: 153581.
- Monforte, A. J., Diaz, A., Caño-Delgado, A., Van Der Knaap, E., 2013. The genetic basis of fruit morphology in horticultural crops: lessons from tomato and melon. Journal of Experimental Botany, 65(16): 4625-4637.
- Morsy, M.R., Almutairi, A.M., Gibbons, J., Yun, S.J., De los Reyes, B.G. 2005. The OsLti6 genes encoding low-molecular weight membrane proteins are differentially expressed in rice cultivars with contrasting sensitivity to low temperature. - Gene 344: 171-180,

- Mueller, L. A., Lankhorst, R. K., Tanksley, S. D., Giovannoni, J. J., White, R., Vrebalov, J., Stiekema, W., 2009. A snapshot of the emerging tomato genome sequence. *The Plant Genome*, 2(1).
- Nafees, K., Kumar, M., Bose, B., 2019. Effect of different temperatures on germination and seedling growth of primed seeds of tomato. *Russian Journal of Plant Physiology*, 66: 778-784.
- Nagamine, A., Ezura, H., 2022. Genome editing for improving crop nutrition. *Frontiers in Genome Editing*, 4: 850104.
- Novillo, F., Medina, J., Salinas, J., 2007. Arabidopsis CBF1 and CBF3 have a different function than CBF2 in cold acclimation and define different gene classes in the CBF regulon. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(52): 21002-21007.
- Nuez, F., (2001), *El Cultivo del Tomate*, Ediciones. 793 p.
- Tack, D. C., Su, Z., Yu, Y., Bevilacqua, P. C., Assmann, S. M., 2020. Tissue-specific changes in the RNA structurome mediate salinity response in Arabidopsis. *RNA*, 26(4): 492-511.
- Tatsumi, Y., Murata, T., 1981. Relation between chilling sensitivity of cucurbitaceae fruit and the membrane permeability. *Soc Hortic Sci* 50:108–113
- Tepe, A., Kabaş, A., 2019. Determination of low temperature tolerances of some tomato genotypes. *Derim*, 36(2):118-123.
- Thompson, D.S., 2001. Extensiometric determination of the rheological properties of the epidermis of growing tomato fruit, *Journal Experimental Biotechnology*. Vol.52: 1291-1301.
- Thomashow, M.F. 2010. Molecular basis of plant cold acclimation: Insights gained from studying the CBF cold response pathway. *Plant Physiology.*, 154, 571–577.
- Tomato Genome Consortium, X. 2012. The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature*, 485(7400): 635.
- TÜİK, 2024. Bitkisel Üretim İstatistikleri <https://data.tuik.gov.tr/Kategori/GetKategori?p= tarim-111> [Son erişim tarihi: 10.06.2024]
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.*, 95: 351-358.
- Olson, S. M., 2004. Physiological, nutritional, and other disorders of tomato fruit. *EDIS*, (3).
- Pavan, S., van Heusden, A. W., Bai, Y., 2009. *Solanum lycopersicum* (tomato).

Encyclopedia of Life Sciences. s.3

- Prohens, J., and Nuez, F., 2008. Vegetables II: Fabaceae, Liliaceae, Solanaceae and Umbelliferae. Springer Science and Business Media, LLC ISBN: 978-0-387-74108-6 e-ISBN: 978-0-387-74110-9.
- Rahman, H.U., Hadley, P., Pearson, S., Khan, M.J., 2013. Response of cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis*) growth and development after curd initiation to different day and night temperatures. Pakistan Journal Bot 45: 411–420
- Ranc, N., Muños, S., Xu, J., Le Paslier, M. C., Chauveau, A., Bounon, R., Causse, M., 2012. Genome-wide association mapping in tomato (*Solanum lycopersicum*) is possible using genome admixture of *Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*. G3: Genes| Genomes| Genetics, 2(8): 853-864.
- Rick, C.M., 1960. Hybridization between *Lycopersicon esculentum* and *Solanum pennellii*: phylogenetic and cytogenetic significance. Proc. Natl. Acad. Sci. 46: 78–82
- Rick, C.M., 1973. Potential genetic resources in tomato species: Clues from observation innative habitats. Genes, Enzymes, and Populations, Plenum, Newyork, pp. 255-269.
- Rick, C.M., 1979. Potential improvement of tomatoes by controlled introgression of genes from wild speies, Proc Conf Broadening Genetic Base of Crops. Pudoc Wageningen, pp. 167-173.
- Rymen, B., Fiorani, F., Kartal, F., Vandepoele, K., Inze, D., Beemster, G. T. S., 2007. Cold nights impair leaf growth and cell cycle progression in maize through transcriptional changes of cell cycle genes. Plant Physiology, 143 (3): 1429-1438.
- Sadashiva, A. T., Hanson, P., Reddy, M. K., Ravishankar, K. V., Manoj Prasad, M. P., Prasanna, H. C., Lasya Bhat, L. B., 2017. Breeding tomato (*Solanum lycopersicum* L.) for resistance to biotic and abiotic stresses.
- Scandalios, J.G., 2005. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 38: 995-1014.
- Seong, E. S., Kwon, S. U., Ghimire, B. K., Yu, C. Y., Cho, D. H., Lim, J. D., Lee, Y. S., 2008. LebZIP2 induced by salt and drought stress and transient overexpression by *Agrobacterium*. BMB reports, 41(10): 693-698.
- Sharma, P., Thakur, S., Negi, R., 2019. Recent advances in breeding of tomato—a review. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 8(3): 1275-1283.

- Smith, J. D., Dubois, T., Mallogo, R., Njau, E. F., Tua, S., Srinivasan, R., 2018. Host range of the invasive tomato pest *Tuta absoluta* Meyrick (*Lepidoptera: Gelechiidae*) on Solanaceous crops and weeds in Tanzania. *Florida Entomologist*, 101: 573–579.
- Tanksley, S.D., Ganai, M.W., Martin, G.B., 1995. Chromosome landing: a paradigm for map-based gene cloning in plants with large genomes. *Trends Genet.* 11: 63-68.
- Taylor, J. B., 1986. Biosystematic of the tomato in J. G. Atherton and J. Rudich (eds.) *The tomato crop: A scientific basis for improvement*, pp. 1-34.
- Tepe, A., Kabaş, A., Gözen, V., Demirtaş, I., Topçu, V., Çınar, O. 2018. Islah Programlarında Kullanılacak Domates Hatlarının Düşük Sıcaklıklara Tolerans Düzeylerinin Belirlenmesi. Proje Sonuç Raporu. TAGEM/BBAD/16/A09/P01/01
- Quezada, E.T., Taveras, R.J.G., Cruz, S.P., 2023. VCE Publications SPES spes-508 Basic Tomato (*Lycopersicon esculentum*) Physiology and Morphology s. 2. <https://www.pubs.ext.vt.edu/SPES/spes-508/spes-508.html#:~:text=Tomato%20stems%20have%20leaf%20axils,apical%20bud%20or%20shoot%20tip>. [Son erişim tarihi: 18.06.2024]
- Ouyang, Z., Tian, J., Yan, X., Shen, H., 2021. Effects of different concentrations of dissolved oxygen on the growth, photosynthesis, yield and quality of greenhouse tomatoes and changes in soil microorganisms. *Agricultural Water Management*, 245, 106579.
- Venema, J.H., Posthumus, F., Van Hasselt, P.R., 1999. Impact of Suboptimal Temperature on Growth, Photosynthesis, Leaf Pigments and Carbohydrates of Domestic and High-altitude Wild *Lycopersicon* Species. *j. Plant Physiol.* Vol. 155. pp. 711-718
- Wang, X.X., Li, S.D., Dong, H.R., Gao, Z.H., Dai, S.S., 1996. Effect of low temperature stress on several properties of tomato during seedling and florescence. *Acta Horti Sin* 23: 349–354
- Wang, M., Hao, J., Chen, X., Zhang, X., 2020. SIMYB102 expression enhances low-temperature stress resistance in tomato plants. *PeerJ*, 8, e10059.
- Wang, M., Zhang, S., Ding, F., 2020. Melatonin mitigates chilling-induced oxidative stress and photosynthesis inhibition in tomato plants. *Antioxidants*, 9(3): 218.
- Wang, X., Zhang, H., Xie, Q., Liu, Y., Lv, H., Bai, R., Zhang, N., 2020. SISNAT interacts with HSP40, a molecular chaperone, to regulate melatonin biosynthesis and promote thermotolerance in tomato. *Plant and Cell Physiology*, 61(5): 909-921.
- Went, F. W., 1944. Morphological observations on the tomato plant. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, 77-92.

- Yegül, M., ve Baloğlu, S., 2020. Farklı Zamanlarda Örneklenen Bademlerden ve Farklı Ekstraksiyon Yöntemleri ile Ceviz Örneklerinden Elde Edilen Total Nükleik Asitlerde RNA Miktarı ve Parametrelerinin Karşılaştırılması. *Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi*, 7(1): 10-15.
- Yılmaz, M., Kavak, S., Baysal, Ö., 2014. Bazı ticari sabit ve uçucu yağların domates bakteriyel kanser ve solgunluk etmeni üzerine antibakteriyel etkileri. *Derim*, 31(1): 50-60.
- Yu, C., Song, L., Song, J., Ouyang, B., Guo, L., Shang, L., Ye, Z., 2018. ShCIGT, a Trihelix family gene, mediates cold and drought tolerance by interacting with SnRK1 in tomato. *Plant Science*, 270: 140-149.
- Yu, Z., Xu, Q., Xiao, C., Li, H., Wu, W., Du, W., Liu, C., 2021. SYBR Green real-time qPCR method: Diagnose drowning more rapidly and accurately. *Forensic science international*, 321: 110720.
- Yuasa, T., Nakamura, J., Ishibashi, Y., Iwaya-Inoue, M., 2014. Tomato inducer of CBF expression 1 (SlICE1) is involved in cold and salt stress signaling. *American Journal of Experimental Agriculture*, 4(7): 785-796.
- Zamir, D., Tanksley, S.D., Jones, R.A., 1981. Low Temperature Effect on Selective Fertilization by Pollen Mixtures of Wild and Cultivated Tomato Species *Theor. Appl. Genet.* 59: 235-238
- Zamir, D., Gadish, I., 1987. Pollen selection for low temperature adaptation in tomato. *Theor. Appl. Genet.* 74: 545-548
- Zamir, D., Ekstein-Michelson, I., Zakay, Y., Navot, N., Zeidan, M., Sarfatti, M., Eshed, Y., Harel, E., Pleban, T., van-Oss, H., Kedar, N., Rabinowitch, H.D., Czosnek, H., 1994. Mapping and introgression of a Tomato yellow leaf curl virus tolerance gene, Ty-1. *Theor Appl Genet.* 88: 141-146.
- Zhang, X., Fowler, S. G., Cheng, H., Lou, Y., Rhee, S. Y., Stockinger, E. J., Thomashow, M. F., 2004. Freezing-sensitive tomato has a functional CBF cold response pathway, but a CBF regulon that differs from that of freezing-tolerant Arabidopsis. *The Plant Journal*, 39(6): 905-919.
- Zhang, L., Guo, X., Zhang, Z., Wang, A., Zhu, J., 2021. Cold-regulated gene LeCOR413PM2 confers cold stress tolerance in tomato plants. *Gene*, 764: 145097.
- Zhang, Y., Peng, Y., Liu, J., Yan, J., Zhu, K., Sun, X., Li, T., 2023. Tetratricopeptide repeat protein SIREC2 positively regulates cold tolerance in tomato. *Plant Physiology*, 192(1): 648-665.
- Zhao, J., Sauvage, C., 2019. Meta-analysis of genome-wide association studies provides

insights into genetic control of tomato flavor. *Nat Commun* 10: 1534

- Zhou, J., Xia, X.J., Zhou, Y.H., Shi, K., Chen, Z., Yu, J.Q., 2014. RBOH1-dependent H₂O₂ production and subsequent activation of MPK1/2 play an important role in acclimation-induced cross-tolerance in tomato. *Journal of Exp Botanic.*, 65, 595–607.
- Zhuang, K., Wang, J., Jiao, B., Chen, C., Zhang, J., Ma, N., Meng, Q., 2020. WHIRLY1 maintains leaf photosynthetic capacity in tomato by regulating the expression of RbcS1 under chilling stress. *Journal of Experimental Botany*, 71(12): 3653-3663.
- Zorzoli, R., Pratta, G. R., Rodríguez, G. R., Picardi, L. A., 2007. Advances in biotechnology: tomato as a plant model system. *Functional Plant Science and Biotechnology*, 1(1): 146-159.
- Zou CS, Jiang WB, Yu DQ., 2010. Male gametophyte-specific WRKY34 transcription factor mediates cold sensitivity of mature pollen in Arabidopsis. *Journal of Exp Botanic* ,61(14):3901–3914.

ÖZGEÇMİŞ

SERKAN AYDIN

ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Doktora	Akdeniz Üniversitesi
2018-2025	Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Antalya
Yüksek Lisans	Namık Kemal Üniversitesi
2007-2009	Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Tekirdağ
Lisans	Trakya Üniversitesi
2001-2006	Ziraat Fakültesi, Bitkisel Üretim Böl. Tekirdağ
Ön Lisans	Uludağ Üniversitesi
1998-2000	Teknik Bilimler MYO Gıda Teknolojisi Böl. Bursa

MESLEKİ VE İDARİ GÖREVLER

Araştırmacı, Bölüm Başkanı	Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü
2012-Devam Ediyor	Sebzecilik ve Süs Bitkileri Bölümü, Antalya
Araştırmacı	Bağcılık Araştırma Enstitüsü
2002-2012	İslah ve Genetik Kaynakları Bölümü, Tekirdağ
Tekniker	Tarım İl Müdürlüğü
2001-2002	Proje ve İstatistik Şubesi, Bilecik
Teknisyen	Meyvecilik Üretim İstasyonu
	Fidan Üretim Bölümü, Bilecik

ESERLER**Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler**

1. Ozer, C., Yasasın, A S., Ergonul, O., Aydın, S. (2012) The Effects of Berry Thinning and Gibberallin on Recel Uzumu Table Grapes. Pak. J. Agri. Sci. Vol. 49(2), 105-112.
2. O. Ergönül, S. Aydın, C. Özer, Z. Orhan Özalp, A.S. Yaşasın, M. Gülcü and E. Solak, (2020) The effects of bagging treatments on ripening, yield and quality of 'Trakya İlkeren' table grape cultivar., Acta Hortic. 1276. ISHS 2020. DOI 10.17660/ActaHortic.2020.1276.37
3. Kabas, O., Kabas, A., Zengin, S., Aydın, S., Vuran, F.A., Ertekin, C. 2020. "Effects of ripening stages and storage durations on resistance parameters of beef type tomatoes: part 1: spring period" Bioscience Journal, Vol. 36(6) Nov/Dec. <https://doi.org/10.14393/BJ-v36n6a2020-49951>
4. Ergönül, O., Aydın, S., Özer, C., Orhan Özalp, Z., Yaşasın, A.S., Gülcü, M., Solak, E. 2020. "The effects of bagging treatments on ripening, yield and quality of 'Trakya İlkeren' table grape cultivar", ActaHortic. 1276, p257. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2020.1276.37>
5. Özer, N., Uzun, H. İ., Aktürk, B., Özer, C., Akkurt, M., & Aydın, S. 2021. Resistance assessment of grapevine leaves to downy mildew with sporulation area scoring. European Journal of Plant Pathology, 1-12.
6. Çelik, İ., Aydın, S., Kayıkçı, H. C., Ünlü, A., Gümrükçü, E., Çelik, N., ... & Sülü, S. M. 2023. Evaluation of the Relations between Yield and Yield Components of Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) Hybrids by Correlation and Path Analysis. Horticultural Studies, 40(2), 49-54.
7. Topcu, Y., Sapkota, M., & Aydın, S. 2024 QTL-Seq: Rapid, Cost-Effective, and Reliable Method for QTL Identification. Horticultural Studies, 41(3), 106-115.
8. Topcy, Y., Yildiz, K., Kayıkci, H.C., Aydın, S., Feng, Q., Sapkota, M., 2025. Deciphering resistance to Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV) using Genome-Wide Association Studies. Scientia Horticulturae. Vol 341. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2025.113968>

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler

1. Gülcü, M., Demirci, A.Ş., Aydın, S., Arıcı, M. 2014. Comparison Of Frozen and Pickled Storage Methods For Edible Grapevine Leaves. 2nd International

Congress on Food Technology Abstract Book, Kuşadası-Turkey, November 05-07 2014. (p. 141), doi:10.13140/RG.2.2.26649.06247

2. H.I. Uzun, N. Ozer, M. Akkurt, C. Ozer, S. Aydın, B. Akturk. 2017. Effect of chemical treatments on germination of Alphonse Lavallée x Regent hybrid grape seeds. 8th International Table Grape Symposium Apulia & Sicily, 1-7 October 2017 Italy ss.98-99

3. Uzun H.İ., Özer N., Akkurt M., Özer C., Aydın S., 2017. "Breeding Alphonse Lavallée and Regent for downy mildew-resistant table grape genotypes: Comparing seedling shoot growth under white and blue LED lamps", 8. international table grape symposium, Bari, ITALYA, 1-7 Ekim 2017, pp.100-10

4. Uzun H.İ., Özer, N., Akkurt, M., Özer, C., Aydın, S., Aktürk, B., 2019. Crossing of Alphonse Lavallee and Regent Grape Cultivars for Downy Mildew Resistant Genotypes. 1. Seed Germination and Seedling Growth. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi 29: 72-78

5. Ergönül, O., Aydın, S., Özer, C., Özalp, Z.O., Yaşasın, A., Gülcü, M., Korkutal, İ., 2021. Italia Üzüm Çeşidinde Salkımlarda Torbalama Uygulamalarının Olgunluk, Verim ve Kalite Üzerine Etkileri. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi 24 (1): 83-89

6. Çelik¹, İ., Aydın, S., Kayıkçı, H. C., & Ünlü⁴, A. Aday Domates Çeşitlerinde Verim Ve Bazı Morfolojik Özelliklerin Belirlenmesi. Bahçe, 358.

7. Çelik, İ., Aydın, S., Kayıkçı, H. C., & Ünlü, A. Hibrit Domates (Solanum Lycopersicum L.) Islahında Yüksek Verimli Kombinasyonların Oluşturulması.