



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



DOKTORA TEZİ

**GAMA RADYASYONU İLE ÇELTİK (*Oryza sativa* L.)
ÇEŞİTLERİNDE TUZLULUK TOLERANSININ TEŞVİKİ**

Alp AYAN

Biyoloji Anabilim Dalı

Radyobiyojoloji Programı

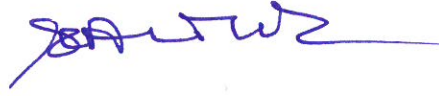
**DANIŞMAN
Prof. Dr. Seyhan ALTUN**

Mayıs, 2019

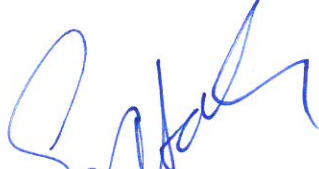
İSTANBUL

Bu çalışma, 10.05.2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı, Radyobiyojoloji Programında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

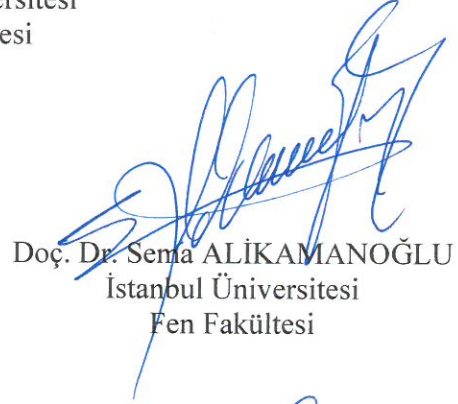
Tez Jürisi



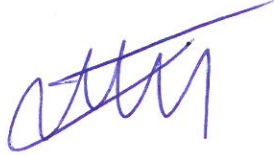
Prof. Dr. Seyhan ALTUN(Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



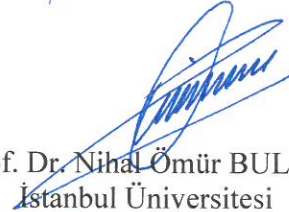
Prof. Dr. Çimen ATAK
T.C. İstanbul Kültür Üniversitesi
Fen-Edebiyat Fakültesi



Doç. Dr. Sema ALİKAMANOĞLU
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Prof. Dr. Nermin GÖZÜKIRMIZI
İstinye Üniversite
Fen-Edebiyat Fakültesi



Prof. Dr. Nihal Ömür BULAN
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



20.04.2016 tarihli resmi gazetede yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi'nin aboneli olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü'nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

ÖNSÖZ

Akademik çalışmalarımda, bilgi ve deneyimiyle her zaman bana yön veren ve bilimsel düşüncemi genişleten çok değerli hocam, Sayın Prof. Dr. Seyhan ALTUN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Akademik hayatıma başladığım günden beri, bilgi ve deneyimleriyle yoluma ışık tutan ve tez çalışmamda T.C. İstanbul Kültür Üniversitesi alt yapısını kullanmamı sağlayan Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Bölüm Başkanı çok değerli hocam Sayın Prof. Dr. Çimen ATAĞ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bitki biyoteknolojisi alanda çalışmama vesile olan, hayatın tüm yönleriyle örnek aldığım Sayın Doç. Dr. Sema ALİKAMANOĞLU'na en derin teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam sırasında bana sürekli destek olan ve yardımlarını esirgemeyen, başta Doç. Dr. Özge ÇELİK olmak üzere çalışma arkadaşım Arş. Gör. Sinan MERİÇ'e ve T.C. İstanbul Kültür Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Bitki Biyoteknolojisi grubu üyeleri Tamer GÜMÜŞ, Burcu GÜNDÜZ, Can ÖZPİRİNÇCİ, Burak TOPÇUOĞLU, Ceren AVCILAR, Meriç TAŞ ve Adem Onur KOLAYLI'ya teşekkür ederim.

Ayrıca, bu çok uzun yolda benden karşılıksız sevgi ve desteklerini esirgemeyen ve her zaman yanımda olduğunu hissettirerek manevi destek veren sevgili eşim Seda AYAN'a ve tüm aileme kalpten sevgilerimi ve teşekkürlerimi sunarım.

Mayıs 2019

Alp AYAN

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ	ix
TABLO LİSTESİ.....	xiv
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	xvi
ÖZET	xxi
SUMMARY	xxiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR.....	5
2.1. ÇELTİK (<i>Oryza sativa</i> L.)	5
2.2. KÜRESEL ISINMA.....	7
2.3. TUZ (NaCl) STRESİ VE BİTKİLERDE TUZ STRESİNE ADAPTASYON	9
2.3.1. Osmoprotektan Moleküller.....	11
2.3.2. İyon Homeostazisi	12
2.3.3. Reaktif Oksijen Türevleri ve Antioksidan Enzimler	13
2.3.4. Programlı Hücre Ölümü	15
2.4. MUTASYON ISLAHI	16
2.5. ISSR PZR YÖNTEMİ.....	22
2.6. İKİ BOYUTLU (2-DE) PROTEOMİK YÖNTEMİ	24
2.6.1. Bitkilerde Tuzluluk Toleransı ile İlgili Proteinler	26
2.7.1.1. Sinyal İletimi	27
2.7.1.2. Gen Ekspresyonu ve Protein Metabolizması	30
2.7.1.3. Enerji Metabolizması	30
2.7.1.4. Oksidatif Stres ve Stres İlişkili Proteinler	31
2.7.1.5. Mekanik Stres İlişkili Proteinler	32
2.7.1.6. İyon Taşınması ile İlişkili Proteinler	33
2.7.1.7. Proteinlerin Posttranslasyonel Modifikasyonlarının Tuz Stresi ile İlişkisi	33
2.7.1.8. Osmolit Metabolizması ile İlişkili Proteinler	34
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	36

3.1. BİTKİ MATERYALİNİN SEÇİLMESİ.....	36
3.2. ÇELTİK ÇEŞİTLERİNİN RADYASYON HASSASİYETİNİN TESPİTİ.....	36
3.3. ÇELTİK ÇEŞİTLERİNİN TUZ (NaCl) HASSASİYETİNİN BELİRLENMESİ.....	38
3.4. M ₁ GENERASYONUNA AİT MUTANTLARIN ELDESİ	39
3.4.1. Tarla Denemesi Koşulları.....	39
3.4.2. Tarla Denemesi Gözlemleri.....	40
3.4.2.1. Tane Verimi	40
3.4.2.2. Ortalama Bitki Boyu	40
3.4.2.3. Salkım Sayısı	41
3.4.2.4. Salkım Uzunluğu	41
3.4.2.5. Salkım Dane Sayısı	41
3.4.2.6. Sterilite Yüzdesi	41
3.4.2.7. Sürgün Sayısı	41
3.4.2.8. Kardeşlenme Sayısı.....	42
3.4.2.9. Çiçeklenme Gün Sayısı	42
3.4.2.10. Bin Dane Ağırlığı.....	42
3.4.2.11. Yatma Oranı.....	42
3.5. M ₂ GENERASYONUNDA İN VİVO TUZ (NaCl) SELEKSİYONLARI.....	42
3.5.1. Seleksiyonu Yapılan Mutantların Tarlaya Ekimi	44
3.6. ÇELTİK ÇEŞİTLERİNİN İN VİTRO KALLUS KÜLTÜRLERİNİN KURULMASI	45
3.6.1. Yüzey Sterilizasyon Metodunun Belirlenmesi	45
3.6.2. Kallus Oluşumu İçin Uygun Besi Yeri ve Eksplant Seçimi.....	46
3.6.2.1. Çeltik Embriolarından Doğrudan Kallus Eldesi	46
3.6.2.2. Çimlenmiş çeltik fidecik kısımlarından kallus eldesi.....	47
3.7. M ₃ GENERASYONUNDA İN VİTRO TUZ (NaCl) SELEKSİYONLARI.....	49
3.8. BİYOKİMYASAL ANALİZLER	49
3.8.1. Lipid Peroksidasyon Tayini.....	49
3.8.2. Prolin Konsantrasyonlarının Tayini	50
3.8.3. Fotosentetik Pigment Miktarı Tayini.....	50
3.8.4. Total Protein Konsantrasyonlarının Tayini	51
3.8.5. Peroksidaz Enzim Aktivitesi Tayini	51
3.8.6. Superoksit Dismutaz Enzim Aktivitesi Tayini	51
3.8.7. Katalaz Enzim Aktivitesi Tayini	52

3.9. ISSR (BASİT DİZİ TEKRARLARI ARASI POLİMORFİZM) YÖNTEMİ İLE POLİMORFİZMİN BELİRLENMESİ	52
3.9.1. Genomik DNA İzolasyonu	52
3.9.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Koşulları	53
3.9.3. PZR Ürünlerinin Görüntülenmesi	54
3.9.4. ISSR Bant Analizi ve Genetik Benzerliklerin Belirlenmesi.....	54
3.10. İKİ BOYUTLU (2D) JEL ELEKTROFOREZİ.....	54
3.10.1. Protein İzolasyonu	54
3.10.2. Proteinlerin Saflaştırılması	55
3.10.3. Protein Konsantrasyonunun Tayini	56
3.10.4. Sodyum dodesil sülfat - Poliakrilamid Jel Elektrophorezi (SDS-PAGE) ile Örnek Kalitesinin İncelenmesi	56
3.10.5. Protein Örneklerinin İzoelektrik Odaklanmaları ve 2D Jel Elektrophorezleri.....	57
3.10.6. 2DE Jellerin Analizi	58
3.10.7. In-Gel Tripsin Kesimi ve Zip-Tip C18.....	58
3.10.8. MALDI TOF-TOF Analizi.....	59
3.11. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER.....	59
4. BULGULAR.....	61
4.1. ÇELTİK ÇEŞİTLERİNİN RADYASYON HASSASİYETİNİN TESPİTİ.....	61
4.2. ÇELTİK ÇEŞİTLERİNİN TUZ (NaCl) HASSASİYETLERİNİN TESPİTİ.....	65
4.3. M ₁ GENERASYONUNA AİT MUTANTLARIN ELDESİ	68
4.4. M ₂ GENERASYONUNDA TUZLULUĞA TOLERANSLI MUTANTLARIN İN VİVO SELEKSİYONU	71
4.4.1. Tuza Toleranslı Mutantlardan Tohum Eldesi.....	72
4.5. ÇELTİK ÇEŞİTLERİNİN İN VİTRO KALLUS KÜLTÜRLERİNİN KURULMASI	75
4.6. İN VİVO KOŞULLARDA BELİRLENEN 150 MM NaCl TOLERANSLI MUTANTLARIN İN VİTRO KONTROLÜ	78
4.7. BİYOKİMYASAL ANALİZLER	81
4.7.1. Lipid Peroksidasyon Analizi	81
4.7.2. Prolin Konsantrasyonlarının Tayini	83
4.7.3. Fotosentetik Pigment Miktarı Tayini.....	85
4.7.4. Total Protein Konsantrasyonu Tayini.....	87
4.7.5. Peroksidaz Enzim Aktivitesi Tayini.....	88
4.7.6. Superoksit Dismutaz Enzim Aktivitesi Tayini	90
4.7.7. Katalaz Enzim Aktivitesi Tayini	92

4.8. ISSR (BASİT DİZİ TEKRARLARI ARASI POLİMORFİZM) YÖNTEMİ İLE POLİMORFİZMİN BELİRLENMESİ	94
4.9. İKİ BOYUTLU (2D) JEL ELEKTROFOREZİ	102
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	119
KAYNAKLAR.....	151
ÖZGEÇMİŞ	176



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: Çeltik tohumunun anatomik yapısı (Izawa ve Shimamoto, 1996).....	6
Şekil 2.2: Çeltik çiçeğinin anatomik yapısı (Izawa ve Shimamoto, 1996).	6
Şekil 3.1: Karadeniz Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü tarlalarında kurulan deneme parsellerinin görünümü.....	39
Şekil 3.2: Çeltik bitkisinin Zadoks ve diğ., (1974) skalasına göre belirlenen farklı gelişim dönemlerini ifade eden gün sayıları (Ünan, 2016).	41
Şekil 3.3: Osmancık-97 ve Mevlütbey çeşitlerine ait 150 mM NaCl stresine toleranslı mutant fidelerin tarla ekim planı ve tarla görünümü.	45
Şekil 3.4: Çeltik tohumunun morfolojik yapısı ve kısımları (Matsuo ve Hishikawa, 1993).....	47
Şekil 3.5: Çimlenmiş çeltik fideciklerinden kallus kültürlerinin kurulmasında kullanılan eksplant segmentleri.	48
Şekil 4.1: Radyasyonun Osmancık-97 çeltik çeşidi bitki boyları üzerine etkisi.....	62
Şekil 4.2: Radyasyonun Mevlütbey çeltik çeşidi bitki boyları üzerine etkisi.	63
Şekil 4.3: Osmancık-97 ve Mevlütbey çeşitlerinde radyasyonun bitki boyu üzerine etkisi.	64
Şekil 4.4: Tuz stresinin Osmancık-97 çeltik çeşidi ortalama bitki boyu (A) ve ortalama bitki yaş ağırlığı (B) üzerine etkisi.	66
Şekil 4.5: Tuz stresinin Mevlütbey çeltik çeşidi ortalama bitki boyu (A) ve ortalama bitki yaş ağırlığı (B) üzerine etkisi.	66
Şekil 4.6: Tuz stresinin Osmancık-97 (A) ve Mevlütbey (B) çeltik bitkileri üzerine etkisi.	67
Şekil 4.7. Osmancık-97 ve Mevlütbey çeşitlerine ait 0 (Kontrol), 250, 300 ve 400 Gy'lik dozlarda	69
Şekil 4.8: M ₂ generasyonunda tuza toleranslı olarak seçilen 250-2, 300-5, 400-2 ve 400-5 mutantları.....	71
Şekil 4.9: M ₂ generasyonuna ait tuza toleranslı mutantların tohum almak üzere tarlaya ekimi A) fidelerin tarlada şaşırtılması, B) parsellerin su ile kaplanması, C) hasad	

öncesi parsellerin kurutulması, D) hasat dönemlerinde çeltik bitkilerine ait görünüm.	73
Şekil 4.10: Denemesi yapılan B1, B2, B3 ve B4 besiyerlerinin kallus oluşturma yüzdeleri.	75
Şekil 4.11: Denemesi yapılan B1, B2, B3 ve B4 besi yerlerinde oluşan kallusların ortalama yaş ağırlıkları.	76
Şekil 4.12: Osmancık-97 ve Mevlütbey çeşitlerinde kallus teşviki için denenen B1, B2, B3 ve B4 besi yerlerinde kallus gelişimi.	76
Şekil 4.13: 150 mM NaCl ve tuz içermeyen kontrol koşullarında Osmancık-97 mutantlarının kallus gelişimi (M ₄ generasyonu).	79
Şekil 4.14: 150 mM NaCl ve tuzsuz kontrol koşullarında Mevlütbey mutantlarının kallus gelişimi (M ₄ generasyonu).	81
Şekil 4.15: Tuz stresinin Osmancık-97 ve Mevlütbey çeltik çeşitleri MDA oranlarına etkisi. Farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklılıklar, 0.05 seviyesinde önemlidir.	82
Şekil 4.16: Osmancık-97 çeltik çeşidi ve tuza toleranslı mutantların kontrol ve tuz stresi uygulanmış bitkilerine ait MDA oranlarında meydana gelen değişimler. Farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklılıklar, 0.05 seviyesinde önemlidir.	83
Şekil 4.17: Tuz stresinin Osmancık-97 ve Mevlütbey çeltik çeşitlerinde prolin konsantrasyonları üzerine etkileri. Farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklılıklar, 0.05 seviyesinde önemlidir.	84
Şekil 4.18: Osmancık-97 çeşidi ve mutant çeltiklerine ait kontrol ve tuz uygulanmış bitkilerine ait prolin konsantrasyonlarında meydana gelen değişimler. Farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklılıklar, 0.05 seviyesinde önemlidir.	85
Şekil 4.19: Tuz stresinin Osmancık-97 ve Mevlütbey çeltik çeşitlerinde fotosentetik pigment konsantrasyonları üzerine etkileri. Farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklılıklar, 0.05 seviyesinde önemlidir.	86
Şekil 4.20: Tuz stresinin Osmancık-97 çeşidi ve 250-2, 300-5, 400-2, 400-5 mutantları A) klorofil a, B) klorofil b, C) total klorofil ve D) karotenoid pigment konsantrasyonları üzerine etkisi. Farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklılıklar, 0.05 seviyesinde önemlidir.	87
Şekil 4.21: Tuz stresinin Osmancık-97 ve Mevlütbey çeltik çeşitlerinde total protein konsantrasyonları üzerine etkileri. Farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklılıklar, 0.05 seviyesinde önemlidir.	88
Şekil 4.22: Tuz stresinin Osmancık-97 ve Mevlütbey çeltik çeşitlerinde peroksidaz enzim aktivitesi. Farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklılıklar, 0.05 seviyesinde önemlidir.	89

Şekil 4.23: Osmancık-97 ve mutant çeltik çeşitlerinin kontrol ve tuz uygulanmış bitkilerine ait peroksidaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişimler. Farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklılıklar, 0.05 seviyesinde önemlidir.....	90
Şekil 4.24: Tuz stresinin Osmancık-97 ve Mevlütbey çeltik çeşitlerinde superoksit dismutaz enzim aktivitesi üzerine etkileri. Farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklılıklar, 0.05 seviyesinde önemlidir.	91
Şekil 4.25: Osmancık-97 ve mutant çeltik çeşitlerinin kontrol ve tuz uygulanmış bitkilerine ait superoksit dismutaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişimler. Farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklılıklar, 0.05 seviyesinde önemlidir.....	92
Şekil 4.26: Tuz stresinin Osmancık-97 ve Mevlütbey çeltik çeşitlerinde katalaz enzim aktivitesi üzerine etkileri. Farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklılıklar, 0.05 seviyesinde önemlidir.....	93
Şekil 4.27: Osmancık-97 ve mutant çeltik çeşitlerinin kontrol ve tuz uygulanmış bitkilerine ait katalaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişimler. Farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklılıklar, 0.05 seviyesinde önemlidir.	94
Şekil 4.29: UBC808 ISSR primeri bant profili. M: Markör; 1: Osmancık-97 Kontrol; 2: Osmancık-97 150 mM NaCl; 3: EO-250-2 Kontrol; 4: EO-250-2 150 mM NaCl; 5: EO-300-5 Kontrol; 6: EO-300-5 150 mM NaCl; 7: YO-400-2 Kontrol; 8: YO-400-2 150 mM NaCl; 9: EO-400-5 Kontrol; 10: EO-400-5 150 mM NaCl.	95
Şekil 4.30: UBC810 ISSR primeri bant profili. M: Markör; 1: Osmancık-97 Kontrol; 2: Osmancık-97 150 mM NaCl; 3: EO-250-2 Kontrol; 4: EO-250-2 150 mM NaCl; 5: EO-300-5 Kontrol; 6: EO-300-5 150 mM NaCl; 7: YO-400-2 Kontrol; 8: YO-400-2 150 mM NaCl; 9: EO-400-5 Kontrol; 10: EO-400-5 150 mM NaCl.	95
Şekil 4.31: UBC811 ISSR primeri bant profili. M: Markör; 1: Osmancık-97 Kontrol; 2: Osmancık-97 150 mM NaCl; 3: EO-250-2 Kontrol; 4: EO-250-2 150 mM NaCl; 5: EO-300-5 Kontrol; 6: EO-300-5 150 mM NaCl; 7: YO-400-2 Kontrol; 8: YO-400-2 150 mM NaCl; 9: EO-400-5 Kontrol; 10: EO-400-5 150 mM NaCl.	96
Şekil 4.32: UBC812 ISSR primeri bant profili. M: Markör; 1: Osmancık-97 Kontrol; 2: Osmancık-97 150 mM NaCl; 3: EO-250-2 Kontrol; 4: EO-250-2 150 mM NaCl; 5: EO-300-5 Kontrol; 6: EO-300-5 150 mM NaCl; 7: YO-400-2 Kontrol; 8: YO-400-2 150 mM NaCl; 9: EO-400-5 Kontrol; 10: EO-400-5 150 mM NaCl.	96
Şekil 4.33: UBC814 ISSR primeri bant profili. M: Markör; 1: Osmancık-97 Kontrol; 2: Osmancık-97 150 mM NaCl; 3: EO-250-2 Kontrol; 4: EO-250-2 150 mM NaCl; 5: EO-300-5 Kontrol; 6: EO-300-5 150 mM NaCl; 7: YO-400-2 Kontrol; 8: YO-400-2 150 mM NaCl; 9: EO-400-5 Kontrol; 10: EO-400-5 150 mM NaCl.	97
Şekil 4.34: UBC824 ISSR primeri bant profili. M: Markör; 1: Osmancık-97 Kontrol; 2: Osmancık-97 150 mM NaCl; 3: EO-250-2 Kontrol; 4: EO-250-2 150 mM NaCl; 5: EO-300-5 Kontrol; 6: EO-300-5 150 mM NaCl; 7: YO-400-2 Kontrol; 8: YO-400-2 150 mM NaCl; 9: EO-400-5 Kontrol; 10: EO-400-5 150 mM NaCl.	97

Şekil 4.35: UBC825 ISSR primeri bant profili. M: Markör; 1: Osmancık-97 Kontrol; 2: Osmancık-97 150 mM NaCl; 3: EO-250-2 Kontrol; 4: EO-250-2 150 mM NaCl; 5: EO-300-5 Kontrol; 6: EO-300-5 150 mM NaCl; 7: YO-400-2 Kontrol; 8: YO-400-2 150 mM NaCl; 9: EO-400-5 Kontrol; 10: EO-400-5 150 mM NaCl.	98
Şekil 4.36: UBC834 ISSR primeri bant profili. M: Markör; 1: Osmancık-97 Kontrol; 2: Osmancık-97 150 mM NaCl; 3: EO-250-2 Kontrol; 4: EO-250-2 150 mM NaCl; 5: EO-300-5 Kontrol; 6: EO-300-5 150 mM NaCl; 7: YO-400-2 Kontrol; 8: YO-400-2 150 mM NaCl; 9: EO-400-5 Kontrol; 10: EO-400-5 150 mM NaCl.	98
Şekil 4.37: UBC840 ISSR primeri bant profili. M: Markör; 1: Osmancık-97 Kontrol; 2: Osmancık-97 150 mM NaCl; 3: EO-250-2 Kontrol; 4: EO-250-2 150 mM NaCl; 5: EO-300-5 Kontrol; 6: EO-300-5 150 mM NaCl; 7: YO-400-2 Kontrol; 8: YO-400-2 150 mM NaCl; 9: EO-400-5 Kontrol; 10: EO-400-5 150 mM NaCl.	99
Şekil 4.38: UBC864 ISSR primeri bant profili. M: Markör; 1: Osmancık-97 Kontrol; 2: Osmancık-97 150 mM NaCl; 3: EO-250-2 Kontrol; 4: EO-250-2 150 mM NaCl; 5: EO-300-5 Kontrol; 6: EO-300-5 150 mM NaCl; 7: YO-400-2 Kontrol; 8: YO-400-2 150 mM NaCl; 9: EO-400-5 Kontrol; 10: EO-400-5 150 mM NaCl.	99
Şekil 4.39: UBC873 ISSR primeri bant profili. M: Markör; 1: Osmancık-97 Kontrol; 2: Osmancık-97 150 mM NaCl; 3: EO-250-2 Kontrol; 4: EO-250-2 150 mM NaCl; 5: EO-300-5 Kontrol; 6: EO-300-5 150 mM NaCl; 7: YO-400-2 Kontrol; 8: YO-400-2 150 mM NaCl; 9: EO-400-5 Kontrol; 10: EO-400-5 150 mM NaCl.	100
Şekil 4.40: UBC880 ISSR primeri bant profili. M: Markör; 1: Osmancık-97 Kontrol; 2: Osmancık-97 150 mM NaCl; 3: EO-250-2 Kontrol; 4: EO-250-2 150 mM NaCl; 5: EO-300-5 Kontrol; 6: EO-300-5 150 mM NaCl; 7: YO-400-2 Kontrol; 8: YO-400-2 150 mM NaCl; 9: EO-400-5 Kontrol; 10: EO-400-5 150 mM NaCl.	100
Şekil 4.28: 150 mM NaCl uygulanmış ve uygulanmamış Osmancık-97 ve mutant çeltik çeşitleri arasında ISSR primerleri ile amplifikasyon sonuçlarına göre oluşturulan UPGMA dendrogramı.	102
Şekil 4.41: Osmancık-97 çeltik çeşidine ait kontrol bitkilerinin iki boyutlu protein profili.	103
Şekil 4.42: 150 mM NaCl uygulanmış Osmancık-97 bitkilerinin iki boyutlu protein profili.	103
Şekil 4.43: YO-250-2 çeltik mutantına ait kontrol bitkilerinin iki boyutlu protein profili.	104
Şekil 4.44: 150 mM NaCl uygulanmış YO-250-2 çeltik mutantına ait bitkilerin iki boyutlu protein profili.	104
Şekil 4.45: YO-300-5 çeltik mutantına ait kontrol bitkilerinin iki boyutlu protein profili.	105
Şekil 4.46: 150 mM NaCl uygulanmış YO-300-5 çeltik mutantına ait bitkilerin iki boyutlu protein profili.	105

Şekil 4.47: EO-400-2 çeltik mutantına ait kontrol bitkilerinin iki boyutlu protein profili.	106
Şekil 4.48: 150 mM NaCl uygulanmış EO-400-2 çeltik mutantına ait bitkilerin iki boyutlu protein profili.	106
Şekil 4.49: YO-400-5 çeltik mutantına ait kontrol bitkilerinin iki boyutlu protein profili.	107
Şekil 4.50: 150 mM NaCl uygulanmış YO-400-5 çeltik mutantına ait bitkilerin iki boyutlu protein profili.	107
Şekil 4.51: Osmancık-97 ve bu çeşitten kökenlenen mutantlarda 150 mM NaCl uygulaması sonucunda ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı değişimler tespit edilen 30 protein spotu ve SSP numaraları.	108
Şekil 4.52: Dizilenen proteinlerin hücre içerisinde lokalizasyonlarına göre sınıflandırılması.	108
Şekil 4.53: Dizilenen proteinlerin fonksiyonlarına göre sınıflandırılması.	109
Şekil 4.54: Tuz stresi uygulanmamış Osmancık-97 çeltik çeşidine göre değerlendirilen ribuloz bisfosfat karboksilaz/oksijenaz aktivaz protein ifade değişimleri (%).	110
Şekil 4.55: Tuz stresi uygulanmamış Osmancık-97 çeltik çeşidine göre değerlendirilen trioz fosfat izomeraz protein ifade değişimleri (%).	111
Şekil 4.56: Tuz stresi uygulanmamış Osmancık-97 çeltik çeşidine göre değerlendirilen ferritin-1 protein ifade değişimleri (%).	112
Şekil 4.57: Tuz stresi uygulanmamış Osmancık-97 çeltik çeşidine göre değerlendirilen ferredoksin NADP(H) oksidoredüktaz protein ifade değişimleri (%).	113
Şekil 4.58: Tuz stresi uygulanmamış Osmancık-97 çeltik çeşidine göre değerlendirilen 2-cys peroksiredoksin BAS1 protein ifadesi değişimleri (%).	114
Şekil 4.59: Tuz stresi uygulanmamış Osmancık-97 çeltik çeşidine göre değerlendirilen oksijen-evolving enhancer protein 1 ifade değişimleri (%).	115
Şekil 4.60: Tuz stresi uygulanmamış Osmancık-97 çeltik çeşidine göre değerlendirilen tubby-benzeri F-box protein 11 ifade değişimleri (%).	116
Şekil 4.61: Tuz stresi uygulanmamış Osmancık-97 çeltik çeşidine göre değerlendirilen peptidil-prolil cis-trans izomeraz (CYP20-2) ifade değişimleri (%).	117
Şekil 4.62: Tuz stresi uygulanmamış Osmancık-97 çeltik çeşidine göre değerlendirilen gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz protein ifade değişimleri (%).	118

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1: Son 10 yılda Uluslararası Atom Enerjisi Kurumu Mutant Varyete Veritabanı'na kayıt ettirilen çeltik mutantları ve özellikleri.	21
Tablo 2.2: Glikofit bitkilerde tuz stresine karşı tolerans mekanizmalarında görev alan proteinler (Kosova ve diğ., 2013).	28
Tablo 2.3: Halofit bitkilerde tuz stresine karşı tolerans mekanizmalarında görev alan proteinler (Kosova ve diğ., 2013).	29
Tablo 3.1: Karadeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nden elde edilen çeltik çeşitleri ve tarımsal özellikleri.	37
Tablo 3.2: Yoshida besin solüsyonu içeriği (Yoshida ve diğ., 1971).	38
Tablo 3.3: Sürgün gelişimi sırasında tuzluluğun çeltik bitkisi üzerinde meydana getirdiği zararlanmaların standart değerlendirme skor tablosu (Gregorio, 1997).	43
Tablo 3.4: Seltop marka özel karışımli toprak içeriği ve özellikleri.	44
Tablo 3.5: Osmancık-97 ve Mevlütbey çeltik çeşitlerinin yüzey sterilizasyonu denemesinde uygulanan NaOCl konsantrasyonları ve süreleri.	46
Tablo 3.6: Osmancık-97 ve Mevlütbey çeltik çeşitlerine ait embriyolardan kallus kültürlerinin oluşturulması için kullanılan besi yeri içerikleri.	46
Tablo 3.7: Çimlenmiş çeltik fideciklerinden elde edilen eksplantlarla kurulan kallus denemesinde kullanılan besi yeri içerikleri.	48
Tablo 3.8: PZR reaksiyon karışımı bileşenleri ve konsantrasyonları.	53
Tablo 3.9: PZR reaksiyonlarının aşamaları, sıcaklıkları, süreleri ve döngü sayıları.	53
Tablo 3.10: Kullanılan ISSR primerlerine ait diziler ve T_m sıcaklıkları.	54
Tablo 3.11: İzoelektrik Odaklama (IEF) voltaj, süre ve ayarları.	57
Tablo 4.1: Radyasyonun Osmancık-97 çeltik çeşidi çimlenme oranı (%), ortalama bitki boyu (cm), ortalama bitki yaş ağırlığı (g) üzerine etkileri.	62
Tablo 4.2: Radyasyonun Mevlütbey çeltik çeşidi çimlenme oranı (%), ortalama bitki boyu (cm), ortalama bitki yaş ağırlığı (g) üzerine etkileri.	63
Tablo 4.3: Tuz stresinin Osmancık-97 ve Mevlütbey çeltik çeşitleri ortalama bitki boyu (cm) ve ortalama bitki yaş ağırlığı üzerine etkileri.	65

Tablo 4.4. M ₁ generasyonuna ait mutantların eldesi için kurulan tarla denemesi sonuçları.	70
Tablo 4.5: M ₂ generasyonunda belirlenen klorofil mutantları ile 150 mM NaCl konsantrasyonuna toleranslı mutantların sayı ve yüzdeleri.	71
Tablo 4.6: M ₃ generasyonuna ait 150 mM NaCl konsantrasyonuna toleranslı mutantlardan elde edilen tohum miktarları.	74
Tablo 4.7: Denemesi yapılan yüzey sterilizasyonu metodlarında gözlemlenen kontaminasyon sayı ve yüzdeleri.	75
Tablo 4.8: Osmancık-97 çeltik çeşidinin farklı bitki segmentlerinden kurulan denemelerin kallus oluşum sayı ve yüzdeleri.	77
Tablo 4.9: Mevlütbey çeltik çeşidinin farklı bitki segmentlerinden kurulan denemelerin kallus oluşum sayı ve yüzdeleri.	77
Tablo 4.10: M ₄ generasyonundaki Osmancık-97 mutantlarının 150 mM NaCl içeren besi yerlerinde geliştirdiği kallusların ortalama yaş ağırlık yüzdeleri.	79
Tablo 4.11: M ₄ generasyonundaki Mevlütbey mutantlarının 150 mM NaCl içeren besi yerlerinde geliştirdiği kallusların ortalama yaş ağırlık yüzdeleri.	80
Tablo 4.12: ISSR amplifikasyonları sonucu oluşan bant sayıları ve polimorfizm oranları.	101
Tablo 4.13: ISSR primerlerine göre Osmancık-97 150 mM NaCl toleranslı mutantlarına ait kontrol ve tuz stresi uygulanmış bitkilerin Jaccard yöntemine göre birbirlerine olan genetik benzerlikleri.	101

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
~	: Yaklaşık olarak
%	: Yüzde
$\cdot\text{O}_2^-$	: Superoksit radikali
$\cdot\text{OH}$	: Hidroksil radikali
$^{\circ}\text{C}$	: Santigrat derece
^{137}Cs	: Sezyum-137
$^1\text{O}_2$	: Singlet oksijen
^{40}K	: Potasyum-40
^{60}Co	: Kobalt-60
A	: Absorbans
Δ	: Delta
da	: Dekar
Da	: Dalton
Dk	: Dakika
dS	: DesiSiemens
g	: Gram
Gy	: Grey
H_2O_2	: Hidrojen peroksit
ha	: Hektar
kg	: Kilogram
L	: Litre
LS	: Linsmeier & Skoog
m	: Metre
M	: Molar
m^2	: Metrekare
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mm	: Milimetre
mM	: Milimolar
μM	: Mikromolar

Mpa	: Megapaskal
MS	: Murashige & Skoog
ng	: Nanogram
pH	: Hidrojen iyonu konsantrasyonu
rpm	: Dakikada döngü sayısı
sn	: Saniye
T_m	: Erime sıcaklığı
U	: Ünite
V	: Hacim
V	: Volt
W	: Ağırlık
μA	: Mikroamper
μg	: Mikrogram
μL	: Mikrolitre

Kısaltmalar	Açıklama
2,4-D	: 2,4-Diklorofenoksiasetik asit
2D	: İki boyutlu (2 Dimensional)
2DE	: İki boyutlu elektroforez (2 Dimensional Electrophoresis)
2ME	: 2-Merkaptoetanol
ACN	: Asetonitril
AFLP	: Çoğaltılmış Parça Uzunluklarında Farklılıklar (Amplified Fragment Length Polymorphism)
CAT	: Katalaz
CTAB	: Setiltrimetilamonyum bromid
CYP20-2	: Peptidil-prolil cis-trans izomeraz
Cyt c	: Sitokrom c
DES	: Dietil sülfat
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Nukleozid trifosfat
DTT	: Diklorodifeniltrikloroetan
EC	: Elektrik iletkenliği (Electrical Conductivity)
EC	: Enzim sınıflandırma
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
EI	: Etilen imin
EMS	: Etil metan sülfonat
ENU	: Etil nitroz üretan
ENU	: Etilnitrozüre
FAO	: Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Organizasyonu (Food and Agriculture Organization of United Nations)
FNR	: Ferrodoksin--NADP Redüktaz
GR₃₀	: Çimlenmeyi % 30 azaltan doz
GR₅₀	: Çimlenmeyi % 50 azaltan doz
HCl	: Hidroklorik asit
HSP	: Isı şoku proteini (Heat Shock Protein)
IAA	: İyodoasetamid
IAEA	: Uluslararası Atom Enerjisi Kurumu (International Atomic Energy Agency)
IEF	: İzoelektrik odaklama (Isoelectric Focusing)

IPCC	: İklim Değişikliği Üzerine Uluslararası Panel (Intergovernmental Panel on Climate Change)
IPEG	: İmmobilize gradient elektroforezi
IPG	: İmmobilize edici pH gradienti
IRRI	: Uluslararası Çeltik Araştırma Enstitüsü (International Rice Research Institute)
ISSR	: Basit Sekans Arası Tekrarları (Inter Simple Sequence Repeats)
MÖ	: Milattan önce
MBPU	: Metilbenzil fenil üre
MDA	: Malondialdehit
MNU	: Metilnitrozüre
MS	: Kütle spektroskopisi
MVD	: Mutant Varyete Veritabanı (Mutant Variety Database)
MW	: Molekül ağırlığı
NBT	: Nitro blue tetrazolium
NEPHGE	: Non-equilibrium pH gradient elektroforezi
nm	: Nanometre
PAGE	: Poliakrilamid jel elektroforezi
PCD	: Programlı hücre ölümü (Programmed Cell Death)
pI	: İzoelektrik nokta
PMSF	: Fenilmetan sülfonil florid
ppm	: Milyondaki partikül
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
RAPD	: Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (Randomly Amplified Polymorphic DNA)
RFLP	: Kesilmiş Parça Uzunluklarında Farklılıklar (Restriction Fragment Length Polymorphism)
RNA	: Ribonükleik asit
ROS	: Reaktif oksijen türevi (Reactive Oxygen Species)
SCAR	: Dizisi karakterize edilmiş çoğaltılmış bölge (Sequence characterised amplified region)
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SOD	: Süperoksit dismutaz
SSR	: Basit Sekans Tekrarları (Simple Sequence repeats)
T.C.	: Türkiye Cumhuriyeti
TA	: Taze ağırlık

TBP	: Tris tamponlu fosfat
TCA	: Trikloroasetik asit
TCEP	: Tris-2-karboksietil fosfin
TOF	: Uçuş süresi
UN	: Birleşmiş Milletler (United Nations)
UV	: Ultra viyole
vb	: Ve benzeri
yy	: Yüz yıl



ÖZET

DOKTORA TEZİ

GAMA RADYASYONU İLE ÇELTİK (*Oryza sativa* L.) ÇEŞİTLERİNDE TUZLULUK TOLERANSININ TEŞVİKİ

Alp AYAN

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Seyhan ALTUN

Bu tez çalışması kapsamında ülkemizde yaygın ekime sahip olan Osmancık-97 ve Karadeniz bölgesinde geliştirilmiş olan Mevlütbey çeltik çeşitlerinden, gama radyasyonu ile tuzluluğa toleranslı mutantların elde edilmesi amaçlanmıştır. Cs-137 gama radyasyonu kaynağı ile 0, 250, 300 ve 400 Gy dozlarında çeltik tohumları ışınlanmıştır. Işınlanan tohumlar Karadeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü deneme tarlalarına ekilerek M₁ generasyonunda radyasyonun neden olduğu fizyolojik zararlanmalar gözlenmiş ve bitkilerden tohum alınmıştır.

Tuza toleranslı mutantların belirlenmesi için seleksiyonlar M₂ generasyonunda T.C. İstanbul Kültür Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Bitki Biyoteknolojisi Laboratuvarı'nda yapılmıştır. In vivo ortamda yapılan seleksiyonlarda seçilen tuzluluğa toleranslı 86 mutantın 43 tanesi Osmancık-97 çeşidine aittir. Seçilen M₂ generasyonundaki mutant bitkiler tohum elde etmek amacıyla Trakya Tarımsal Araştırma Müdürlüğü deneme tarlalarına dikilmiştir.

M₃ generasyonunda tuz toleransının devamlılığının kontrol edilmesi için in vitro kallus kültürleri kurulmuştur. Kültürler için kullanılan eksplantlar tohumların embriyonik kısımlarından alınmıştır. Doku kültürlerinde kallus eldesi için en uygun besi yeri içeriği B3 besi yeri (MS tuzları, 3 mg/L 2,4-D ve 560 mg/L prolin) olarak tespit edilmiştir. In vitro kültürlerin sonuçları doğrultusunda tuz stresi altında, tuz stresi uygulanmamış Osmancık-97 kontrol kalluslarına göre daha iyi kallus gelişimi gösteren 250-2, 300-5, 400-2 ve 400-5 mutantları ile moleküler karakterizasyon çalışmalarının yapılmasına karar verilmiştir.

Seçilen tuza toleranslı mutantların tuzlu ve tuzsuz ortamlarda biyokimyasal cevaplarını belirlemek amacı ile lipid peroksidasyon, prolin miktarı, fotosentetik pigment konsantrasyonu, total protein konsantrasyonu, peroksidaz, superoksit dismutaz, katalaz enzim aktivitesi saptanmıştır.

Seçilen tuza toleranslı mutantların kökenlendikleri Osmancık-97 eşidi ile ve birbirleriyle olan genetik uzaklıklarını belirlemek için ISSR primerleri kullanılarak PZR yapılmıştır. Elde edilen bant profillerine göre Jaccard genetik benzerlik matrisi oluşturulmuş ve UPGMA dendogramı çizilmiştir. Elde edilen dendogramda Osmancık-97 eşidi ve mutantların tuz uygulanmış ve uygulanmamış örnekleri iki kümeye ayrılmıştır. Dendogram sonuçları mutantların tamamının Osmancık-97 çeşidinden ayrı alt gruplarda yer aldıklarını göstermiştir.

Tuza toleranslı mutantların iki boyutlu proteomik analizleri yapılmıştır. Elde edilen protein spotu profilleri değerlendirilerek tuz stresi altında anlatım farklılığı gösteren 30 protein tespit edilmiştir. Kütle spektroskopisi yöntemi ile tanımlanan bu proteinlerden 9 tanesinin (ribüloz bisfosfat karboksilaz/oksigenaz aktivaz, trioz fosfat izomeraz, 2-Cys peroksiredoksin, oksijen-evolving enhancer protein 1, ferritin-1, ferredoksin--NADP redüktaz, gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz, tubby-benzeri F-box protein 11, peptidil-prolil cis-trans izomeraz) tuz stresine tolerans ile bağlantılı olduğu tespit edilmiştir. Çalışmamızda, eltik mutantlarının tuz stresi altında verdiği cevaplardaki farklılıklarda, özellikle ferredoksin-NADP redüktaz, oksijen-evolving enhancer protein 1, trioz fosfat izomeraz ve 2-Cys peroksiredoksin proteinleri rol oynamaktadır.

Sonuç olarak, ülkemizde bu tez kapsamında ilk defa radyasyon ile tuza toleranslı eltik mutantların geliştirilebildiği gösterilmiştir. Yapılan alışma sonucunda tuza toleranslı dört farklı eltik mutantı elde edilmiştir. Bu dört mutantın farklı evre, iklim ve coğrafik koşullarda daha yüksek ürün potansiyeline sahip çeşitlerin geliştirilmesinde önemli rolü olacaktır. Ayrıca araştırmada kullanılan eltik eşitleri ülkemizde geliştirilen yerli çeşitler olması nedeni ile yapılan bu mutasyon çalışması ülkemiz ekonomisi açısından ayrı bir öneme sahiptir.

Mayıs 2019, 201 sayfa.

Anahtar kelimeler: *Oryza sativa*, Tuz toleransı, Mutasyon ıslahı, 2D Proteomik, ISSR

SUMMARY

Ph.D. THESIS

INDUCING SALT TOLERANCE IN RICE (*Oryza sativa* L.) VARIETIES BY GAMMA RADIATION

Alp AYAN

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Science and Engineering

Department of Biology

Supervisor : Prof. Dr. Seyhan ALTUN

Co-Supervisor : Academic Title Name SURNAME

In context of this Ph. D. thesis study, it is aimed to obtain salinity tolerance on Osmancık-97, which is widely planted rice variety in our country, and Mevlütbey, which is a rice variety improved in Black Sea region, by using gamma radiation. Rice seeds were irradiated by 0, 250, 300 ve 400 Gy dose of Cs-137 source. Irradiated seeds were planted in the experimental fields of Black Sea Agricultural Research Institute and physiological effects of radiation on M₁ generation were observed, as well as seed were harvested.

Selections in M₂ generation for determination of salt tolerant mutants were conducted in Plant Biotechnology Laboratory of T.C. Istanbul Kultur University, Department of Molecular Biology and Genetics. Following in vivo selections, 43 of selected salt tolerant mutants were belonging to Osmancık-97 variety. Selected M₂ generation mutant plants were planted to Trakya Agricultural Research Institute to obtain seeds.

In vitro callus cultures were established in order to determine persistence of salt tolerance in M₃ generation. Embrios of the seeds were selected as explant source. B3 medium (MS salts, 3 mg/L 2,4-D, 560 mg/L proline) is determined to be the most suitable medium for callus induction. In respect to the data obtained from in vitro studies, 250-2, 300-5, 400-2 and 400-5

mutants which presented better callus growth comparing to the untreated Osmancık-97 control calluses were selected for further molecular characterization studies.

Biochemical responses of selected salt tolerant mutants under salt treated and untreated conditions were evaluated by lipid peroxidation, proline content, photosynthetic pigment content, total protein content, enzyme activities of peroxidase, superoxide dismutase and catalase results.

Genetic distance between mutants and Osmancık-97 as their origin were determined by PCR reactions conducted with ISSR primers. Jaccard genetic similarity matrix was generated according to the band profiles and UPGMA dendrogram was drawn. According to the dendrogram, Osmancık-97 variety and salt treated/untreated mutants divided into two distinct clusters. Moreover, all the mutants were separated from Osmancık-97 variety in different sub-clusters.

Two dimensional proteomic analysis of salt tolerant mutants were conducted. Evaluation of protein spot profiles of samples presented that 30 proteins were differed in expression. 9 of these 30 proteins (ribulose biphosphate carboxylase/oxidase activase, triose phosphate isomerase, 2-Cys peroxiredoxin, oxygene-evolving enhancer protein 1, ferritine-1, ferredoxin-NADP reductase, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, tubby-like F-box protein 11, peptidyl-prolyl cis-trans isomerase) were characterized by mass spectroscopy and they were found to be salt tolerans related. In this study, proteomic response differences between rice mutants under salt stress were found to be related to the roles of ferredoxin-NADP reductase, oxygene-evolving enhancer protein 1, triose phosphate isomerase and 2-Cys peroxiredoxin proteins.

As a result, it is the first time in Turkey that we presented salt tolerant rice mutants can be induced by gamma radiation. In this study, four different salt tolerant rice mutants were obtained. These four mutants will play important roles on improving novel rice varieties which have higher yield potential under different environmental, climate and geographical conditions. Also, this study is important for our country's economy due to the fact that our salt tolerant mutants were induced from our local rice varieties.

May 2019, 201 pages.

Keywords: *Oryza sativa*, Salt tolerance, Mutation breeding, 2D Proteomics, ISSR

1. GİRİŞ

Poaceae ailesinin üyesi olan çeltik (*Oryza sativa* L.), içerdiği yüksek karbonhidrat ve sindirimi kolay olan zengin protein içeriği sebebiyle dünyada en çok yetiştirilen tahıllar arasında buğdaydan sonra ikinci sırada yer almaktadır. Çeltik üç milyar insanın beslenmesinde günlük kalori ihtiyacının karşılanmasında % 50 – 80 arasında etkiye sahiptir. Tahıl, fermente içecek, un, yağ, işlenmiş ürün başta olmak üzere geniş bir tüketim yelpazesine sahiptir (Ghosh ve diğ., 2016). Birleşmiş Milletler tarafından 2017 yılının haziran ayında yayınlanan rapora göre (UN, 2017) günümüzde dünya nüfusunun 7,55 milyara ulaştığı ifade edilmiş ve nüfusun 2030 yılında 8,55 milyarı, 2050 yılında 9,77 milyarı ve bu oranlarda artış devam ederse, 2100 yılında 11,18 milyarı bulabileceği belirtilmiştir.

Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Organizasyonu'nun (FAO) 2015 senesinde yayınladığı, dünyada gıda yetersizliklerinin durumunu değerlendiren raporda (FAO, 2016), 1990 yılında dünya nüfusunun % 18,6'sının (1,01 milyar insan) yetersiz beslendiği, 2015 yılında bu oranın % 10,9'a gerilediği (794,6 milyon insan) bildirilmiştir. Geçen 25 senelik süre zarfında gelişmiş ülkelerdeki yetersiz beslenme oranı sürekli % 5'in altında kalırken, asıl iyileştirmeler gelişmemiş ve gelişmekte olan ülkelerde gerçekleşmiştir. Bu kategorideki ülkelerde yetersiz beslenme oranı 1990 senesinde % 23,3 oranındayken 2015 senesinde % 12,9 oranına gerilemiştir. Günümüzde dünyada 13,4 milyar hektar yer kaplayan karaların 1,5 milyar hektarında (sürekli bitki örtüsü ve ekilebilir alanlar dahil % 11) tarım yapılmaktadır. Bu oran tarım yapılmasına elverişli toprakların % 36'lık oranını oluşturmaktadır. Dünya nüfustaki hızlı artış sebebi ile 2050 yılına kadar başta çeltik, buğday, soya fasulyesi ve mısır olmak üzere birçok tarım bitkisinin üretiminde günümüz üretim değerlerinin % 87 üzerine çıkılması gerekebileceği öngörülmektedir (FAO, 2016; FAO, 2017). Küresel ısınma, artan endüstriyel faaliyetler ve bunların doğrudan ve/veya dolaylı etkileri sonucunda bitkiler, tuzluluk, kuraklık, sıcaklık artışı veya don gibi, verimliliği doğrudan etkileyen abiyotik stres koşullarına daha fazla sürelerde ve daha yoğun şiddette maruz kalmaktadır. Tarım alanları sınırlı kalırken dünya nüfusu hızla artmaktadır. Bunun sonucunda birçok tarım bitkisinin üretimi yetersiz kalmaktadır. Ancak günümüzde artan dünya nüfusuna rağmen biyoteknolojideki gelişmeler sonucunda, tarım alanlarında artış sağlanamazken ve hatta kentleşmeden dolayı azalma söz

konusuyken tarımsal ürünlerde bir artış gerçekleşmeye başlamıştır (Baulcombe ve diğ., 2009; Dobermann ve diğ., 2013).

Çeltik, dünyada 3 milyardan fazla insanın günlük kalori ihtiyacının karşılanmasında % 80'e ulaşan bir katkıya sahiptir. Bu özelliği ile temel besin kategorisinde yer alan buğday, patates, mısır, soya fasulyesi gibi bitkilerle birlikte çeltik, önemli bir gıda kaynağıdır. FAO'nun 2013 verilerine göre çeltik dünyada 156 milyon ha alanda 745 bin ton üretim ile şeker kamışı ve mısırın ardından dünyada en çok üretilen tarım bitkisidir. Tahıllar arasında ise, buğdayın ardından ikinci sırada yer almaktadır. Dünya tahıl üretiminde ilk 20 ülke arasında yer alan Türkiye çeltik üretiminde bu sıralamada kendine yer bulamamaktadır (Kumar ve diğ., 2013; FAO, 2015; Ghosh ve diğ., 2016). Günümüzde 163 milyon ha alanda 741 milyon ton çeltik üretimi yapılmaktadır. Elde edilen ürün miktarı bakımından değerlendirildiğinde Çin, Hindistan, Endonezya, Bangladeş ve Vietnam ilk beş sırada yer almaktadır. Çin dünya üretiminin % 27,9'luk kısmını karşılarken ülkemiz yıllık 746 bin ton (% 0,1) ile çeltik üretimi bakımından 86. sıradadır (FAO, 2015; IRRI, 2017).

Abiyotik stres, birçok bitkinin ürün miktarını etkilediği gibi çeltik üretiminde de verim kaybında önemli bir faktördür. Bitkilerin yaygın olarak maruz kaldıkları çevresel abiyotik stres etmenleri arasında, aşırı ışık seviyeleri (düşük veya yüksek), radyasyon (UV-A ve UV-B), sıcaklık (ısı şoku veya donma), düzensiz su rejimi (kuraklık, sel, su altında kalma), kimyasal faktörler (ağır metaller, pH, tuzluluk, gerekli makro ve mikro elementlerde yetersizlik), gaz kirleticiler (ozon, sülfür dioksit), mekanik faktörler (kuvvetli rüzgar) sıralanabilir. Bitkiler bu çevresel stres faktörlerinden birine veya birkaçına aynı anda maruz kalmaktadırlar. Günümüzde bunlar arasında bitkilerin en yaygın olarak maruz kaldıkları çevresel stres kombinasyonlarından biri artan küresel sıcaklıklara bağlı olarak toprakta kuraklık oluşması ve tuzluluğun artmasıdır (Singh, 2008; Pereira, 2016).

Bitki gelişimini ve verimliliğini etkileyen en önemli abiyotik çevresel stres etmenleri arasında yer alan tuzluluk, bitkinin su alımının etkilenmesi ve iyon spesifik toksisitenin oluşması ile birlikte çimlenmeden itibaren başlar (Cardon ve diğ., 2003). Çimlenen bitkilerde sırası ile bitki boyu ve yaprak yüzeyinde azalma, fotosentetik aktivitede azalma, karbonhidrat ve enerji metabolizmasında yavaşlama, protein sentezi ve lipid metabolizmasında gerileme sonucunda verimlilik ve hatta uzun süreli maruz kalmalarda bitkinin ölümüne kadar devam edebilmektedir (Parida ve Das, 2005). Tuzluluk özellikle yıllık yağış miktarının metrekarede 200 – 300 mm

seviyesinin altında kaldığı kurak bölgelerde ve ülkemizde içerisinde bulunduğu yarı kurak bölgelerde yağış yetersizliği ve aşırı buharlaşma dönemlerinde yeraltı sularının kontrolsüz kullanımı gibi yanlış sulama uygulamaları sonucunda meydana gelmektedir. Yetersiz ve yanlış drenaj uygulamaları yeraltı sularında çözünmüş durumda bulunan farklı formlardaki tuzların (klor, sodyum, kalsiyum gibi) bitkilerin köklenme alanlarında aşırı konsantrasyonlarda birikmesine yol açmaktadır. 1,5 milyar hektar tarım alanının sadece sulama sistemleri kullanılarak tarım yapılabilen 230 milyon hektarlık kısmında, 45 milyon hektar alan artan tuzluluktan dolayı kullanılamamaktadır. Bunun sonucunda ortaya çıkan ekonomik kayıplar daha çok Pakistan, Hindistan, Mısır, Tunus, Fas, Peru, Bolivya gibi gelişmemiş ve Türkiye, Meksika gibi gelişmekte olan ülkelerde görülse de, Avustralya, Çin, ve Amerika gibi ülkeler de her geçen yıl bu tehdidi daha çok hissetmektedir (Rozema ve Flowers, 2008).

Ülkemizde 1,5 milyon ha tarım alanında (sulama ile tarım yapılan arazilerin % 32,5'i) tuzluluk ve alkalilik sorununun görüldüğü ve 1,5 milyon ha tuzlu toprağın % 41'inin hafif tuzlu, % 33'ünün tuzlu, % 0,5'inin alkali, % 17,5'inin ise, hem tuzlu hemde alkali olduğu rapor edilmektedir. Ülkemizdeki çorak alanların % 5,5'lik kısmı işlenebilir tarım alanları dahilinde olup, bu çoraklık oranının % 74'ü tuzluluktan dolayı meydana gelmektedir. Tuzluluğun başlıca sebepleri arasında yetersiz drenaj, toprak özellikleri, fizyografya ve iklim koşulları sıralanabilir. Söz konusu etmenler bakımından Harran, Amik, Konya ve Seyhan Ovalarının tuzluluk tehdidi altında olduğu ifade edilmektedir (Kanber ve diğ., 2005; Taş ve Öztürk, 2011; Korkmaz ve diğ., 2016).

Günümüzde geleneksel ıslah çalışmalarının yanında moleküler ıslah yöntemleri de büyük önem kazanmıştır. Klasik ıslah yöntemleri arasında, hibridizasyon, seleksiyon, mutasyon ıslahı, poliploidi ıslahı sayılabilir. Ayrıca doku kültürü teknikleri de ıslahta kullanılmaya başlanmış ve embriyo kültürü ve protoplast füzyonu gibi yeni metodlar da ilave edilmiştir. Moleküler ıslah uygulamaları içerisinde doğrudan ve dolaylı gen aktarım tekniklerinin kullanımı, moleküler markör yöntemleri ve genom düzenleme yöntemleri sayılabilir (Crosbie ve diğ., 2006; Xu, 2010; Al-Khayri ve diğ., 2015; Jankowicz-Cieslak ve diğ., 2016).

Genetik çeşitliliğin artırılmasında mutasyonların kullanılması gittikçe önem kazanmaktadır. Tuzluluk, kuraklık gibi abiyotik çevresel stres koşullarına toleranslı bitkilerin geliştirilmesinde mutasyon ıslahı ile büyük başarılar sağlanmıştır. Mutasyonların teşviki için gama radyasyonu gibi fiziksel mutagenlerin ve EMS (etil metan sülfonat) gibi kimyasal mutagenlerin kullanımı

mutasyon frekansını arttırmaktadır. Mutasyon ıslahı yöntemi ile başta çeltik, buğday, patates, soya fasulyesi, yer fıstığı gibi önemli tarımsal bitkilerde tuzluluk, kuraklık toleransı, verim artışı, erkencilik, gibi özelliklerin teşvik edildiği yüzlerce yeni çeşit geliştirilmiştir (Bado ve diğ., 2015; IAEA, 2017).

Çeltik farklı gelişim dönemlerinde değişen tuzluluk tolerans düzeyleri sergileyebilen bir bitkidir. Özellikle çimlenme dönemlerinde tuzluluğa nispeten toleranslı olsa da erken fide dönemi, üreme dönemi, polenlenme ve başak bağlama dönemlerinde tuzluluğa karşı son derece hassastır (Singh, 2008). Bu sebeple ülkemiz koşullarına iyi adapte olabilen ve tuzluluğa toleranslı yerli çeltik çeşitlerinin ıslah edilmesi önem arz etmektedir. Bu tez çalışmasında ülkemizde yaygın ekime sahip yerli çeşit olan Osmancık-97 ve yeni geliştirilmiş olan Mevlütbey çeltik çeşitlerinde genetik çeşitliliğin gama radyasyonu kullanılarak arttırılması hedeflenmiştir. Elde edilen M₂ generasyonunda tuza toleranslı olarak seçilen mutant çeltik bitkilerinin seleksiyonu ve tuza toleranslı mutantların moleküler karakterizasyonu genomik (moleküler markör temelli ISSR yöntemi) ve proteomik (2D jel elektroforezi) açısından değerlendirilmesi ve biyokimyasal yanıtlarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Tez kapsamında elde edilecek mutantların tuzluluğa toleranslı çeşit ıslahı için kullanılabilecek olması, bu mutasyon çalışmasının uygulamadaki ve ekonomideki önemini göstermektedir.

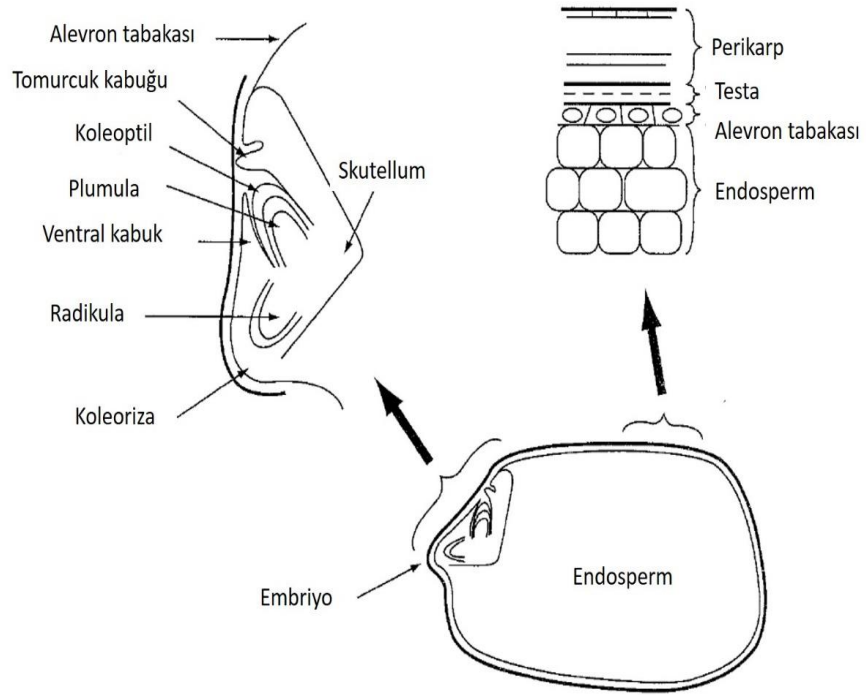
2. GENEL KISIMLAR

2.1. ÇELTİK (*Oryza sativa* L.)

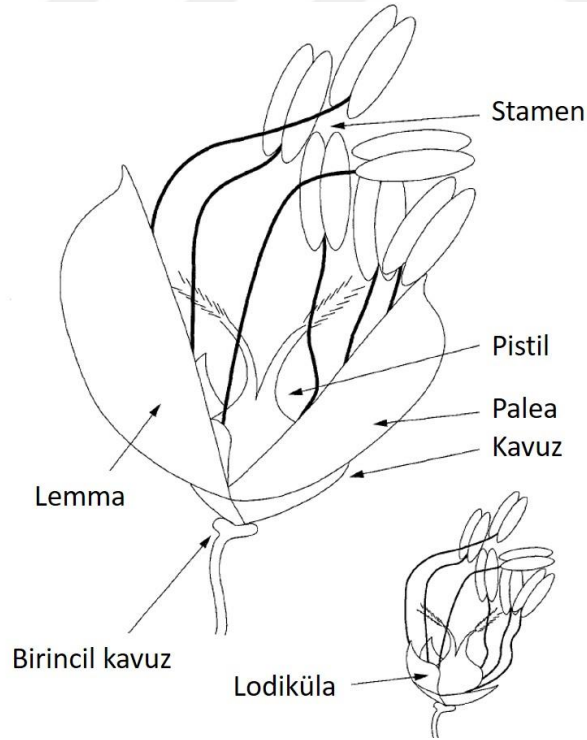
Çeltik (*Oryza sativa* L.) zengin karbonhidrat, protein, niasin (vitamin B3) gibi biyomoleküller ve bakır gibi gerekli mineraller içerir. Bu nedenle de ekimi yapılan en önemli tarım ürünlerinden biri olarak kabul edilir. Çeltik, 347 cins ve 2239 taksondan oluşan *Poaceae* ailesine ait $2n = 24$ kromozomlu bir bitkidir (Ghosh ve diğ., 2016, USDA, 2017). Çeltik bitkisinin güney Asya'da *Oryza rufipogon* ve *Oryza nivara* yabani öncülerinden kökenlendiği ve ilk domestik çeşitlerin M.Ö. 1500 – 2000 yılları arasında Çin (*O. sinica*), Hindistan (*O. indica*) ve Endonezya'da (*O. javanica*) birbirinden bağımsız olarak yetiştirildiği bildirilmektedir. M.Ö. 300 yıllarında Japonya'ya yayılım gösteren çeltik son 600 yılda sırası ile; Batı Afrika, Güney Amerika, Avustralya ile başlayarak tüm dünyada çok farklı coğrafyalara dağılmıştır (Juliano, 1993; Fuller, 2011; Silva ve diğ., 2015).

Çeltik çoğunlukla kendine döllen monokotil tek yıllık bir bitkidir. Olgun çeltik embriyosu skutellum adı verilen, endosperm dokusunu içeren büyük tek bir kotiledona sahiptir. Skutellum karbonhidratları depolayan ve çimlenme sırasında embriyoya enerji sağlayan bir dokudur. Embriyo gelişirken apikal meristemde radikula ve plumula gelişir. Gelişim sırasında radikula koleoriza tarafından plumula ise koleoptil tarafından korunur (Şekil 2.1). Çeltik bitkisinin vejetatif gelişimi çimlenmeden çiçeklenmeye kadar genel olarak 180 gün sürmektedir. Çeltik çiçekleri bir karpel ve altı stamen, iki lodikül ve iki asimetrik kavuzdan (lemma ve palea) oluşmaktadır. Şekil 2.2'de görüldüğü gibi çeltik çiçekleri petal içermemektedir (Izawa ve Shimamoto, 1996). Genom projesi tamamlanan ilk tahıl olan çeltik, diploid sayıda 24 kromozomu ile tahıllar arasında en küçük genoma sahiptir (389 Mb). Bu özelliği ile monokotillerin genom çalışmaları için referans teşkil eden bir bitkidir (Jackson, 2016).

Çeltik temel besin olarak tüketilen tüm tahıllar arasında sindirimi en kolay olan protein içeriğine sahiptir. Karbonhidrat bakımından zengin olup, tiamin, niasin, riboflavin, vitamin D gibi vitaminleri, demir ve kalsiyum başta olmak üzere birçok minerali ve lifleri içermektedir. Tüm çeltik çeşitleri glutensiz olduğundan dolayı, gluten tüketemeyen kişiler için dengeli bir besin



Şekil 2.1: Çeltik tohumunun anatomik yapısı (Izawa ve Shimamoto, 1996).



Şekil 2.2: Çeltik çiçeğinin anatomik yapısı (Izawa ve Shimamoto, 1996).

oluşturmaktadır. Yapısında kolesterol, yağ ve sodyum bulunmadığından hipertansiyon sorunu yaşayan kişilerin tüketimi için uygundur (Dahiya ve Saini, 2016). Tahıl, un, fermente içecek üretimi ve işlenmiş ürünlerin üretimi gibi farklı kullanım alanları bulunmakla beraber dünya genelinde üretilen çeltiğin % 85'i doğrudan insanların temel besini olarak tüketilmektedir. Buğday (% 70), mısır (% 15) gibi diğer tahılların doğrudan insan besini olarak tüketilme oranları değerlendirildiğinde çeltiğin insan dietinde kalori kaynağı olarak önemi ortaya çıkmaktadır.

Çeltik üretiminde dünyada başı çeken Çin, Hindistan, Endonezya, Bangladeş, Myanmar, Tayland, Vietnam gibi ülkelerde çeltik, insanların başlıca gıda kaynağıdır. Çeltik bu ülkelerde temel besin kaynağını oluşturduğundan, üretilen çeltiğin sadece % 6,8'i dünya ihracatına katılmaktadır (Awika, 2011; FAO, 2017).

Türkiye topraklarına yaklaşık 500 sene önce Mısır üzerinden geldiği düşünülen çeltiğin Cumhuriyet'in ilk yıllarında sadece Maraş, Diyarbakır, Bursa ve Kastamonu ile sınırlı bir ekim alanına sahip olduğu bildirilmektedir. Günümüzde üretim bölgelerine göre değerlendirildiğinde Marmara Bölgesi, ekim alanlarının % 72'si ile ilk sırada yer almaktadır. Marmara Bölgesi'ni % 19,2 ile Karadeniz Bölgesi ve % 4,5 ile İç Anadolu Bölgesi takip etmektedir. İller bazında değerlendirildiğinde Edirne, Türkiye üretiminde % 49,3'ü ile ilk sırada yer alırken % 12,5 ile Balıkesir ve % 8,6 ile Samsun, Edirne'nin arkasından gelmektedir. Türkiye'de çeltik üretimi 2017 senesinde 98 bin ha alanda 746 bin ton üretime sahiptir. Ülkemizde ıslah çalışmaları ile çeltik üretiminde bir artış sağlanmasına rağmen, elde edilen değerler ülke ihtiyacını karşılamaktan uzaktır. 2016 yılı itibarı ile 50 bin ton ihracata karşılık 300 bin ton ithalat yapılmıştır. Bu durum oluşan ihracat açığına bağlı ülkesel ekonomik kayıp meydana getirmektedir (Taşlıgil ve Şahin, 2011; IRRI, 2017).

2.2. KÜRESEL ISINMA

Küresel iklim değişimi, küresel sıcaklık ortalamalarındaki istatistiksel olarak anlamlı değişikliklerin tutarlı olarak uzun dönemlerde (birkaç on yıl veya daha uzun) devam etmesi olarak tanımlanmaktadır. Küresel iklim değişimleri doğal yollarla meydana gelebileceği gibi atmosfer bileşenlerinin insan faaliyetleri sonucu değiştirilmesi ile de meydana gelebilmektedir. Küresel iklim değişimleri doğal jeolojik süreçler ve dünya eksenindeki küçük kaymalar sonucunda da meydana gelebilmektedir. Dünyada son 650 bin yıl içerisinde yedi küresel

soğuma ve ısınma döngüsü meydana geldiği tespit edilmiştir. Son küresel soğumanın insan medeniyetlerinin oluşmaya başladığı 7000 yıl öncesinde sonlandığı bilinmektedir. İnsan faaliyetleri sonucu meydana gelen değişimler etkilerini çok daha kısa sürelerde gösterebilmektedir. Yaklaşık iki asır önce başlayan sanayi devrimi ile atmosferde büyük oranlarda sera gazları birikmeye başlamıştır (Singh, 2009).

2001 yılında üçüncü kez bir araya gelen İklim Değişikliği Üzerine Uluslararası Panel (IPCC), raporunda 1750 – 2000 yılları arasında karbon dioksit, metan ve nitrik oksit gibi sera gazlarının sırasıyla % 31, % 151 ve % 17 oranlarında arttığı bildirilmiştir (Hallett, 2002). Sera gazlarındaki bu artışlar küresel sıcaklık artışlarını tetikleyerek iklimleri daha büyük hızlarda etkilemektedir. Küresel yüzey sıcaklıklarının düzenli olarak ölçülmeye başlandığı 1860’lı yıllardan sonra 20. yy’ın sonuna kadar ortalama yüzey sıcaklığının 0,6 °C arttığı bildirilmiştir (Walther ve diğ., 2002). 1990 - 2000 yılları arası ortalama sıcaklıklar, bu dönemin ölçümü yapılmış en sıcak 10 yıl olduğunu ortaya koymuştur (Trenberth ve diğ., 2007). Bu sıcaklık artışı ekonomi, sağlık, güvenlik, gıda üretimi gibi pek çok farklı alanda sorunların ortaya çıkmasına neden olmuştur. Küresel iklim değişimi ile ekvator kuşağından kuzey ve güney kutuplarına doğru kayan sıcak iklim kuşakları, uzun süreli kuraklık görülen alanların artması, beklenmedik şiddetli yağışlarda artış, deniz seviyelerinin yükselmesi, yükselen deniz suyu seviyelerinin tatlı su kaynaklarını tuzlandırması, yıkıcı sel olaylarının görülme sıklığının artması, sıcaklık kuşaklarının genişlemesi meydana gelmiştir. Ayrıca tropik kuşağa özgü tarım zararlısı bitki ve böceklerin daha geniş coğrafyalara yayılması gibi nedenlerle de tarımsal gıda ürünlerinin üretimini olumsuz etkilenmeye başlamıştır (Parmesan, 2006; Singh, 2009).

IPCC, 2007 yılında yayınladığı dördüncü raporunda küresel deniz seviyelerinin son 10 yılda 17 cm yükseldiğini ve ulaşılan değerlerin 100 yıl öncesine göre 2 kat fazla olduğunu bildirmiştir. Okyanus suyu sıcaklıklarının son 20 senede, 12 yıl boyunca kaydedilen en yüksek değerleri geçmesi doğal olmayan yollardan meydana gelen iklim değişimlerinin çok daha kısa sürelerde etkilerini gösterebileceğini kanıtlamaktadır (Parry ve diğ., 2007).

Kanada ve Antartika gibi kutup coğrafyalarında ardı ardına karsız dönemlerin rapor edilmesi, ekosistemi geri dönüşü zor süreçlere sokabilecek küresel sıcaklık değerlerine ulaşıldığını veya bu değerlerin çoktan aşıldığını göstermektedir (Singh, 2009).

2.3. TUZ (NaCl) STRESİ VE BİTKİLERDE TUZ STRESİNE ADAPTASYON

Dünyada 800 milyon hektar alanın (toplam dünya yüzeyini % 6'sı) tuzluluktan etkilendiği bildirilmektedir (Reddy ve diğ., 2017). Tuzluluk; kurak ve yarı kurak olan bu alanların büyük çoğunluğunda tuzların doğal yollarla uzun süreli birikimi sonucunda meydana gelmektedir. Tuz birikiminin başlıca sebepleri arasında klor, sodyum, kalsiyum, magnezyum, sülfat, karbonat gibi farklı formlardaki tuzları yapısında bulunduran ana kayaçların zamanla rüzgar ve yağmurlarla çözünmesi gelmektedir. İkincil olarak ise, deniz ve okyanuslardaki tuzların rüzgar ve yağmurlarla taşınması gösterilebilir. Bu tuzlar arasında çözünme özelliği en yüksek olan ve en yaygın bulunan tuz “sofra tuzu” olarak bilinen sodyum klorürdür. Yağmur suyu 6 – 50 mg/kg düzeyinde sodyum klorür tuzu içerebilir. Düşük bir düzey olarak kabul görülebilecek 10 mg/kg sodyum içeren yağmur suyu, senelik olarak ortalama 100 mm yağış alan bir bölgede 10 kg/ha sodyum klorürün birikmesine yol açabilmektedir. Tarım alanlarında tuzluluğun artışına sebep olan bir diğer etmen farklı bölgelerdeki tuzlu kayalardan tuzları çözerek tarım alanlarına taşıyan sel sularıdır. 2 dS/m elektrik iletkenlik değerinin üzerinde tuzluluk değerine sahip sel sularının çeltik üretiminde hektar başına 1 ton ürün kaybı yaşattığı hesaplanmıştır (Asch ve Wopereis, 2001). Yağışların sellere sebebiyet verdiği Güney ve Güneydoğu Asya ülkelerinde çeltik tarımına elverişli milyonlarca hektar tarım alanında tuzluluktan dolayı ekili ürünlerde verimlilik azalmakta veya toprak ekilemez duruma gelmektedir. Doğal tuzluluktan bağımsız olarak tarım alanlarında yapılan yanlış sulama uygulamaları da bitki köklerinin ulaşabileceği derinliklerde tuz birikimine sebep olmaktadır. Sulama yapılmadan tarım yapılabilen 1,5 milyar hektar alanın % 2'sinde (32 milyon hektar) tuzlanma görülürken, sulama yapılan 230 milyon hektar tarım alanında bu oran % 20'ye (45 milyon hektar) yükselmektedir. Sulama ile tarım yapılan alanlar toplam tarım alanlarının % 15'ini oluşturduğundan dolayı bu değerler düşük görünse de, sulama yapılan tarım alanlarının verimi, sulama gerektirmeyen tarım alanlarının verimliliğinden daha yüksek olduğundan dolayı bu durum dünya besin üretiminin üçte birini etkilemektedir. Sulama verilerinin tutulduğu 75 ülkeden elde edilen bulgular, her sene 2000 hektar tarım alanının tuzlu kabul edilecek alanlara eklendiğini ortaya koymuştur. Tuzluluğun tarımsal etkileri bölgelere göre iklimsel veya jeolojik özelliklere göre değişiklikler gösterebilmektedir (Reddy ve diğ., 2017).

Tuzluluk stresi toprakta doğal olarak veya insan faaliyetleri sonucu biriken tuzların bitkiler için zararlı düzeye yükselmesi olarak tanımlanmaktadır. Bu seviye 4 dS/m ve daha yüksek elektrik

iletkenlik değerinde ve yaklaşık 40 mM NaCl'nin meydana getireceği osmotik basınca ($\sim 0,2$ MPa) sahip toprak anlamına gelmektedir. Topraktaki tuzun bitkiye etkileri, köklerden alınmadığı müddetçe oldukça düşüktür. Büyük zararlar doğurabilecek etkiler toksik düzeyde tuzun bitki içerisinde zamana bağlı olarak birikimi sonucunda oluşmaktadır. 500 mM gibi yüksek NaCl konsantrasyonlarında yetişen *Suaeda maritima* gibi halofit çeşitlerle yapılan çalışmalarda kök hücrelerinin vakuollerinde 500 mM'a kadar NaCl birikimi olabildiği ancak sitoplazmada bu oranın 100 mM'ı geçmediği bildirilmiştir. Sitoplazmada 150 mM konsantrasyonunun üzerindeki NaCl toksik etkiye sebep olmakta, protein sentezini ve enzim aktivitesini bozmakta, bitki gelişimini olumsuz etkilemektedir (Chowdhury ve diğ., 1995).

Bitkiler tuzluluğa ve diğer streslere hücreyel boyutta veya tüm organizma düzeyinde yanıt verebilirler. Tuzluluk stresi tohum çimlenmesini, fide gelişimini, yaprak yüzeyini, sürgün gelişimini, sürgün ve kök boyunu, sürgün yaş ve kuru ağırlığını, kardeşlenme sayısını etkiler. Çiçeklenme döneminde tuzluluk stresi devam ederse tozlaşmayı ve fertilizasyonu olumsuz etkileyebilmektedir. Ayrıca tuzluluk, çiçeklenme ve başaklanma süresini geciktirerek, verimlilikte azalmaya sebep olur. Aşırı tuz konsantrasyonları ve uzun süreli maruz kalmalar, fizyolojik kuraklık benzeri ozmotik stres meydana getirerek bitkilerin su ve besin maddelerine erişimini zorlaştırır. Tuzluluğun bitki gelişimi üzerindeki etkisi organizma düzeyinde birkaç gün ile birkaç hafta arasında gözlemlenebilir. Belirtilen etkiler tuzluluğun, stomaların kapanmasına sebep olması sonucu yapraklarda sıcaklık seviyesinin artması ve sürgün uzamasının azalması ile başlar. Bu durum ozmotik aşama (sürgünde tuz birikiminden bağımsız etki) olarak tanımlanmaktadır (Muranaka ve diğ., 2002; Munns ve Tester, 2008; Negrao ve diğ., 2017). Tuzluluğa maruz kalınma süresi uzadığında öncelikle yaşlı yaprakların olması gerektiğinden daha önce senesense uğraması ile tanımlanan iyonik aşama devreye girer. Stres sırasında çeltik bitkisinin gelişimi ve tuzun bitkinin üst kısımlarına doğru iletimi ozmotik düzenleme ile bağlantılıdır. Suda en kolay çözünen ve en yaygın bulunan tuz olması sebebi ile bitkiler, evrensel olarak NaCl'nin alımını ve birikimini düzenleyen mekanizmalar geliştirmişlerdir. Tüm bitkiler topraktan su alımı sırasında Na^+ ve Cl^- iyonlarının köklerden alımını engelleyen mekanizmalar ile tuzluluğa adapte olmuşlardır. Farklı türlerin sergilediği farklı mekanizmalar tuzluluğa karşı tolerans düzeylerini belirlemektedir. Bitkiler tuzluluğun gelişimlerine etkisine göre; toprak tuzluluğuna hassasiyet gösteren glikofitler ve yüksek konsantrasyonlarda tuzluluğu tolere edebilen halofitler olmak üzere iki temel gruba ayrılabilirler. Yaşam döngülerini 200 mM NaCl ve üzerindeki konsantrasyonlarda devam

ettirebilen halofitler, dünyadaki bitkilerin % 1'lik oranını kapsamaktadır. *Armeria maritima*, 12 g/kg sodyum ve 35 g/kg klor gibi yüksek değerlerde iyon barındırabilmektedir. Halofitlerin büyük çoğunluğu *Chenopodiaceae* ailesi üyesidir. 550 halofit türe sahip bu aile dışında *Poaceae*, *Fabeaceae* ve *Asteraceae* ailelerine mensup türlerin % 5'i halofittir. Glikofitler yaşam döngülerinde yapılarındaki sodyum konsantrasyonlarını düşük tutan (0,2 – 2 g/kg) bitkilerdir. Dünya üzerindeki bitkilerin % 98 – 99'u bu özelliği göstermektedir (Aslamsup ve diğ., 2011; Horie ve diğ., 2012; Kosova ve diğ., 2013a; Flowers ve Colmer, 2015; Green ve diğ. 2017).

Tahıllar arasında çeltik (*Oryza sativa*), 3 dSm⁻¹ EC eşik değeri ile tuzluluğa en hassas bitkidir (Faiyue ve diğ., 2012; Hoang ve diğ. 2016). Tuzluluğa hassasiyet ve toleranslılık açısından bu sınıflandırmanın yapılmasında, IRRI Knowledge Bank tarafından kullanılan standart değerlendirme skor tablosu oluşturulmuştur (Al-Amin ve diğ., 2013).

Çeltik evrimsel süreçte diğer birçok bitkide olduğu gibi tuzluluk stresine karşı adaptasyon mekanizmaları geliştirmiştir. Bu mekanizmalar arasında tuzluluğa karşı en yaygın yanıtları; ozmoprotektan moleküllerin üretimi ve biriktirilmesi, iyon homeostazisinin sağlanması, antioksidan enzimler ile reaktif oksijen türevlerinin (ROS) detoksifikasyonu ve programlı hücre ölümü sıralanabilir (Hoang ve diğ., 2016).

2.3.1. Osmoprotektan Moleküller

Osmoprotektan moleküller hücrenin osmotik stres altında sitoplazma hacmini korumak için üretilen küçük molekül ağırlıklı kimyasallardır. Osmoprotektan molekülleri dört ana kimyasal gruba ayırmak mümkündür. Bunlar, küçük karbonhidratlar (sukroz, fruktoz, nişasta, trehaloz vb) ve polioller (gliserol, inositol, sorbitol vb), amino asitler (glisin, prolin, taurin vb), metilaminler (glisin betain – GB , dimetilsülfonopropionat vb) ve üre olarak sınıflandırılabilir. Tuzluluğun osmotik etkileri ilk olarak köklerde kendisini gösterir. Tuzluluk ile birlikte artan osmotik stres, köklerden su ve gerekli minerallerin alınmasını önleyecek düzeyde osmotik basınca neden olarak bitki gelişimini doğrudan etkiler. Dubey ve Singh (1999) tuzluluk stresi altında çeltik başta olmak üzere birçok tahıl bitkisinde nişasta, sukroz, fruktoz gibi şekerlerin birikiminde artış gözlemlendiğini ve aynı zamanda şeker metabolizması ile ilgili enzim aktivitelerinde artışlar tespit edildiğini rapor etmişlerdir. Theerakulpisut ve diğerleri (2017) bitkilere gelişim sırasında uyguladıkları takviye kimyasalların, tuz stresi altında membran bütünlüğüne etkilerini araştırmıştır. Bu çalışmada mannitol takviyesi yaptıkları deney

gruplarında tuzluluk stresi etkilerinin (ortalama bitki boyu ve ağırlığı, membran geçirgenliği, klorofil miktarı) daha az olduğunu saptamışlardır. Özdemir ve diğ. (2004), tuz stresi altındaki çeltik bitkilerinin, membran stabilitesini sağlamak ve stresin meydana getirebileceği zararlanmaları gidermek için önemli ölçüde prolin biriktirdiğini belirtmişlerdir. Omokawa ve Aonuma (2002) üre türevi olan metilbenzil fenil ürenin (MBFU), çeltik kök ve bitki gelişiminde tuzluluk stresinin meydana getirdiği olumsuz etkileri önlemede etkili olduğunu rapor etmişlerdir. Ayrıca bu bitkide MBFU'nun tuzluluk stresi altında toplam protein miktarını koruduğunu da bildirmişlerdir.

2.3.2. İyon Homeostazisi

Yüksek tuz konsantrasyonlarında büyüyen bitkilerde köklerin dışında bulunan aşırı Na^+ , yüksek bir elektrokimyasal gradient oluşturarak Na^+ katyonlarının pasif taşıma ile K^+ kanallarından geçerek sitosolde birikmesine sebep olmaktadır. Sitosolde biriken aşırı Na^+ , enzim aktivasyonu ve protein biyosentezi gibi önemli metabolik süreçlerde K^+ katyonları ile rekabet eder. Öncelikle bitki köklerinde birikme gösteren Na^+ katyonlarının homeostazisi sağlanmaz ise birkaç gün ile bir hafta arasında yaşlı yapraklarda Na^+ artışı ve zamanından erken yaprak ölümleri gözlemlenir. Çeltik yapraklarında artan Na^+ konsantrasyonları doğrudan tuz stresinin seviyesi ile bağlantılıdır (Hoang ve diğ., 2016). Zeng ve diğ. (2017) çeltik bitkisinde Na^+/H^+ ve K^+/H^+ taşıyıcı olarak görev alan NHX proteinlerini kodlayan NHX1 homologu genlerin ekspresyonunda artış olduğunda çeltik bitkilerinin tuzluluğa karşı olan toleranslarının arttığını, bu genlerin domates ve *Arabidopsis* gibi bitkilerde susturulmalarının ise, tuzluluğa karşı hassasiyete neden olduğunu bildirmişlerdir. Campbell ve diğ. (2017) tuzluluk stresi altındaki çeltik bitkilerinde HKT1;1 geninin Na^+ taşınmasında önemli düzenleyici rollerinin olduğunu ve bu genin anlatımının azaltılması sonucunda tuzluluğa karşı hassasiyet meydana geldiğini rapor etmişlerdir. Pilahome ve diğ. (2017) çeltik bitkisinin özellikle kök dokularında OsHAK1 geninin ekspresyon seviyesinin K^+ transportu ile ilgili olduğunu ve bu genin anlatımının yüksek olduğu Pokkali gibi çeltik çeşitlerinde tuzluluğa karşı tolerans karakteri gözlemlendiğini belirtmişlerdir. Pokkali çeltik çeşidinin sahip olduğu tolerans mekanizması ile sitosole Na^+ akışını kontrol ettiğini, buna rağmen sitosole girebilen katyonları ise vakuollere topladığını rapor edilmektedir. Bu mekanizmaya sahip olmayan BRRI Dhan29 gibi çeltik varyeteleri ise tuzluluğa karşı hassasiyet sergilemektedirler (Hoang ve diğ., 2016).

2.3.3. Reaktif Oksijen Türevleri ve Antioksidan Enzimler

Reaktif oksijen türevleri (ROS) çevresel stres yanıtı, patojen enfeksiyonları, gelişimsel uyaranlar gibi sinyal iletimi gerektiren durumlarda görev alabildiği gibi, aşırı konsantrasyonlarda protein denatürasyonu, DNA mutasyonları ve hücre membranlarında yer alan lipidlerin peroksidasyonu gibi çeşitli zararlı etkilere de sahip olan çift yönlü moleküllerdir. Süperoksit (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikali ($\text{OH}^\cdot$), singlet oksijen ($^1\text{O}_2$) gibi reaktif oksijen türevleri fotosentez sırasında oksijen oranı oldukça yüksek olan kloroplastlarda oluşabilmektedir. Son derece reaktif olan süperoksit radikali oluştuğunda enzimatik olarak süperoksit dismutaz (EC 1.15.1.1) enzimi ile ve enzimatik olmayan yollardan hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüştürülür. Toksik bir ürün olan hidrojen peroksit, peroksidaz (EC 1.11.1.7) enzimi ve metal iyonlarının varlığında toksik özellikteki hidroksil radikale parçalanır. Hidroksil radikalleri ise sitoplazmada katalaz (EC 1.11.1.6) enzimi, kloroplastlarda ise askorbat peroksidaz enzim aktiviteleri sonucunda zararsız hale getirilmektedir (Parida ve Das, 2005). Diğer tüm mekanizmalar ile birlikte, reaktif oksijen türevlerinin meydana getirdiği oksidatif strese karşı antioksidan enzim aktivitelerindeki artışların önemini ortaya koyan pek çok çalışma yapılmıştır (Lee ve diğ., 2001; Swapna, 2003; Kumar ve diğ., 2009; Pushpalathha ve diğ., 2013; Sen ve Chandrasekhar, 2015; Joseph ve diğ., 2015a; Gharsallah ve diğ., 2016; Sindhi ve diğ., 2016; Vighi ve diğ., 2017). Vaidyanathan ve diğ. (2003) tuzluluğa hassas Pusa Basmati ve tuzluluğa toleranslı Pokkali çeltik çeşitlerine 100 mM ile 300 mM aralığında NaCl'yi 42 saat süre ile uygulamışlardır. Tuzluluğa toleranslı olduğu bilinen Pokkali çeltik çeşidi, tuzluluğa hassas Pusa Basmati çeşidi ile kıyaslandığında özellikle süperoksit dismutaz, askorbat peroksidaz ve glutatyon redüktaz antioksidan enzimlerini en yüksek konsantrasyonlarda arttırdığını rapor etmişlerdir. Çalışmanın sonucunda antioksidan enzimlerin anlatımı ile ilgili genlerin araştırılmasının toleranslı çeşitler geliştirmede katkı sağlayacağını belirtmişlerdir.

Katalaz, askorbat peroksidaz, süperoksit dismutaz ve glutatyon redüktaz gibi antioksidan enzimler farklı gen aileleri tarafından kodlanırlar. Çeltikte farklı hücre içi kısımlarda bulunan farklı askorbat peroksidaz izozimlerini kodladığı tanımlanmış 8 APX geni bulunmaktadır. İki sitosolik izoform *OsAPx1* ve *OsAPx2* tarafından kodlanmaktadır. İki peroksizom/glioksizom izoformu, *OsAPx3* ve *OsAPx4* tarafından kodlanırken, kloroplast kökenli izoformlar *OsAPx5*,

OsAPx6, *OsAPx7* ve *OsAPx8* tarafından kodlanmaktadır. *OsAPx5* ve *OsAPx6* izozimi aynı zamanda mitokondrilerde yer almaktadır (Teixeira ve diğ., 2004).

APX genlerinin çeşitli stres faktörleri altındaki düzenlenmesi stres toleransında önemli roller oynamaktadır. Çeltikte, sitosolik izozimler olan APX1 ve APX2'de meydana gelen mutasyonların, büyüme ve gelişme evrelerindeki bitkileri kuraklık, tuzluluk, soğuk gibi abiyotik streslere karşı duyarlı hale getirdiği rapor edilmiştir (Zhang ve diğ., 2013).

Normal fizyolojik koşullarda, APX2 aktivitesinin tespit edilmesinin zor olduğu, ancak stres koşullarında aktivitesinin anlamlı bir şekilde artışlar gösterdiği bildirilmiştir (Ishikawa ve Shigeoka, 2008). Ayrıca çeltikteki *OsAPx2* geninin anlatımının arttırıldığı transgenik *Arabidopsis* ve *Medicago sativa* türlerinde tuzluluğa karşı tolerans geliştiği belirtilmiştir (Lu ve diğ., 2007; Guan ve diğ., 2012).

Qian ve diğ. (2014) yapmış oldukları çalışmada çeltikteki *OsAPx2* geninin anlatımının alfalfa bitkisinde arttırılması ile tuzluluğa karşı tolerans geliştirildiğini bildirmişlerdir. Hong ve diğ. (2018a) APX proteinlerinin antioksidan savunmadaki rollerinin yanı sıra moleküler şaperon olarak da görevler üstlendiğini rapor etmişlerdir.

Tüm superoksit dismutaz izozimleri nükleus tarafından kodlanarak ilgili hücresel kısımlara yönlendirilmektedir. Bu yönlendirmede yapılarında bulunan amino-terminal hedefleme dizileri görev almaktadır. SOD izozimleri metal kofaktörlerine ve/veya hücre içerisindeki konumlarına göre adlandırılırlar. Fe-SOD kloroplastta, Mn-SOD mitokondri ve peroksizomlarda, Cu/Zn-SOD kloroplast, peroksizom, sitosöl ve hücrelerarası boşlukta görev alabilmektedir (Rossatto ve diğ., 2017). Çeltikte, beş tane Cu/Zn-SOD, iki tane Fe-SOD ve bir tane Mn-SOD olmak üzere sekiz tane SOD geni tanımlanmıştır (Guan ve diğ., 2017).

Badawi ve diğ., (2004) çeşitli stres faktörlerinin meydana getirdiği oksidatif strese yanıt olarak farklı SOD izozimlerinin, etkilerini araştırmışlardır. Çeltiğe ait kloroplastik SOD genlerini klonladıkları bütün bitkilerinde tuzluluk ve kuraklık toleransının geliştiğini bildirmişlerdir.

Tütün Mn-SOD genleri aktarılan transgenik buğday protoplastlarında yükselen SOD aktivitesi sonucunda düşük fotooksidatif hasarlanma gözlemlendiği Melchiorre ve diğ. (2009) tarafından bildirilmiştir.

Cu/Zn-SOD anlatımının arttırıldığı *Arabidopsis thaliana* bitkilerinde tuzluluk stresine karşı tolerans oluştuğu ve artan H₂O₂ konsantrasyonlarına daha iyi direnç gösterdiği, ayrıca Mn-SOD anlatımının arttırıldığı *A. thaliana* bitkilerinde tuz stresi altında aktiviteleri artan Mn-SOD, Cu/Zn-SOD, Fe-SOD, CAT ve POD sonucunda tuz toleransı geliştiği rapor edilmiştir (Wang ve diğ., 2004).

Katalaz, *CatA*, *CatB* ve *CatC* genleri tarafından kodlanan küçük bir gen ailesi tarafından düzenlenirken, çeltikteki glutatyon reduktaz izozimleri sitosolde *OsGR2*, kloroplastta ise *OsGr1* ve *OsGR3* tarafından kodlanmaktadır (Bashir ve diğ., 2007). CAT hücre içerisindeki H₂O₂ seviyesini kontrol ederek çimlenme hızını düzenleyebilmekte (Wadsworth ve Scandalios, 1990) ve fotosentetik süreçleri yönlendirebilmektedir (Willekens ve diğ., 1997).

Motohashi ve ark. (2007) *Escherichia coli* kökenli katalaz enzimini kodlayan *katE* genini Nipponbare, Kasalath ve BR5 çeltik çeşitlerine *Agrobacterium tumefaciens* aracılığı ile aktarmışlardır. *katE* anlatımı yapan transgenik çeltik bitkilerinde, H₂O₂ yıkımında artış elde edildiğini ve tuzluluk toleransının 1,5 – 2,5 kat arttığını rapor etmişlerdir. Gen aktarımı yapılmayan her üç çeşide ait bitkilerin 50 mM NaCl konsantrasyonunun üzerinde canlı kalamadığını, Ksalath ve BR5 çeşitlerinin gen aktarımından sonra 100 mM ve Nipponbare çeşidinin 250 mM NaCl konsantrasyonlarında tohum verebildiğini bildirmişlerdir.

Yamane ve diğ. (2010) yapmış oldukları çalışmada çeltik yapraklarında tuz stresi (200 mM) sonrasında katalaz ve askorbat peroksidaz gen anlatımlarında meydana gelen değişiklikleri incelemişlerdir. Çalışma sonucunda, kontrol ve tuz uygulanmış çeltik yapraklarında *CatA* aktivitesi tespit etmemişlerdir. *CatB* gen anlatımının kontrol bitkilerinde 24, 28 ve 72. saatlerde azaldığını, ancak tuz uygulanan çeltik yapraklarında tüm saatlerde anlatımın artış gösterdiğini bildirmişlerdir. *CatC* anlatımının 48. saate kadar artış gösterdiğini, 72. saatte ise, kontrol seviyesinin üzerinde anlatım olmasına rağmen 48. saate göre azalma meydana geldiğini bildirmişlerdir.

2.3.4. Programlı Hücre Ölümü

Tuzluluk ve diğer birçok çevresel abiyotik stres koşuluna yanıt olarak devreye giren tüm bu mekanizmalar haricinde, eğer bu mekanizmaların yetersiz kalacağı boyutlarda ve/veya sürelerde stres devam ederse bitkiler tuzluluğun genç yaprakları etkilemesini önleyecek son önlem olarak programlanmış hücre ölümünü (PCD) kullanır. Diğer doku ve hücrelerin zarar

görmesini engelleyen genetik ve fizyolojik mekanizmalarca kontrol edilen programlı hücre ölümü canlılar aleminde çok hücreliler arasında evrimsel olarak korunmuş bir mekanizmadır. Hücre sayısını sabit tutmada ve hasar görmüş hücre ve dokuların organizmaya zarar vermesini önlemede önemli rolü olan PCD, tuzluluk stresi altındaki bitki köklerinde homeostazinin korunmasında da görev almaktadır (Yazdani ve Mahdiah, 2011; Hoang ve diğ., 2015; Petrov ve diğ., 2015; Hoang ve diğ., 2016). Li ve diğ. (2007) 500 mM gibi sadece halofitlerin canlılıklarını sürdürebilecekleri konsantrasyonlarda NaCl uyguladıkları WYJ8th çeltik çeşidinde süperoksit dismutaz gibi antioksidan enzimlerin 1,76 katı aktivite değerlerine yükselmelerine rağmen oksidatif hasarın fazlalığından dolayı bitkinin kök uçlarında programlı hücre ölümüne gidildiğini rapor etmişlerdir. Meydana gelen programlı hücre ölümünün, hayvan hücrelerinde karakteristik olarak meydana gelen mitokondriden sitoplazmaya sitokrom c (cyt c) salımı yolu ile gerçekleştiğini bildirmişlerdir. Chen ve diğ. (2009a) aynı çeltik çeşidi ile çalışarak 500 mM NaCl stresini iki saat süre ile uygulamışlardır. Çeltik örneklerinin kök uçlarında meydana gelen programlı hücre ölümünü incelemek için iki boyutlu proteomik analizi yaptıklarında hayvan hücrelerinde apoptoz baskılanmasında görev alan HSP70 ısı şoku proteininin artış gösterdiğini ve bu proteinin çeltik bitkisi kök uçlarında programlı hücre ölümünün başlatılması ile ilgili olabileceğini bildirmişlerdir.

2.4. MUTASYON ISLAHI

Canlı bir organizmada rekombinasyondan bağımsız olarak genetik materyalde meydana gelen ani kalıtsal değişiklikleri tanımlayan “mutasyon” terimi ilk olarak de Vries tarafından Mutationstheorie I (1901) yayınında kullanılmıştır (Oladosu ve diğ., 2016). Mutasyon ıslahı ise, tarımsal ürün geliştirmek için biyolojik materyallerin bilinçli olarak mutagenlere maruz bırakılması ile mutasyon frekansının doğal mutasyon frekansının üzerine çıkacak şekilde teşvik edilmesi şeklinde Freisleben ve Lein (1942) tarafından kullanılmıştır. Canlılarda genetik varyasyon meydana getiren mutasyonlar, spontan (doğal) ve teşvik edilmiş olarak ikiye ayrılırlar. Çok uzun sürelerde kendiliğinden meydana gelen spontan mutasyonların sağladığı genetik çeşitlilik bitkilerin kökenlendikleri çevresel koşullardan çok farklı ortamlara (yükseklik, sıcak, soğuk, tuzlu, alkali, kurak vb.) adaptasyon sağlamasına olanak sağlamıştır (Shu ve diğ., 2012; Bado ve diğ., 2015; Jankowicz-Cieslak ve diğ., 2016).

Spontan mutasyonlar bitkilerin üreme süreçlerinde maruz kalacakları doğal fiziksel etmenler (güneşin UV ışınları, kozmik radyasyon, dünyanın doğal radyoaktivitesi), kimyasallar

(alkilleyici ajanlar, baz analogları, antibiyotikler) ve biyolojik faktörler (transpozon aktivasyonu) sonucunda meydana gelebilir. DNA replikasyonu, onarımı veya hareketli genomik elementlerin faaliyetleri sırasında oluşabilecek spontan mutasyonların frekansının bitkilerde 10^{-6} olduğu hesaplanmıştır (Lehnert, 2007). In vitro ve in vivo çoğaltım işlemleri sırasında gen metilasyonu gibi epigenetik değişimlerin veya transpozonların hareketi sonucunda somaklonal varyasyon ile spontan mutasyonların frekansının artabileceği de bilinmektedir. Bu değişiklikler doğada genom içerisindeki hareketli elementler olan transpozonlar aracılığı ile meydana gelebilmektedir. Bu elementlerin hareketleri sonucu gen fonksiyonunun kaybedilmesi veya kazanılması, birçok fizyolojik süreci yönetmektedir. Somaklonal varyasyon ile bitkilerde birçok özelliğin değiştirilebileceğini gösteren çalışmalar mevcuttur. Buna rağmen ıslah çalışmalarında bu yöntemle saptanan düşük mutasyon frekansından dolayı yaygın olarak kullanılmamaktadır (Lehnert, 2007; Bado ve diğ., 2015). Mutasyonların oluşumu gama ışınları gibi fiziksel veya kimyasal mutagenlerin kullanımı ile teşvik edilebilmektedir. Mutagenlerin kullanımı ile spontan mutasyonlara kıyasla 10^3 kat daha fazla mutant elde etmek mümkündür (Bado ve diğ., 2015). Ossowski ve diğ. (2010) *Arabidopsis* bitkisi ile yaptıkları çalışmada 30 generasyonda elde ettikleri spontan mutasyon frekansını 7×10^{-9} olarak hesaplamıştır. Kimyasal bir mutagen olan EMS ile mutasyonu teşvik ettiklerinde ise, ikinci generasyonda 3×10^{-5} frekansında mutasyon tespit etmişlerdir.

Fiziksel ve kimyasal mutagenlerin kullanımı ile mutasyonların teşviki sonucu meydana gelebilecek genetik değişiklikleri genom mutasyonları, kromozom mutasyonları ve gen mutasyonları olarak sınıflandırmak mümkündür (Lagoda; 2007; Jain ve diğ., 2013; Azman ve diğ., 2014; Bado ve diğ., 2015; Oladosu ve diğ., 2016; Raina ve diğ., 2016).

Genom mutasyonları bitkide genom miktarını (ploidi) ve genom içi yeniden düzenlenmeleri etkileyen mutasyonlardır. Doğada birçok bitki poliploid durumdadır (ekmeklik buğday=6X, durum buğdayı=4X, pamuk=4X, patates=4X). Poliploidi bitkilerde nukleusun büyümesi, hücre ve organizma düzeyinde büyüme, ürün verimliliğinde artış, gen çeşitliliğinin artması gibi avantajlar sağlamaktadır. Doğada genom duplikasyonu (otoploidi) ve genom artışı (alloploidi) şeklinde meydana gelebilen poliploidi mutagenlerin kullanımı ile teşvik edilebilmektedir (Dhawan ve Lavania, 1996; Shu ve diğ., 2012).

Kromozom mutasyonları doğada mayoz bölünme sırasında çok düşük frekanslarda meydana gelebilmektedir. Tüm kromozomlarından birer set bulunduran öploid durumdaki bitkilerde

radasyon uygulamaları ile kromozom parça delesyonları, insersiyonları veya translokasyonları meydana getirilerek anöploid sağlanabilmektedir. Kromozom inversiyonları bir kromozom kolunun veya parçasının koparak 180 derece döndükten sonra tekrar kromozom ile birleşmesi ile gerçekleşir. Bu inversiyonlar yüksek oranda gen rekombinasyonlarına sebebiyet vermektedir. Kromozom translokasyonları kopan kromozom parçalarının aynı kromozoma (intra-kromozomal) veya farklı bir kromozoma (inter-kromozomal) yer değiştirmesi ile gerçekleşir. Kromozomlar arası yada aynı kromozom içerisindeki parça değişimleri de benzer şekilde gen anlatımında olumsuz etkiler yaratmamaktadır (Shu ve diğ., 2012; Bado ve diğ. 2015).

Gen mutasyonları gen kopya sayısında değişiklikler şeklinde olabileceği gibi nokta mutasyonlar, insersiyon, delesyon şeklinde DNA dizisinde nukleotidler üzerinde de meydana gelebilir. Bitkiler, metabolik fonksiyonları gereği protein anlatımını arttırmak için gen kopya sayıları artabilirler. Mutagenler gen kopya sayılarında artış veya azalmalara sebep olarak gen anlatım seviyelerini etkileyebilecek mutasyonlar meydana getirebilirler. Nokta mutasyonlar özellikle kimyasal mutagen uygulamaları sonucunda yaygın olarak görülürler. Tek bir nukleotidte veya birden fazla nukleotidte değişiklik meydana geldiğinde, değişiklik gen bölgesinde değilse sessiz mutasyonlar meydana gelebileceği gibi, gen bölgesinde meydana gelerek fonksiyonel olmayan gen ürünlerinin üretilmesine de sebep olabilir. Nukleotid insersiyonları veya delesyonları kodonların yapısını değiştirerek genlerin açık okuma çerçevelerinde kayma meydana getirebilir ve farklı ürünlerin oluşmasına sebebiyet verebilir. Bu değişiklikler genlerin promotör bölgelerinde, kodlama yapan bölgelerinde intron bölgelerinde meydana gelebileceğinden gen anlatımı ve protein üretimi bakımından büyük sonuçlar doğurabilirler (Shu ve diğ., 2012; Bado ve diğ. 2015).

Tek nukleotid değişimleri, delesyonları gibi gen mutasyonları çoğu zaman fonksiyonel değişimlere sebebiyet verebilecek yeni allellerin oluşmasına yol açmaktadır. Bu nedenle ıslah çalışmalarında yeni genetik varyasyonlar meydana getirmeleri açısından önemlidirler. Nukleotid farklılıkları sonucu meydana gelen varyasyonların çeltik, buğday, arpa, soya gibi bitkilerde bitki uzunluğu, abiyotik stres direnci, pestisit ve herbisit direnci gibi agronomik özelliklerde avantajlar meydana getirdiğini gösteren birçok çalışma mevcuttur (Rostoks ve diğ., 2005; Jehan ve Lakhanpaul, 2006; Tondelli ve diğ., 2006; Tuberosa ve Salvi, 2006). Nukleotid mutasyonları gen olarak ifadesi olmayan bölgelerde de meydana gelebilmektedir. Bu tür

mutasyonlar gen anlatımında farklılığa sebep olmayarak sessiz mutasyonlar olarak adlandırılırlar. Sessiz mutasyonlar çoğunlukla alkilleyici kimyasalların uygulanması sonucunda meydana gelmektedir ve translasyonda farklılık meydana getirmemektedir (Lehnert, 2007). Genler arası bölgelerde meydana gelen delesyonlar düzenleyici dizilerde kayıp olmazsa sessiz mutasyonlara sebep olabilmektedir. Ancak meydana gelen delesyonlar veya insersiyonlar açık okuma çerçevelerinde kaymaya sebep olup, translasyonun zamanından önce sonlanmasına, bunun sonucu olarak da fonksiyonel olmayan peptidlerin oluşmasına yol açabilmektedir (Bado ve diğ., 2015).

Mutasyon ıslahı çalışmalarında tüm bitki, tuberler, sürgün uçları, polenler, in vitro eksplantlar, embriyolar, mikrosporlar, kallus kültürleri başlangıç materyali olarak kullanılabilse de, tohumlar metabolik olarak inaktif durumda olmaları, kolay taşınabilmeleri, uygulama kolaylığı, az yer kaplaması, kolay depolanabilmesi gibi avantajlarından dolayı ıslahçılar tarafından daha fazla tercih edilmektedir.

Mutagen tercihi mutasyon ıslahı başarısını belirleyen diğer önemli bir faktördür. Mutagen olarak fiziksel, kimyasal veya biyolojik ajanlar yaygın olarak kullanılmaktadır. Fiziksel mutagenler olarak iyonize edici radyasyonlar kullanılmaktadır. Bunlar partiküler (elektronlar, protonlar, nötronlar, alfa ve beta partikülleri) ve elektromagnetik radyasyon (X-ışınları, gama ışınları) kaynaklarıdır. İyonize edici radyasyonlar genetik materyal ile etkileşime geçerek DNA dizilerinde mutasyonlara sebep olmaktadır. Meydana gelen mutasyonun boyutu uygulanan radyasyon dozu ile orantılıdır. Biyomoleküller tarafından absorblanan radyasyon ve kullanılan bitki materyaline göre kullanılacak radyasyon ve dozunun optimize edilmesi büyük önem taşımaktadır. Mutasyon ıslahı ile elde edilen çeşitlerin % 80'i fiziksel mutagenler kullanılarak elde edilmiş olup, bu mutant çeşitlerinin % 60'ı gama radyasyonu ile elde edilmiştir (Bado ve diğ., 2015). Kimyasal mutagenler çok büyük çeşitlilik gösterse de en yaygın mutagen kimyasal sınıfı alkilleyici ajanlar olarak bilinmektedir. En yaygın kullanılan alkilleyici ajanlar arasında etilmetan sülfonat (EMS), dietil sülfat (DES), etilen imin (EI), etil nitroz üretan (ENU), etilnitrozüre (ENU), metilnitrozüre (MNU) sayılabilmektedir. Alkillenmiş O⁶ guanin, N³ adenin, N³ sitozin meydana getiren bu alkilleyici ajanlar yeni gen allellerinin oluşmasına sebep olmaktadır. Alkilleyici ajanların haricinde nitrik asit, nükleik baz analogları, bazı antibiyotikler (streptozosin, mitomisin C, azaserin) topoizomerez kullanılan diğer kimyasal mutagen ajanlardır. Kimyasal mutagenler ile elde edilen mutant çeşitlerin % 60'ı EMS, MNU ve ENU

uygulaması ile elde edilmiştir. Bu çeşitlerin üçte biri, uygulama ve temin kolaylığı avantajları bakımından yaygın kullanıma sahip EMS ile elde edilmiştir. Genomda yaygın olarak bulunan ve genom içerisinde hareket edebilen transpozonlar, biyolojik mutagenler olarak adlandırılırlar. Transpozonlar, gen fonksiyonunu ve ekspresyonunu etkileyebilen ve sonraki generasyonlara aktarılabilen insersiyonlar meydana getirerek mutagenik etkiler meydana getirirler (Shu ve diğ., 2012; Bado ve diğ., 2015; Jankowicz-Cieslak ve diğ., 2016; Oladosu ve diğ., 2016; Raina ve diğ., 2016).

Fiziksel mutagenler arasında en yaygın kullanılan kaynaklar gama radyasyonu yayan radyasyon kaynaklarıdır. Doğada potasyum-40 (^{40}K) gibi gama radyasyonu yayan izotoplar bulunsa da, rutin mutasyon ıslahı çalışmalarında kobalt-60 (^{60}Co) ve sezyum-137 (^{137}Cs) en sık kullanılan kaynaklardır. Uluslararası Atom Enerjisi Ajansı (IAEA) Mutant Varyete Veritabanı (MVD) sisteminde son 10 yılda ^{137}Cs kullanılarak elde edilmiş, çeltik, soya, domates, buğday başta olmak üzere 29 farklı bitkiden 121 adet mutant kayıtlı bulunmaktadır (Shu ve diğ., 2012; IAEA, 2017).

2010 yılından günümüze kadar geçen sürede, mutasyon ıslahı yöntemi kullanılarak geliştirilen ve Uluslararası Atom Enerjisi Kurumu Mutant Varyete Veritabanı'na kayıt ettirilen 11 çeltik mutanı bulunmaktadır (IAEA, 2017). Bu mutantlara ait özellikler Tablo 2.1'de sunulmaktadır.

Aynı veritabanında bu süre içerisinde Türkiye'de, tuzluluk toleransı ile ilgili herhangi bir mutant çeşit tescil edilmemiştir. Ülkemizde mutasyon ıslahı ile ilgili çalışmalar yapılmakta olup, son yıllarda Nahita patates, Aldamla kiraz, Burak tatlı kiraz, Birkan susam mutantları mutasyon ıslahı yöntemi ile elde edilerek veritabanına tescil edilmiştir. Bu veritabanına göre 2016 yılında Marfona patates çeşidinin köklerine 25 Gy gama radyasyonu uygulayarak erken olgunlaşan Nahita (Mutant Varyete Kodu 4463) mutanı geliştirmiştir. 2014 yılında 0900 Ziraat kiraz çeşidine ait olgunlaşmakta olan tomurcuklara 25 Gy gama radyasyonu uygulamış ve yüksek meyve kalitesine sahip Aldamla mutanı ve aynı sene içerisinde 0900 Ziraat çeşidine ait olgunlaşmakta olan vejetatif dokulara 50 Gy gama radyasyonu uygulayarak büyük meyveli ve yüksek verimli Burak tatlı kiraz mutanı elde edilmiştir. 2011 yılında ise, susam tohumlarına 400 Gy gama radyasyonu uygulayarak yüksek verimliliğe sahip Birkan mutanı geliştirmiştir (IAEA, 2017).

Tablo 2.1: Son 10 yılda Uluslararası Atom Enerjisi Kurumu Mutant Varyete Veritabanı'na kayıt ettirilen çeltik mutantları ve özellikleri.

Çalışmacılar / Ülke / Yıl	Bitki / Varyete / Materyal	Radyasyon Kaynağı ve Dozu	Mutant Varyete Kodu / Adı	Kazandırılan Karakter(ler)
Azad ve Rani / Bangladeş / 2017	Çeltik / NERICA-10 / Tohum	Karbon iyon / 40 Gy	4465 / Binadhan-19	Kısa boy, yüksek verim, kuraklığa tolerans
Tuyen ve diğ. / Vietnam / 2017	Çeltik / TL6.2 / Tohum	Gama / 250 Gy	4493 / DT80	Geniş yaprak, salkım sayısı ve tane sayısında artış
Azad ve diğ. / Bangladeş / 2015	Çeltik / BRRIdhan29 / Tohum	Karbon iyon / 40 Gy	4452 / Binadhan-18	Aroma ve yüksek verimlilik
Azad ve diğ. / Bangladeş / 2015	Çeltik / Ashfal / Tohum	Karbon iyon / 200 Gy	4453 / Binadhan-14	Yüksek sıcaklığa dayanıklılık, erkencillik
Cabusora ve diğ. / Filipinler / 2013	Çeltik / Pokkali / Tohum	Co-60 / 250 Gy	4467 / Rc346	Erken olgunlaşma, salkım ve tane sayısı bakımından randımanlılık
SiYong ve diğ. / Kore Cumhuriyeti / 2011	Çeltik / Koshihikari / Anter kökenli kallus	Gama / 70 Gy	3444 / Goldami 1ho	Yüksek protein ve amino asit
SiYong ve diğ. / Kore Cumhuriyeti / 2011	Çeltik / Koshihikari / Tohum	Gama / 250 Gy	3445 / Wonmyong	Yatmaya mukavemet, yüksek verim
Cabusora ve diğ. / Filipinler / 2011	Çeltik / Tohum	Co-60 / 250 Gy	4468 / Rc272	Tuzluluk ve kuraklık toleransı
Human / Endonezya / 2010 - 2011	Çeltik / PW 1-PsJ / Tohum	Gama / 250 Gy	3340 ve 3343 / Pandan Putri ve Si Denok	Erken olgunlaşma, yüksek tane kalitesi, yüksek verim

2.5. ISSR PZR YÖNTEMİ

Mullis ve diğ. (1986) DNA'nın in vitro koşullarda spesifik enzimlerle DNA'yı çoğalttıkları ve polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) adını verdikleri teknikten sonra 90'lı yılların başlarında DNA markör temelli bir çok teknik geliştirilmiştir. Bu teknikler, Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD - Randomly Amplified Polymorphic DNA), Basit Tekrarlı Diziler Arası (ISSR - Inter Simple Sequence Repeats), Basit Sekans Tekrarları (SSR-Simple Sequence repeats), Çoğaltılmış Parça Uzunluklarında Farklılıklar (AFLP - Amplified Fragment Length Polymorphism), Kesilmiş Parça Uzunluklarında Farklılıklar (RFPL - Restriction Fragment Length Polymorphism)'dır. Moleküler markörler herhangi bir özelliği kodlaması gerekmeyen çevresel koşullardan etkilenmeyecek Mendel genetiği kurallarına göre kalıtılan kromozom segmentleridirler. Kromozomların bazı segmentleri diğerlerine göre daha hızlı değişim gösterirler. Örneğin kromozomlarda kodlama yapan bölgeler kodlama yapmayan bölgelere ile karşılaştırıldığında daha hızlı değişirler (Abdel-Mawgood, 2012). Bu nedenle popülasyonların ve bireylerin DNA parmak izi çıkarılırken çalışmanın amacına göre uygun markör belirlenmesi büyük önem taşımaktadır (Gupta ve diğ., 2002; Semagn ve diğ., 2006; Abdel-Mawgood, 2012; Ng ve Tan, 2015; Yang ve diğ., 2015).

Mikrosatellitler genom içerisinde yer alan 2 – 5 nukleotidlik DNA motiflerinin birçok defa tekrar etmesi ile oluşan bölgelerdir. ISSR'ler ise her iki ucu mikrosatellit diziler ile biten DNA segmentlerini tanımlamaktadır. İsteğe göre sentezlenebilen, tekrarlı mikrosatellit dizilerin tamamlayıcısı primerler kullanılarak yapılan PZR uygulamaları ile çoğaltılan fragmentler genetik varyasyon belirlenmesi çalışmalarında markör olarak kullanılmaktadır (Gupta ve diğ., 2002; Semagn ve diğ., 2006; Abdel-Mawgood, 2012; Ng ve Tan, 2015; Yang ve diğ., 2015).

ISSR markörleri AFLP ve RAPD markörlerinin üyesi olduğu çok lokuslu, dominant markörler sınıfına dahildirler. Dominant markörler homozigot ve heterozigot arasındaki ayrımı kesin şekilde gösteremese de, tek bir reaksiyonda hedef bölgenin DNA dizisini bilmeden herhangi bir türün genomu boyunca birçok lokusa ait çok sayıda DNA fragmenti oluşturmaları sebebiyle tercih edilirler. Genetik markör olarak kullanımlarının yanı sıra, bu dominant markörler ko-dominant markörler geliştirmenin ilk adımlarını da oluştururlar. Bu kullanıma örnek olarak tek lokusta ko-dominant Dizisi Karakterize Edilmiş Çoğaltılmış Bölge (SCAR - Sequence Characterised Amplified Region) markörlerinin ve tek lokusta ko-dominant

mikrosatellit markörleri olan ISSR markörlerinin geliştirilmesi verilebilir (Gupta ve diğ., 2002; Semagn ve diğ., 2006; Abdel-Mawgood, 2012; Ng ve Tan, 2015).

Genetik varyasyon çalışmalarının çoğunda iyi bir genetik markör, çalışılan genoma ait çok lokuslu veri sağlamalı ve yüksek çeşitliliğe sahip olmalıdır. ISSR markörleri yüksek çeşitliliğe sahip mikrosatellit dizilerini hedef aldığı ve genom boyunca yaygın şekilde dağılım gösterdiği için geniş kullanıma sahiptir. Bu özelliklerinin yanı sıra RAPD gibi tekniklerle kıyaslandığında tekrarlanabilir sonuçlar vermesi, AFLP gibi tekniklerle kıyaslandığında ise, daha az zaman ve paraya ihtiyaç duyması ISSR markörlerinin avantajlarını arttırmaktadır. Özellikle popülasyonlar arasında bireylerin yakınlığının karakterizasyonu, DNA parmakizi, gen işaretleme, klonal varyasyonun belirlenmesi, çeşit tanımlanması, filogenetik analizler, genomik instabilitenin belirlenmesi ve hibridizasyonun değerlendirilmesi gibi çalışmalarda ISSR markörlerinin yaygın olarak kullanıldığını görmek mümkündür (Gupta ve diğ., 2002; Semagn ve diğ., 2006; Abdel-Mawgood, 2012; Ng ve Tan, 2015; Yang ve diğ., 2015).

Tripathy ve diğ. (2016) EMS kullanılarak geliştirilen 36 tane çeltik mutantından, meydana gelen genetik varyasyonu 12 RAPD ve 11 ISSR primeri kullanarak değerlendirmişlerdir. RAPD primerleri 92 ISSR primerleri 77 bant meydana getirirken % 86,95 ve % 94,8 gibi yüksek oranlarda polimorfizm tespit edilmiştir. Yine Tripathy ve diğ., 2012 yılında yaptıkları bir diğer çalışmada EMS ve NG (nitrozoguanidin) kullanılarak geliştirilen 11 çeltik mutantı arasında meydana gelen genomik farklılıkları 13 RAPD ve 11 ISSR primeri ile göstermişlerdir. Bu çalışmada sırası ile % 78,32 ve % 96,55 oranlarında polimorfizm elde ettiklerini rapor etmişlerdir.

Kanawapee ve diğ. (2011) 30 farklı çeltik çeşidini RAPD ve ISSR markörleri ile değerlendirerek, tuzluluğa tolerans bakımından toleranslı (5 çeşit), orta derecede toleranslı (10 çeşit), orta derecede hassas (9 çeşit), hassas (4 çeşit) ve yüksek derecede hassas (2 çeşit) olmak üzere 5 farklı sınıfa ayırmışlardır.

Al-Turki ve Basahi (2015) 14 farklı ISSR primeri kullanarak 27 farklı çeltik çeşidi arasındaki genetik yakınlığı araştırmışlardır. Çalışma sonucunda değerlendirdikleri çeltiklerin, dördünün birbirine yakın olmakla birlikte, toplamda 7 farklı coğrafi bölgeye ait çeşitlerden kökenlenerek dağılım gösterdiğini belirlemişlerdir.

Shahin Kaleybar ve diğ. (2015) 32 farklı çeltik çeşidini 17 farklı ISSR primeri ile değerlendirmiş ve çeşitleri birbirine genetik yakınlıkları bakımından 6 alt-kümeye ayırmıştır.

Indica çeltik çeşidine ait 30 varyetenin DNA parmakizi çalışması Singh ve Sengar (2015) tarafından 10'ar adet RAPD, ISSR ve SSR markörünü kullanarak gerçekleştirilmiştir.

Qian ve Hong, (2001) ise, 20 RAPD ve 12 ISSR primeri kullanarak Çin'in iki farklı bölgesinden 5 farklı yabancı çeltik çeşidini genetik çeşitlilik açısından değerlendirmiş ve popülasyonlar arasındaki yakınlığın düşük olduğunu (% 6,7) belirlemişlerdir.

2.6. İKİ BOYUTLU (2-DE) PROTEOMİK YÖNTEMİ

Proteinlerin molekül ağırlıklarına göre ayırımı yapmak üzere geliştirilen ve günümüzde hala kullanılan Laemmli (1970) yönteminin kısa süre sonra, Gronow ve Griffiths (1971) izoelektrik odaklama (isoelectric focusing) yöntemini geliştirmiştir. Bu iki yöntem bir süre proteinlerin ayırımı için 2 farklı yöntem olarak kullanılsa da MacGillivray ve Wood (1974) bu iki yöntemi bir arada kullanarak ilk iki boyutlu poliakrilamid jel elektroforezi (2-DE) uygulamasını başarı ile gerçekleştirmişlerdir. 2-DE hücrelerden, dokulardan ve diğer biyolojik örneklerden elde edilen total protein ekstratlarının fraksiyonlara ayrılmasında önemli bir yöntemdir. 100 – 1000 arasındaki protein örneklerinin ayırımına izin veren bu tekniğin başarı ile uygulanmasından kısa bir süre sonra O'Farrell (1975) proteinlerin yüksek çözünürlüklü iki boyutlu jel elektroforezi tekniği ile ortaya koymuş ve sonrasında 5000 proteini temsil eden spotların kesin olarak elde edilmesiyle daha tercih edilir hale gelmiştir (Rabilloud ve Lelong, 2011; Magdeldin ve diğ., 2014; Rabilloud, 2014).

Düzenlenmesinde farklılık meydana gelmiş proteinlerin tespitinde kütle spektrometrisi ve western blot gibi yöntemler için ilk basamağı oluşturan 2-DE, fizyolojik mekanizmaların aydınlatılmasında ve biyomarkörlerin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. 2-DE iki ayırım basamağından meydana gelir. Birinci ayımda (birinci boyut) protein molekülleri izoelektrik noktalarına (pI) göre ayırım gösterirler. İzoelektrik odaklama (IEF), immobilize gradient elektroforezi (IPEG), non-equilibrium pH gradient elektroforezi (NEPHGE) gibi yöntemlerle pH gradienti altında proteinler ayırım gösterirler. İkinci ayımda (ikinci boyut) proteinler, SDS Laemmli veya Tris - Tricine tamponları kullanılarak molekül ağırlıklarına göre ayrılırlar. Bu yöntem ile sadece molekül ağırlıklarına göre ayırım yapan protein elektroforezi yöntemleri ile saptanamayacak olan benzer fizikokimyasal özelliklere sahip olası proteinler,

yüksek çözünürlüklü olarak ayrılabilir. 2-DE yöntemi ile genomik diziden tanımlanamayacak post ve ko-translasyonel protein modifikasyonlarını tespit etmek, hücre farklılaşmasını, biyomarkörlerin tespitini, patojen belirlemesini, saflık tayinini, protein saflaştırmayı ve ürün karakterizasyonunu yapmak mümkündür (Rabilloud ve Lelong, 2011; Magdeldin ve diğ., 2014; Rabilloud, 2014).

Hayashi ve diğ. (2015) Fukushima bölgesinde yaşanan nükleer kaza sonrasında, Nipponbare çeltik çeşidine ait 14 günlük fidelikleri, 5 $\mu\text{Sv/saat}$ doz hızında gama radyasyonu ölçülen bölgeye 72 saat süre ile ekmişlerdir. Süre sonunda topladıkları bitkilerin yapraklarından protein izolasyonu yaparak, meydana gelen proteomik değişiklikleri 2 boyutlu jel elektroforezi yöntemi ile belirlemişlerdir. 60 proteinin anlatım seviyelerinin pozitif, 31 proteinin ise negatif olarak düzenlendiğini tespit etmişlerdir. Saptanan proteinlerin, metabolik faaliyetler, enerji metabolizması, hücre bölünmesi, transkripsiyon, protein sentezi, sinyal iletimi ve stres yanıtı ile ilgili proteinler olduklarını rapor etmişlerdir.

Kong-Ngern ve diğ. (2005) tuz stresinin, tuzluluğa toleranslı Pokkali ve tuzluluğa hassas Khao Dawk Mali 105 çeltik çeşitlerinin 2 boyutlu proteomik profilleri üzerine etkilerini araştırdıkları çalışmada, 14 günlük çeltik fidelerine 6 dS.m^{-1} elektrik iletkenlik değerinde tuz çözeltisini 3 gün, 12 dS.m^{-1} EC değerindeki tuz çözeltisini 10 gün süre ile uygulamışlardır. 2 boyutlu elektroforez ile karakterize edilen proteinlerin iki tanesinde (22 ve 31 kDa) istatistiksel olarak anlamlı anlatım farklılıkları tespit etmiş ve bu proteinleri tanımlamışlardır. 22 kDa proteinin anlatımının tuz uygulamasından sonra 11 kat azaldığını, 31 kDa proteinin ise, 3 kat arttığını rapor etmişlerdir.

Lee ve diğ. (2011) tuzluluğa hassas Dalseongaengmi-44 ve toleranslı Dongjin çeltik çeşitlerinde tuzluluk tarafından tetiklenen proteinleri tespit etmek için iki boyutlu jel elektroforezi yöntemini kullanmışlardır. Hidrofonik koşullarda yetiştirdikleri 2 haftalık fideliklere 0, 45 ve 90 mM konsantrasyonlarda NaCl'yi 4 gün süre ile uygulamışlardır. 16 farklı proteine ait 23 spotun anlatımının tuz stresi ile arttığını tespit etmişlerdir. Bu proteinler, ATP sintaz (EC 3.6.3.14), F1 beta alt ünitesi (kloroplast), klas III peroksidaz (EC 1.11.1.7), beta-1,3 glukanaz (EC 3.2.1.29) öncüsü, ATP sintaz beta alt ünitesi, Rubisco (EC 4.1.1.39), fruktoz-bifosfat (FBP) aldolaz (EC 4.1.2.13) klas-1, dehydroascorbate reductase (EC 1.8.5.1) (spot 10), aktin bağlayıcı protein (ABP), ribozomal protein L12, şaperon 21 öncülü, Rubisco aktivaz (EC 6.3.4.-) küçük izoform öncülü, proteazom (EC 3.4.99.46) alt ünitesi alfa tip 5, trioz fosfat

izomeraz (EC 5.3.1.1) kloroplast öncülü ve kuraklıkla tetiklenen S-benzeri ribonükleaz olarak bildirilmiştir.

2.6.1. Bitkilerde Tuzluluk Toleransı ile İlgili Proteinler

Bitki türleri arasında ve aynı türün farklı çeşitleri arasında tuzluluk stresi bakımından önemli farklılıklar bulunmaktadır. Stres toleransı bakımından sergilenen bu farklılıklar, genomik, transkriptomik, metabolomik ve proteomik olmak üzere dört temel moleküler mekanizmada oluşan değişikliklerden dolayı meydana gelmektedir. Genomik değişiklikler Myb24, ATPaz AVP1, SOS1, NHX, ABC gibi, tuz stresi toleransı ile ilgili gen kopya sayılarının artırılması veya bu genlerin transkripsiyon faktörleri ile promotör bölgelerinde meydana gelen değişimler sonucu oluşurlar (Dassanayake ve diğ., 2011). Transkriptomik değişiklikler SOS1, SOD, P5CS, GS, INPS, sitokrom P450, heat shock protein, Hsc70-3, antifungal protein PDF1.2 gibi tuza yanıt transkriptlerin sürekli anlatımı ile meydana gelmektedir (Taji ve diğ., 2004; Gong ve diğ., 2005; Kant ve diğ., 2006). Karbonhidrat metabolizmasındaki değişiklikler, organik osmolitlerin (fenolik bileşikler, lignin vb.) biyosentezinde artış, glikoliz, Krebs döngüsü, nişasta katabolizması gibi metabolik süreçlerdeki artış, tuz toleransında metabolomik yaklaşımı oluşturmaktadır. Tüm bu mekanizmaların tetiklediği gen ekspresyonu değişiklikleri, protein anlatımlarını yakından etkileyerek kısa vadeli (osmotik potansiyel, iyon aktivitesi gibi stresin doğrudan etkilerine yanıt olarak) ve uzun vadeli (bitki hücrelerinin ve dokularının strese karşı yapısal adaptasyonu gibi) tuz stresi toleransını yönetirler. Tuz stresinin bitkilerde protein profilleri üzerine etkileri iki boyutlu jel elektroforezi yöntemi ile çeltik (Abbasi ve diğ., 2004; Kim ve diğ., 2005; Yan ve diğ., 2005; Chitteti ve diğ., 2007), *Arabidopsis thaliana* (Ndimba ve diğ., 2005; Jiang ve diğ., 2007), buğday (Caruso ve diğ., 2008; Peng ve diğ. 2009), arpa (Rasoulnia ve diğ., 2011; Fatehi ve diğ., 2012), kanola (Bandeagh ve diğ., 2011), soya fasulyesi (Aghaei ve diğ., 2009a; Sobhanian ve diğ., 2010), mısır (Zörb ve diğ., 2009; Zörb ve diğ., 2010), patates (Aghaei ve diğ., 2008) gibi pek çok bitkide araştırılmıştır.

Tuzluluğa yanıt olarak bitkilerin fizyolojilerinde ortaya çıkan bu değişiklikler, tuzluluğun osmotik ve iyonik etkilerinden dolayı meydana gelmektedir. Osmotik stres bitkilerde aynı zamanda mekanik stres meydana getirerek çeşitli osmoprotektan organik bileşiklerin sentezini de teşvik eder. Tuzluluğun iyonik etkilerine karşı iyon düzenleyici proteinlerin ve hücre içi iyon kompartmantalizasyon mekanizmaları ile ilişkili proteinlerin anlatım seviyelerinde değişiklikler oluşabilmektedir. Tuz stresine yanıt olarak görev yapan veya tuzluluğa tolerans

kazanılmasında fonksiyonel proteinleri, sinyal iletimi, gen ekspresyonu ve protein metabolizması, enerji metabolizması, oksidatif stres, osmolit metabolizması, iyon taşınması, mekanik stres, posttranslasyonel modifikasyon ile ilişkili proteinler başta olmak üzere çeşitli fonksiyonel gruplara ayırmak mümkündür (Tablo 2.2 ve 2.3).

2.7.1.1. Sinyal İletimi

Sinyal iletimi ile ilişkili genomik ve transkriptomik çalışmalar SOS1/SOS2/SOS3 sinyal yolağı üzerinde yoğunlaşmaktadır. Proteomik alanda ise tuz stresi ile aktive olan Ca^{+2} bağlayıcı plazma membranı proteinler (anneksin ve kalmadulin) iki boyutlu elektroforez çalışmalarında öne çıkmaktadır. Ca^{+2} , plazma membranından gelen tuzluluk uyarısını nukleusa ileterek ilgili genlerin anlatımını başlatmaktadır. GTP bağlayıcı proteinler ve küçük G proteinleri tuz stresi altında endositoz ve vesikül hareketlerini düzenlemektedir (Pang ve diğ., 2010; Wang ve diğ., 2008a; Jiang ve diğ., 2007; Ndimba ve diğ., 2005). Ayrıca tuz stresi uygulanmış çeltik bitkilerinin köklerinde lösine zengin tekrarlı reseptör benzeri protein kinazlar (OsRPK1 – leucine-rich repeat receptor-like kinase) tanımlanmıştır. MAPK kinaz kaskadı ile plazma membranında H^{+} -ATPaz aktivitesi düzenlenerek, hücre içi iyon homeostazisi sağlanmaktadır (Cheng ve diğ., 2009).

Tablo 2.2: Glikofit bitkilerde tuz stresine karşı tolerans mekanizmalarında görev alan proteinler (Kosova ve diğ., 2013b).

Glikofitler		
Protein Fonksiyonel Grupları	Anlatımı artan proteinler	Anlatımı azalan proteinler
Sinyal iletimi	Anneksin, calmodulin, OsRPK1, calreticulin, MAPK, büyük GTP bağlayan protein; heterotrimerik G protein β altünitesi, OsRac2, 14-3-3.	Ras GTPase, 14-3-3.
Gen ekspresyonunun düzenlenmesi ve hücre bölünmesi	NAC- α , HB1B, OSAP1 RNA helikaz	NAC- α , polyA-bağlayıcı protein
Protein biyosentezi ve degradasyonu	eIF, eEF, eIF5A3, ribozomal proteinler L12, L31, S29, proteazom 20S, 26S, GS.	eIF-4E2, eEF, L10, L12, S3a, S12, L29, S5, GS.
Protein katlanması	DnaK şaperon, HSP70, küçük HSP [80], RubisCO bağlayan protein β altünitesi (CPN60- β)	HSP90
Fotosentez	23 kDa (PsbP), ferredoksin-NADPH redüktaz, OEE2, RubisCO aktivaz, TPI, GAPDH, glukoz-6-P dehidrogenaz	LHC, PC, OEE1, OEE2, RubisCO LSU ve SSU, RubisCO aktivaz, karbonik anhidraz; GAPDH, SBP, PGK, PRK, TK.
Respirasyon ve sukroz metabolizması	FBP aldolaz, GAPDH, TPI, ENO, Suksinil-CoA ligaz β altünitesi, MDH (NAD), sitokrom c oksidaz altünitesi 6b-1, ATP sintaz CF1 β , δ , ϵ ; ADK, NDPK1, ADH.	ATP sintaz CF1 α , β -3, mtATP β -3.
Redoks metabolizması	GST, APX, Cu/Zn-SOD, Mn-SOD, PRX, Trx h, protein disulfid izomeraz.	APX, MDAR
Metal bağlayan proteinler	Ferritin, IDI2, IDS2, IDS3, magnezyum chelataz [66], metallothionein	
Savunma ile ilgili proteinler	PR5, PR10, β -1,3-glukanaz, siyanogenik β -glucosidaz dhurrinaz, (1-3)- β -glukanaz GV, Jacalin lektin, mannoz-bağlayıcı RICE lektin, lektin-benzeri protein, germin-benzeri protein, SAMS.	Lektin-benzeri protein, 23 kDa jasmonat-teşvikli protein, jasmonat-teşvikli protein, F23N19.10 stres teşvikli protein, SAMS, TSI-1.
Transport	PM H ⁺ - ATPaz, V-ATPaz β altünitesi (VHA-B), PPaz NHX, ABC.	V-ATPaz β altünitesi (VHA-B).
Hücre iskeleti	Profilin, β -tubulin.	Tubulin, actin [83]
Yapısal proteinler	Myosin VIII, remorin [91], OSR40c1, β -D-glucan exohydrolase, GRP [57,60,82]	XET.
Lipid metabolizması	3-ketoaçil-açil taşıyıcı protein sintaz I, fosfolipaz/karboksiesteraz ailesi protein, dihidrolipoamid dehidrogenaz, ENR, UDP-sulfoquinovaz sintaz.	Monogalaktozil diaçilgliserol sintaz.
Fitohormon metabolizması	JA biyosentezi (AOC, LOX).	
Lignin biyosentezi	COMT, CCOMT.	COMT, CCOMT.

Tablo 2.3: Halofit bitkilerde tuz stresine karşı tolerans mekanizmalarında görev alan proteinler (Kosova ve diğ., 2013b).

Halofitler		
Protein Fonksiyonel Grupları	Anlatımı artan proteinler	Anlatımı azalan proteinler
Sinyal iletimi	Anneksin, heterotrimerik G protein β altünitesi, fototropin, alfa-SNAP.	CBL-etkileşimli protein kinaz, 14-3-3.
Gen ekspresyonunun düzenlenmesi ve hücre bölünmesi	CRT/DREB, hücre bölünmesi proteini fts homologu.	SKP1-benzeri protein, MorR homologu, TF APFI.
Protein biyosentezi ve degradasyonu	eIF3A, S7, S24, S15a, alfa tip 6, beta tip 1, GS.	20S, proteazom altünitesi alfa tip 2, 4, 6.
Protein katlanması	Küçük HSP, HSP70, CPN60- α , HSP60.	HSP90.
Fotosentez	LHC, OEE2, RubisCO LSU ve SSU, RubisCO aktivaz, D2 protein PSII, CP24, CP47, PSI altünitesi IV, karbonik anhidraz; SBP, PGK.	LHC, OEE1, RubisCO LSU ve SSU, RubisCO aktivaz, PsbO, SBP.
Respirasyon ve sukroz metabolizması	FBP aldolaz, ATP sintaz, CF1 β , ϵ , ADK, NDPK1, fruktokinaz-benzeri protein, GAPDH, MDH.	ATP sintaz CF1 α , β , MDH, sukroz sintaz.
Redoks metabolizması	GST, APX, Cu/Zn-SOD, 2-Cys PRX, MDAR	APX zincir A, MDAR, GST-I, thioredoksin.
Metal bağlayan proteinler	Ferritin, voltaj-bağımlı anyon kanalı proteini, transferrin-benzeri protein, FutA1, FutA2.	Ferritin.
Savunma ile ilgili proteinler	NBS-LRR hastalık direnç proteini, SAMS, lipokalin-benzeri protein.	Hastalık direnç protein.
Transport	HKT, V-ATPaz β altünitesi (VHA-B), PPaz, NHX, ABC.	V-ATPaz β altünitesi, porin.
Hücre iskeleti	Profilin.	
Yapısal proteinler	PM coat proteinleri, seluloz sintaz.	
Lipid metabolizması	Uzun zincir yağ aside CoA ligaz.	Gliserofosfodiesteraz
Fitohormon metabolizması	ABA biyosentezi (NCED), GA biyosentezi (DWARF3).	
Lignin biyosentezi	COMT, CCOMT.	

2.7.1.2. Gen Ekspresyonu ve Protein Metabolizması

Tuz stresi uygulanan bitkilerle yapılan iki boyutlu proteomik çalışmalarda transkripsiyon ve protein metabolizması ile ilişkili DNA topoizomera ve helikaz gibi enzimlerden sorumlu gen anlatımlarında artışlar belirlenmiştir. Ayrıca domates, çeltik kökleri, arpa yaprakları gibi dokularda NAC transkripsiyon faktörlerinin arttığı bildirilmiştir. NAC- α proteinleri, protein düzenlenmesi ve katlanmamış polipeptitlerin endoplazmik retikulum translokasyonu fonksiyonlarını üstlenmektedir (Fatehi ve diğ., 2012; Chen ve diğ., 2009b; Yan ve diğ., 2005). Tuz stresi uygulanmış durum buğdayı bitkilerinde RNA posttranslasyonel düzenlenmesinde önemli olan nükleik asit bağlayıcı proteinlerin bitkiye, kazanılmış tuz toleransı sağladığı bildirilmiştir (Caruso ve diğ., 2008). Translasyon başlangıcı ve uzama faktörü (EF1- α , eEF2) proteinlerinde meydana gelen artışlar ribozomal proteinlerin anlatımını değiştirmektedir (Kim ve diğ., 2005; Chitteti ve diğ., 2007; Pang ve diğ., 2010). Tuz stresine tolerans kazanılmasında protein biyosentezinin artırılması büyük ölçüde azot asimilasyonunun artırılmasına ve amino asit biyosentezine bağımlıdır. Glutamat amonyak ligaz azot asimilasyonu ve amino asit biyosentezinde görev alan önemli bir proteindir. Bu proteinin ürünü olan glutamik asit önemli bir protein bileşeni olmakla birlikte aynı zamanda organik bir osmolittir. Bu proteinin tuz toleranslı çeltik bitkilerinin köklerinde arttığı bildirilmektedir (Swami ve diğ., 2011).

2.7.1.3. Enerji Metabolizması

Tuz stresinin meydana getirdiği oksidatif stresin stoma kapanmasını artırması ve CO₂ alımını azaltması enerji metabolizmasını olumsuz etkiler. Tuz stresine hassasiyet gösteren glükofit bitkilerde Rubisco büyük alt birimi ve küçük alt birimi, oksijen evolving enhancer protein, karbonil anhidraz proteini ve Rubisco aktivaz proteinlerinin azaldığı bildirilmektedir (Pang ve diğ., 2010; Sobhanian ve diğ., 2010; Chattopadhyay ve diğ., 2011). Buna rağmen durum buğdayı gibi tuza hassasiyet gösteren bazı çeşitlerde ise Rubisco karboksilaz aktivitesini arttırmak için Rubisco aktivaz anlatımının arttığı bildirilmiştir (Caruso ve diğ., 2008). Tuz stresi çalışmalarında oksidatif strese zarar gören fotosistem II fonksiyonlarını yerine getirmek için OEE proteinlerinin anlatımının arttığı tespit edilmiştir. Ayrıca fotosentetik elektron transfer zincirinde Na⁺ iyonlarının meydana getirdiği olumsuz etkilere karşı bitkilerin ferredoksin NADPH redüktaz anlatımlarını arttırdığı rapor edilmektedir (Zörb ve diğ., 2009).

Tuz stresine tolerans enerji metabolizmasının düzenlenmesini gerektirmektedir. Bitkiler ile yapılan çalışmalarda ATP biyosentezinde görev alan ATP sintaz enziminin β alt ünitesinin tuzluluğa toleranslı bitkilerde anlatımının yüksek, hassas çeşitlerde ise düşük olduğu gösterilmiştir (Kim ve diğ., 2005; Geissler ve diğ., 2010; Pang ve diğ., 2010; Li ve diğ., 2011;). Ayrıca glikoliz ve Calvin döngüsü reaksiyonlarından bağımsız olarak karbonhidrat metabolizması ile ilgili proteinlerin nukleus izoformları da tuz stresine karşı düzenleyici görevler üstlenmektedir. Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH), glikoliz ve glukoneogenez yolaklarında görev alan önemli bir enzimdir. Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenazın nukleus izoformu tRNA bağlayıcı protein olarak düzenleyici roller üstlenmektedir. Bu durum bir proteinin farklı hücre altı izoformlarının fizyolojik süreçlerde farklı görevler üstlenebileceğini göstermektedir (Singh ve Green, 1993; Pandey ve diğ., 2008).

Glikofit bitkilerde tuz stresi fotosentezi ve enerji metabolizmasını olumsuz etkilese de, *Suaeda aegyptiaca*, *Physcomitrella patens* ve *Porteresia coarctata* gibi halofit bitkilerde tuz stresi altında fotosentez reaksiyonları daha fazla yapılmaktadır. Fotosentezde fotosistem II'nin reaksiyon merkezinde önemli bir protein olan D2 proteini stres koşulları altında zarar gördüğü ve fotosistem II'de fonksiyon kayıpları meydana geldiği bilinmektedir. Halofit bir bitki olan *Suaeda aegyptiaca* tuz stresi altında glisin betain üretiminde önemli bir enzim olan choline monooksijenaz miktarını arttırarak D2 proteininin stabil kalmasını sağlamaktadır. Böylece stres altında fotosistem II reaksiyon merkezinde fotosentetik elektron akışı sağlanmaktadır (Wang ve diğ., 2008b; Sengupta ve Majumder, 2009; Sobhanian ve diğ., 2010).

Tuz stresi altında glikoliz, trikarboksilik asit döngüsü, fotorespirasyon yolağı, pentoz fosfat yolağı gibi enerji metabolizması ile ilişkili metabolik süreçlerde yer alan proteinlerin önemli olduğu bildirilmiştir. *Arabidopsis thaliana*'da tuz stresi altında bu yollar ile ilişkili karbonik anhidraz, gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz, suksinil-CoA ligaz β alt ünitesi, mitokondriyal malat dehidrogenaz, glikoz-6-fosfat izomeraz ve piruvat dehidrogenaz proteinlerinde artış tespit edilmiştir. Ayrıca tuz stresi uygulanmış çeltik köklerinde sitokrom c oksidaz 6b-1 alt ünitesi artışı bildirilmiştir (Ndimba ve diğ., 2005; Yan ve diğ., 2005; Pang ve diğ., 2010).

2.7.1.4. Oksidatif Stres ve Stres İlişkili Proteinler

Tuz stresine maruz kalan bitkilerde oksidatif zararlanma meydana gelebileceği bilinmektedir. Oksidatif zararlanma SOD, CAT, APX gibi antioksidan enzimlerin, oluşan oksidatif stresi

tolere edemediği durumlarda meydana gelmektedir. Bu enzimlerin dışında 2-Cys peroksiredoksin gibi H_2O_2 detoksifikasyonunda ve fotosentez mekanizmasında enerji dağıtımında görev alan proteinlerin tuz stresi altında etkili olduğu bildirilmektedir (Dooki ve diğ., 2006; Jiang ve diğ., 2007; Sugumito ve Takeda, 2009; Pang ve diğ., 2010; Sobhanian ve diğ., 2010). Ayrıca enzimatik olmayan antioksidan savunmada önemli bir molekül olan α -tokoferol biyosentezinde görev alan tokoferol siklaz proteini stres yanıtında etkilidir (Yu ve diğ., 2011).

Hücre içerisinde serbest metal iyonlarının ROS üretimini kataliz edebileceği bilinmektedir. Bu sebeple IDI2, IDS2 ve IDS3 gibi Fe kelatlayıcı proteinler topraktan alınacak metal iyonlarını azaltarak metal iyonu kökenli ROS oluşumunu engellemektedir. Benzer şekilde Fe-bağlayıcı protein, ferritin gibi proteinler hücre içerisinde serbest halde bulunan metal iyonlarını azaltarak çeltik, *Arabidopsis*, domates gibi bitkilerde metal iyonu kökenli oksidatif stresi azaltmaktadır (Kim ve diğ., 2005; Ndimba ve diğ., 2005; Chen ve diğ., 2009b; Witzel ve diğ., 2009). Tuz stresi farklı fonksiyonlara sahip proteinleri hücre içerisinde farklı görevler üstlenmek üzere bir araya getirebilir. HSP90 ailesi, HSP70 ailesi ve HSC proteinleri gibi ailelere üye şaperonlar tuz stresi uygulanmış çeltik bitkilerinde tespit edilmiştir. STI1 ve TPR gibi tuz stresine yanıt olarak uyarılan proteinler HSP sinyalinin oluşumunda, giberellin sinyalinde, proteinlerin mitokondrial taşınımında görev alacak şaperon motiflerini taşımaktadır. PR10 proteini tuz stresi altında savunma fonksiyonu gösterirken, aynı zamanda jasmonik asit sinyali olarak fonksiyona sahiptir (Hashimoto ve diğ., 2004; Dooki ve diğ., 2006; Chitteti ve diğ., 2007; Wang ve diğ., 2008a; Chen ve diğ., 2009a; Pang ve diğ., 2010; Manaa ve diğ., 2011).

2.7.1.5. Mekanik Stres İlişkili Proteinler

Hücrel dehidrasyon ve osmotik düzenlenmenin yanı sıra tuz stresi altında çevresel osmotik potansiyelin azalması, hücre hacminin azalmasına sebep olarak mekanik stres meydana getirmektedir. Aktin, tubulin, profilin, kinesin gibi hücre iskeleti ve hücre iskeleti bağlantılı proteinlerin anlatımlarında farklılık meydana gelmesi tuz stresi uygulanan bitkilerde rapor edilmektedir. Tuz stresi uygulanan çeltik köklerinde bitki-spesifik miyozin VIII ağır zincirinde yer alan proteinlerin anlatımının arttığı bildirilmiştir (Dooki ve diğ., 2006; Cheng ve diğ., 2009; Pang ve diğ., 2010). Bu proteinler hücre iskeleti ile hücre duvarı arasında bağlantı oluşturarak stres yanıtında görev alırlar. Benzer şekilde bitki-spesifik plazma membranı / lipid bağlantılı filament protein remorin hücre membran iskeletini yeniden organize ederek plazma membran

bütünlüğünün korunmasına yardımcı olur. Ayrıca hücre sinyal komplekslerinin ve iyon kanallarının oluşmasını sağlar. Seluloz sentaz proteininin tuz stresi altında hücre duvarını destekleyerek osmotik strese karşı direnç sağladığı ve dış ortamda konsantrasyonu artan Na^+ ile hücre içi Ca^{+2} yer değişimini engellediği rapor edilmiştir (Sengupta ve diğ., 2009). GRP (glycine-rich protein) proteinlerinin tuz stresi altındaki çeltik bitkilerinde salkımlara mekanik destek sağladığı bildirilmektedir (Dooki ve diğ., 2006). Bu durum tuz stresinin oluşturduğu osmotik etkilere karşı, hücre iskeleti ve hücre duvarı ilişkili proteinlerin sağlamış olduğu mekanik korumayı göstermektedir.

2.7.1.6. İyon Taşınması ile İlişkili Proteinler

Hücre içerisine kontrolsüz olarak alınan iyonlar hücre içi enzimatik sistemleri inhibe edebilmektedir. Bu sebeple artan tuz konsantrasyonlarında hücre içerisine alınacak iyonları kontrol altında tutmak hem glikofitler hemde halofitler açısından tuz toleransı bakımından büyük önem taşımaktadır. Bitkiler bu kontrolü iyonları hücre dışarısına atacak mekanizmalar ile veya hücre içerisinde vakuoller gibi organellere biriktirerek sağlamaktadır.

Na^+ iyonları hücre içerisine seçici olmayan katyon kanalları ile girerler. Bu iyonların hücre dışarısına atılması genellikle iyon bağımlı transmembran iyon kanalları ile gerçekleşir. Bu süreçte membran elektriksel yükünde değişiklik yapmayan Na^+/H^+ antiport proteinler görev almaktadır. *A. thaliana* bitkilerinde tuz stresi altında SOS1 Na^+/H^+ antiport proteini karakterize edilmiştir. Tuza toleranslı şeker pancarı bitkisinin hücre zarlarında anlatımı yüksek H^+ -ATPaz tespit edilmiştir (Shi ve diğ., 2000).

Na^+ iyonlarının hücre içerisinde vakuollere kompartmatalizasyonu NHX ailesine bağlı H^+ -ATPaz (V-ATPaz) ve H^+ -pirofosfataz (H^+ -Ppaz) gibi Na^+/H^+ antiport proteinler ile gerçekleşmektedir. Toleranslı çeşitlerde bu proteinlerin anlatımlarının yüksek olduğu birçok çalışmada rapor edilmektedir (Barkla ve diğ., 2009; Pang ve diğ., 2010).

2.7.1.7. Proteinlerin Posttranslasyonel Modifikasyonlarının Tuz Stresi ile İlişkisi

Bitkilerin tuz stresi altında kontrol bitkilerine göre farklı posttranslasyonel modifikasyonlar gösterdikleri rapor edilmiştir. Proteinleri geri dönüşebilir fosforilasyonu proteinlere sinyal iletimi, şaperon, ve enzimatik aktivite gibi fonksiyonlar sağlayabilmektedir. Tuz stresi uygulanan çeltik bitkilerinde 17 fosfoprotein (dnaK-type şaperon HSP70, GST, küçük GTP-

bağlayıcı protein OsRac2, mannoz-bağlayıcı RICE lektin gibi) anlatımının arttığı ve 11 fosfoprotein (protein kinaz, ATP sentaz β zinciri gibi) anlatımının azaldığı rapor edilmiştir (Chitteti ve diğ., 2007). Tuz stresi altında mısır köklerinde fruktokinaz, UDP-glukozil transferaz BX9, 2-Cys-peroksiredoksin gibi proteinlerin fosforile olduğu, (izositrat dehidrogenaz, CaM, 40S ribozomal proteinler gibi proteinlerin ise defosforile olduğu tespit edilmiştir (Zörb ve diğ., 2010).

Tuzluluk ile ilişkili oksidatif stres ve buna bağlı sinyal iletimi yolları posttranslasyonel modifikasyonlara yol açabilmektedir. Protein karboksilasyonunun H_2O_2 ile ve S-nitrozilasyonunun NO ile tetiklenebileceği rapor edilmiştir. Yapılan bu çalışmada, tuz stresi altında karboksillenen (ADH, chaperonin 60 α alt ünitesi, glikolitik enzimler, HSP70, Rubisco küçük alt ünite, kloroplast ve mitokondriyal ATP sentaz F1, mitokondriyal peptidaz) ve nitrozillenen (aktin, anneksin, ENO, GAPDH, GST, HSP, Rubisco aktivaz, Rubisco küçük alt birim, PGK, TPI, SOD, peroksiredoksin, tubulin, eIF ve eEF) birçok protein tespit edilmiştir (Tanou ve diğ., 2009).

2.7.1.8. Osmolit Metabolizması ile İlişkili Proteinler

Yüksek konsantrasyonlarda çözünmüş iyonların meydana getirdiği düşük osmotik potansiyel başta kökler olmak üzere bitki hücrelerinde osmotik stres sebep olur. Osmotik düzenleme, bitkilerin dehidrasyonunu, turgor kaybını ve plazmolizini engellemede önemli roller üstlenmektedir. Osmotik düzenlenmenin en etkili yolu prolin, glisin GB gibi organik hidrofilik bileşenler olan osmolitlerin hücre içerisinde biriktirilmesidir (Munns, 2002). Tuz stresi altında glutamin sentaz (GS) ve Δ -pirrolin-5-karboksilat sentaz (P5CS) gibi prolin sentezinde görev alan proteinlerin anlatımının arttığı, prolin dehidrogenaz (PDH) proteininin ise anlatımının azaldığı çeşitli çalışmalarda rapor edilmiştir (Taji ve diğ., 2004; Kant ve diğ., 2006; Pang ve diğ. 2010). GB biyosentezi yolağında görev alan SAM sentaz (SAMS), choline monooksigenaz (CMO) ve betain aldehid dehidrogenaz (ALDH) gibi proteinlerin tuz stresi altındaki halofit *Suaeda aegyptiaca* bitkisinde anlatımının arttığı bildirilmiştir (Askari ve diğ. 2006). Benzer şekilde çeltik bitkisine tuz stresi uygulandığında L-myo-inositol-1-fosfat sentaz (INPS) anlatımının arttığı bildirilmiştir (Sengupta ve diğ., 2009). Ayrıca tuz toleranslı *Indica* çeşidi çeltik bitkileri olan Pokkali ve Nona Bokra ile yapılan çalışmalar, tuz stresi altında sadece düşük molekül ağırlıklı osmolitlerin birikmediğini, bunların yanında tuz ile LEA ailesi gibi tuz ile

tetiklenen osmotik strese karşı koruyucu hidrofilik proteinlerin anlatımlarının da arttığı rapor edilmiştir (Godoy ve diğ., 1994; Moons ve diğ., 1995).

Bu tez çalışması kapsamında, ülkemizde radyasyon ile tuza toleranslı çeltik mutantların elde edilmesi planlanmıştır. Tuza toleranslı olarak seçilen çeltik mutantlarında yüksek tuz seviyelerinde, genomik ve proteomik düzeyde farklılıklar incelenecektir. Elde edilen sonuçlara göre mutantların karakterizasyonu yapılacaktır.



3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. BİTKİ MATERYALİNİN SEÇİLMESİ

Bu tez çalışmasında kullanılan Osmancık-97 ve Mevlütbey çeltik çeşitlerine ait tohumlar, Karadeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'nden temin edilmiştir. Bu çeşitlerin tarımsal özellikleri (ortalama bitki boyu, olgunlaşma gün sayısı, yatmaya karşı mukavemet, 1000 dane ağırlığı, dane özellikleri, randıman, hastalık direnci, birim alandaki verim) Tablo 3.1'de verilmiştir. Türkiye'de ekimi yaygın olan Osmancık-97, yüksek verimlilik özelliklerine sahip, küçük daneli ve uzun bir çeltik çeşididir. Uzun daneli ve kısa bir çeşit olan Mevlütbey ise, Karadeniz bölgesinde tescil edilmiş olup, bölgede ekimi yeni yeni yaygınlaşmaktadır.

Seçilen çeltik çeşitlerinin verimi, Osmancık-97 için 700 – 750 kg/da ve Mevlütbey için 800 – 1000 kg/da olarak bulunmuştur. Ayrıca Osmancık-97 çeşidi 34 – 35 gram ve Mevlütbey çeşidi 32 gramlık 1000 dane ağırlıklarına sahiptir. Osmancık-97 ve Mevlütbey için olgunlaşma gün sayıları sırasıyla 130 – 135 gün ve 135 gündür (Ünan, 2016).

3.2. ÇELTİK ÇEŞİTLERİNİN RADYASYON HASSASİYETİNİN TESPİTİ

Çeltik çeşitlerinin radyasyon hassasiyetinin belirlenmesi için tohumların nem oranları tespit edilmiştir. Osmancık-97 çeşidine ait tohumların nem oranı % 12,68 ve Mevlütbey çeşidi için de % 12,16 olarak belirlenmiştir. Bu iki yerli çeltik çeşidinin radyasyona hassasiyetlerini belirleme amacı ile her iki çeşide ait 50'şer tohum İstanbul Üniversitesi Çapa Tıp Fakültesi Kan Işınlama Merkezi'nde 0, 100, 200, 300, 400, 500, 600 ve 700 Gy gama radyasyonuna (Cs-137) 4,9824 Gy/dk doz hızı ile maruz bırakılmıştır (Alikamanoğlu, 1999; Yayıncılı, 2009; Çelik, 2010).

Işınlamadan hemen sonra tohumlar, içerisinde dolgu maddesi olarak perlit (Perlite-P12) bulunan plastik ekim kaplarına (7 cm çap – 8 cm yükseklik) ekilmiştir. Her muamale için 10 plastik kap kullanılmıştır. Her çeşide ait plastik kaplar 40 x 25 cm ebatlarındaki plastik tepsilere yerleştirilmiştir. Çeltik bitkileri Tablo 3.2'de besin solüsyonu içeriği verilen Yoshida (1971) solüsyonu ile sulanmıştır. Bitkiler 14 gün boyunca 16 saat gündüz, 8 saat gece olacak şekilde T.C. İstanbul Kültür Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'ne ait iklim odasında optimum koşullarda yetiştirilmiştir (Çelik ve diğ., 2019). 14. günde hasat edilen bitkilerin ortalama bitki boyları saptanmıştır.

Tablo 3.1: Karadeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nden elde edilen çeltik çeşitleri ve tarımsal özellikleri.

Çeşit/Özellikler	Ort. Bitki Boy (cm)	Olgunluk Süresi (gün)	Yatmaya Mukavemet	1000 Dane Ağırlığı (g)	Dane Özellikleri	Randıman	Hastalık Direnci	Birim Alandaki Verim (kg/da)
Osmancık-97	95-100	130-135	-	33-34	Küçük daneli, uzun çeşit	Kırıksız %65	Salkım yanıklığı	800-1000
Mevlütbey	100	132-135	Mukaemetli	30-33	Uzun daneli, kısa çeşit	Kırıksız % 50-55	Bilinmiyor	800-900

Tablo 3.2: Yoshida besin solüsyonu içeriği (Yoshida ve diğ., 1971).

Element	Kimyasal	Stok Konsantrasyonu (g/L)	Besin Solüsyonundaki Son Konsantrasyon (ppm)
Azot (N)	NH ₄ NO ₃	914	40
Fosfor (P)	NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	403	10
Potasyum (K)	K ₂ SO ₄	714	40
Kalsiyum (Ca)	CaCl ₂	886	40
Magnezyum (Mg)	MgSO ₄ .7H ₂ O	3240	40
Mangan (Mn)*	MnCl ₂ .4H ₂ O	15	0,5
Molibden (Mo)*	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	0,74	0,05
Bor (B)*	H ₃ BO ₃	9,34	0,2
Çinko (Zn)*	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,35	0,01
Bakır (Cu)*	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,31	0,01
Demir (Fe)*	FeCl ₃ .6H ₂ O	77	2
Sitrik asit*	C ₆ H ₈ O ₇ .H ₂ O	119	84

* Ayrı ayrı çözündürülüp 500 mL sülfürik asit ilave edilmiş ve distile su ile 10 L'ye tamamlanmıştır.

3.3. ÇELTİK ÇEŞİTLERİNİN TUZ (NaCl) HASSASİYETİNİN BELİRLENMESİ

Tez çalışmasında seleksiyon amacı ile kullanılacak tuz (NaCl) konsantrasyonunu tespit etmek amacı ile her iki çeltik çeşidinin tuzluluğa verdikleri cevaplar tespit edilmiştir. Çeşitlere uygulanacak her bir tuz konsantrasyonu için 50'şer tohum dolgu maddesi olarak perlit içeren plastik bitki büyütme kaplarında besin solüsyonu olarak Yoshida solüsyonu kullanılarak iklimlendirme odasında 25 °C sıcaklık 16 saat gündüz / 8 saat gece periyodunda 14 gün süre ile çimlendirilmiştir. 14. günün sonunda bitkiler, Yoshida solüsyonuna 0, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 ve 240 mM NaCl ilave edilmesi ile 7 gün boyunca tuzluluğa maruz bırakılmıştır. Tuzluluğun Osmancık-97 ve Mevlütbey çeltik çeşitleri üzerine etkisi ortalama bitki boyu ve ortalama bitki taze ağırlıkları üzerinden değerlendirilmiştir.

3.4. M₁ GENERASYONUNA AİT MUTANTLARIN ELDESİ

Radyasyon hassasiyetleri saptanan Osmancık-97 ve Mevlütbey çeşitlerine ait tohumlar (her çeşit için 10000 tohum) 0, 250, 300 ve 400 Gy dozlarında (4,2896 Gy/dk doz hızı ile), her dozda 2500 tohum olacak şekilde İstanbul Üniversitesi Çapa Tıp Fakültesi Kan Işınlama Merkezi'nde ışınlanmıştır. Işınlanan tohumlar Karadeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'ne ait Samsun'da bulunan deneme tarlalarına ekilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1: Karadeniz Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü tarlalarında kurulan deneme parsellerinin görünümü.

3.4.1. Tarla Denemesi Koşulları

Tarla denemeleri ana parsellerde normal ekim tarihlerinde yapılmıştır. Ana parseller 3 x 3 metre boyutlarında kenar tesirleri atıldıktan sonra 2,5 x 2,5 metre alanda yapılmıştır.

Deneme alanı kulaklı pulluk, tek yönlü (one-way), tırmık ve lazerli tesviye makineleri kullanılarak hazırlanmıştır. Tohumlar ön çimlendirme yapıldıktan sonra sulu alana direkt ekim yöntemine göre ekilmiştir.

Toprak analiz sonuçlarına göre % 46 azot içeren üre ve 20.20.0 kompoze gübre taban gübresi olarak verilmiştir. Azotlu gübre olarak % 20,5 azot içeren amonyum sülfat tercih edilmiştir.

Azotlu gübre, ekim öncesi, kardeşlenme ve salkım oluşum dönemleri başlangıcı olmak üzere üç eşit kısma ayrılarak 12 kg/da saf azot olacak şekilde verilmiştir.

Çeltiğin 3 – 4 yapraklı evresinde etken maddesi Penoxulam olan yabancı ot ilacı 3 g/da konsantrasyonda uygulanmıştır. Ayrıca aynı dönemde 20 g/da konsantrasyonda Propinate etkili yabancı ot ilacı uygulanmıştır (Ünan, 2016).

Tam olgunlaşma döneminde çeltik tanelerinin nem oranı % 22 – 24 arasındayken hasat yapılmıştır. Nem ölçümleri dijital nem ölçme aleti kullanılarak ölçülmüştür. Hasattan 20- 25 gün önce parsellere su verilmesi durudurularak kuruması sağlanmıştır. Hasat öncesi deney gruplarına ait rastgele 10’ar bitki sökülerek gözlemler için ayrılmıştır.

3.4.2. Tarla Denemesi Gözlemleri

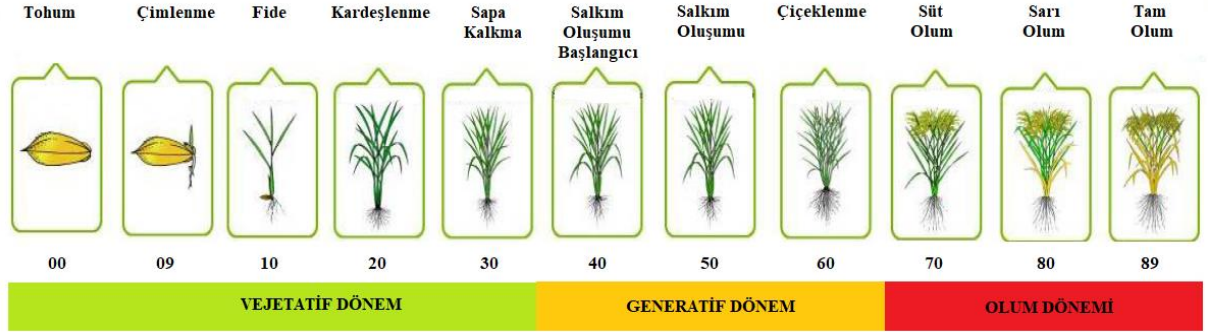
Radyasyonun M₁ generasyonu üzerinde meydana getirdiği değişikliklere ait çimlenme yüzdesi, yaşayan fide sayısı, ortalama bitki boyu, salkım sayısı, salkım uzunluğu, salkım dane sayısı, sterilite, fertilitite, sürgün sayısı, kardeşlenme sayısı, çiçeklenme gün sayısı, 1000 dane ağırlığı, yatma oranı değerleri saptanmıştır. Gözlemler ve ölçümler, Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü’nün “Tarımsal Değerleri Ölçme Denemeleri Teknik Talimatı (2010)” ve Uluslararası Çeltik Araştırma Enstitüsü’nün (International Rice Research Institute – IRRI) “Standart Değerlendirme Sistemi (2014)” göz önünde bulundurularak yapılmıştır. Gözlemlerin alınacağı farklı gelişim dönemleri Zadoks skalasına göre belirlenmiştir (Şekil 3.2).

3.4.2.1. Tane Verimi

Tane verimi Zadoks skalasına göre 89 numara ile ifade edilen tam olgunlaşma döneminde yapılan hasad işlemi sonrasında gerçekleştirilmiştir. Hasat sırasında nem oranı % 22 – 24 arasında olan tohum nem oranları tane verimi hesaplanmadan önce % 14’e düşürülmüştür. Tane verimi kg/da cinsinden hesaplanmıştır.

3.4.2.2. Ortalama Bitki Boyu

Ortalama bitki boyları olgunlaşma döneminde tesadüfen seçilen 30 bitkide toprak seviyesi ile salkımın en uç başağı (kılçık göz ardı edilerek) arasındaki mesafeler ölçülerek hesaplanmıştır.



Şekil 3.2: Çeltik bitkisinin Zadoks ve diğ., (1974) skalasına göre belirlenen farklı gelişim dönemlerini ifade eden gün sayıları (Ünan, 2016).

3.4.2.3. Salkım Sayısı

Ortalama salkım sayısı olgunlaşma döneminde rastgele seçilen 0,25 m²'lik alanlarda 4 tekrarlı olarak fertil salkımların sayılması ile hesaplanmıştır.

3.4.2.4. Salkım Uzunluğu

Ortalama salkım uzunluğu olgunlaşma döneminde rastgele seçilen 30 bitkide bitki ana sapının salkımları, salkım tabanından salkım ucuna kadar ölçülerek hesaplanmıştır.

3.4.2.5. Salkım Dane Sayısı

Ortalama salkım dane sayıları olgunlaşma döneminde her parselden rastgele seçilen 30 bitkiden alınan birer salkımdaki dolu tanelerin sayılması ile hesaplanmıştır.

3.4.2.6. Sterilite Yüzdesi

Ortalama salkım dane sayıları olgunlaşma döneminde her parselden rastgele seçilen 30 bitkinin salkımlarında yer alan boş başakçıkların sayısının toplam başakçık sayısına bölünmesi ile hesaplanmıştır.

3.4.2.7. Sürgün Sayısı

Ortalama sürgün sayısı olgunlaşma döneminde rastgele seçilen 0,25 m²'lik alanlarda 4 tekrarlı olarak sürgünlerin sayılması ile hesaplanmıştır.

3.4.2.8. Kardeşlenme Sayısı

Kardeşlenme sayısı sapa kalkma döneminde rastgele seçilen 30 bitkide kardeş sayılarının ortalamalarının alınması ile hesaplanmıştır.

3.4.2.9. Çiçeklenme Gün Sayısı

Çiçeklenme gün sayısı parsellerdeki bitkilerin % 50'sinin ekiminden, çiçeklenme dönemine kadar geçen gün sayıları belirlenerek hesaplanmıştır.

3.4.2.10. Bin Dane Ağırlığı

Hasad sonrası her parselden alınan harmanlanmış çeltiklerden 3 tekrarlı olarak sayılan 100'er adet tohum ortalamalarının hesaplanması ile belirlenmiştir.

3.4.2.11. Yatma Oranı

Tam olum döneminde yatma gösteren bitkilerin yattığı alan yüzde olarak hesaplanmış ve 1 – 9 skalasına göre değerlendirilmiştir. Skala Tohumluk Tescil ve Sertifikasyon Müdürlüğü'nün “Çeltik Tarımsal Değerleri Ölçme Denemeleri Teknik Talimatı” tarafından; (1) yatma yok, (3) % 0 – 10 yatma, (5) % 11 – 25 yatma, (7) % 26 – 50 yatma ve (9) % 50'den fazla yatma olarak belirlenmiştir.

3.5. M₂ GENERASYONUNDA İN VİVO TUZ (NaCl) SELEKSİYONLARI

Karadeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü tarlalarında kurulan gama radyasyonunun M₁ generasyonu üzerindeki etkilerini tespit etmeye yönelik çeltik ekimlerinden elde edilen ve bulk olarak hasadı gerçekleştirilen tohumlar T.C. Kültür Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü soğuk hava deposunda muhafaza edilmiştir. Hasat edilen mutant tohumlar arasından 150 mM tuz (NaCl) konsantrasyonuna toleranslı bireyleri tespit etme amacı ile bitki büyütme odasında optimum koşullar altında bir seleksiyon denemesi kurulmuştur. Seleksiyonlar içlerinde perlit bulunan plastik bitki büyütme kaplarında yetiştirilen M₂ çeltik bitkilerinde yapılmıştır. Osmancık-97 ve Mevlütbey çeşitlerine ait tohumlardan 250, 300 ve 400 Gy deney gruplarına ait 3400'er tohum ekilmiştir. Tohumların besin ihtiyacı Yoshida besin solüsyonu kullanılarak karşılanmıştır. 2 hafta süresince Yoshida solüsyonu ile çimlendirilen tohumlara 2. haftanın sonunda 150 mM NaCl içeren Yoshida solüsyonu verilmeye başlanmıştır. 10 günün

sonunda Tablo 3.3'te yer alan skorlara göre 150 mM tuz stresinden kontrole göre daha az etkilenen bitkiler seçilmiştir. Seçilen bitkiler tohum elde etmek için bitki büyüme odasında, içerisinde Tablo 3.4'te özellikleri verilmiş olan özel karışımli Seltop marka toprak bulunan 12 cm çapında 9,5 cm yüksekliğinde saksılarda yetiştirilmiştir. 2015 yılında toprağa aktarılan fideler bitki büyüme odasında yetiştirilmeye devam etmiştir.

2016 yılında tekrar elde edilen çeltik çeşitlerine ait M₂ generasyonunda ikinci bir tuzluluğa toleranslı bitkilerin seleksiyonu yapılmıştır. Seçilen bitkiler tohum elde etmek için içerisinde Seltop marka toprak bulunan saksılarda yetiştirilmiştir.

Tablo 3.3: Sürgün gelişimi sırasında tuzluluğun çeltik bitkisi üzerinde meydana getirdiği zararlanmaların standart değerlendirme skor tablosu (Gregorio, 1997).

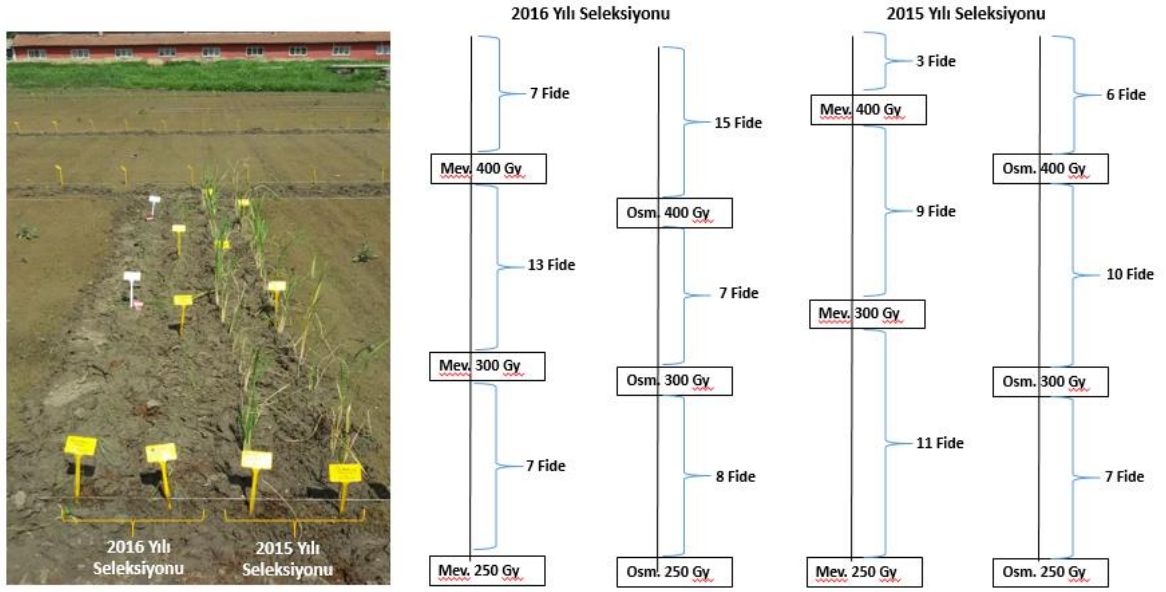
Skor	Gözlem / Yanıt	Kategori
1	Normal gelişim görülür, hiç yaprak semptomu gözlemlenmez.	Aşırı Toleranslı
3	Hemen hemen normal gelişim görülür, fakat birkaç yaprağın uçlarında sararma ve kıvrılma gözlemlenir.	Toleranslı
5	Gelişim belirgin biçimde geriler, birçok yaprak kıvrılma gösterir; çok az sayıdaki yaprak uzamaya devam eder.	Orta Dereceli Toleranslı
7	Gelişim tamamen durur; yaprakların çoğu ölür; bazı bitkiler ölmeye başlar.	Hassas
9	Hemen hemen tüm bitkiler ölür veya ölmektedir.	Aşırı Hassas

Tablo 3.4: Seltop marka özel karışımli toprak içeriği ve özellikleri.

Özellik	Değer
pH	5,5 – 6,7
Elektriksel İletkenlik (EC)	Maksimum 0,5 – 1 $\mu\text{S.cm}^{-1}$
Toplam Organik Madde (kütlece)	% 90 - 95
Organik Karbon (kütlece)	% 50 - 55
Selüloz (kütlece)	% 20 - 30
Su tutma kapasitesi (kuru ağırlığa göre)	9 – 10 kat
Hava dolu gözenek (hacimce)	% 11 - 13
Azot kaynağı (NO_3)	100 – 150 mg/L
Fosfor (P)	10 – 20 mg/L
Potasyum (K)	100 – 150 mg/L
Kalsiyum (Ca)	40 – 60 mg/L
Magnezyum (Mg)	10 – 20 mg/L
Sülfat (SO_4)	50 – 75 mg/L

3.5.1. Seleksiyonu Yapılan Mutantların Tarlaya Ekimi

Bitki büyüme odasında 2015 ve 2016 yıllarında yapılan seleksiyonlarda 150 mM tuz (NaCl) stresine toleranslı olarak belirlenen mutant fidelerden tohum almak için bitkiler 2016 yılında Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü (Edirne) araştırma tarlasına ekilmiştir. Mutant çeltik fideleri Edirne'deki araştırma tarlasına Şekil 3.3'te gösterilen düzende ekilmiştir. Mutant fideler sıra üzeri ve sıra arası 15 cm olan deneme parsellerine şaşırtılmıştır (Şavşatlı ve diğ., 2006). Kurulan tarla denemesinde sera koşullarında elde edilen Osmancık-97 çeşidine ait 53, Mevlütbey çeşidine ait 60 fide olmak üzere toplam 103 fide dikilmiştir ve tohum elde edilmiştir. M_3 döllerinde biyokimyasal, proteomik ve genomik analizler yapılmıştır.



Şekil 3.3: Osmancık-97 ve Mevlütbey çeşitlerine ait 150 mM NaCl stresine toleranslı mutant fidelerin tarla ekim planı ve tarla görünümü.

3.6. ÇELTİK ÇEŞİTLERİNİN *in vitro* KALLUS KÜLTÜRLERİNİN KURULMASI

Osmancık-97 ve Mevlütbey çeltik çeşitlerinin kallus kültürlerinin kurulması için ele alınan çeşitlere uygun olan yüzey sterilizasyonu ve besi yerini tespit etmek için ön denemeler kurulmuştur. *In vitro* doku kültürü çalışmaları T.C. İstanbul Kültür Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Bitki Doku Kültürü Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

3.6.1. Yüzey Sterilizasyon Metodunun Belirlenmesi

Uygun yüzey sterilizasyonu metodunu belirlemek için 4 farklı yüzey sterilizasyonu (S1, S2, S3, S4) uygulanmıştır (Tablo 3.5). Yüzey sterilizasyonu için her iki çeşitten her bir uygulama için 40'ar tohum ayrılmıştır. Tohumlar Tablo 3.5'te gösterilen konsantrasyon ve sürelerde ticari çamaşır suyunda bekletildikten sonra 3'er kere steril distile su serilerinden geçirilmiştir. Steril filtre kağıtlarında kurutulan tohumlar % 0,8 agar içeren petrilere petri başına 10 tohum düşecek şekilde dört tekrarlı olarak ekilmişlerdir. Petriler 16 saat gündüz 8 saat karanlık periyodunda 25 °C sıcaklıkta 2 hafta boyunca çimlendirilmiştir. 2 hafta sonunda kontaminasyon durumları gözlemlenmiştir.

Tablo 3.5: Osmancık-97 ve Mevlütbey çeltik çeşitlerinin yüzey sterilizasyonu denemesinde uygulanan NaOCl konsantrasyonları ve süreleri.

Sterilizasyon Kodu	Ticari Çamaşır Suyu % (NaOCl $\leq$ % 5)	Uygulanma Süresi (dk)	Ekilen Tohum (Adet)
S1	50	20	40
S2	50	30	40
S3	30	35	40
S4	40	30	40

3.6.2. Kallus Oluşumu İçin Uygun Besi Yeri ve Eksplant Seçimi

Kallus eldesi için iki metod denenmiştir:

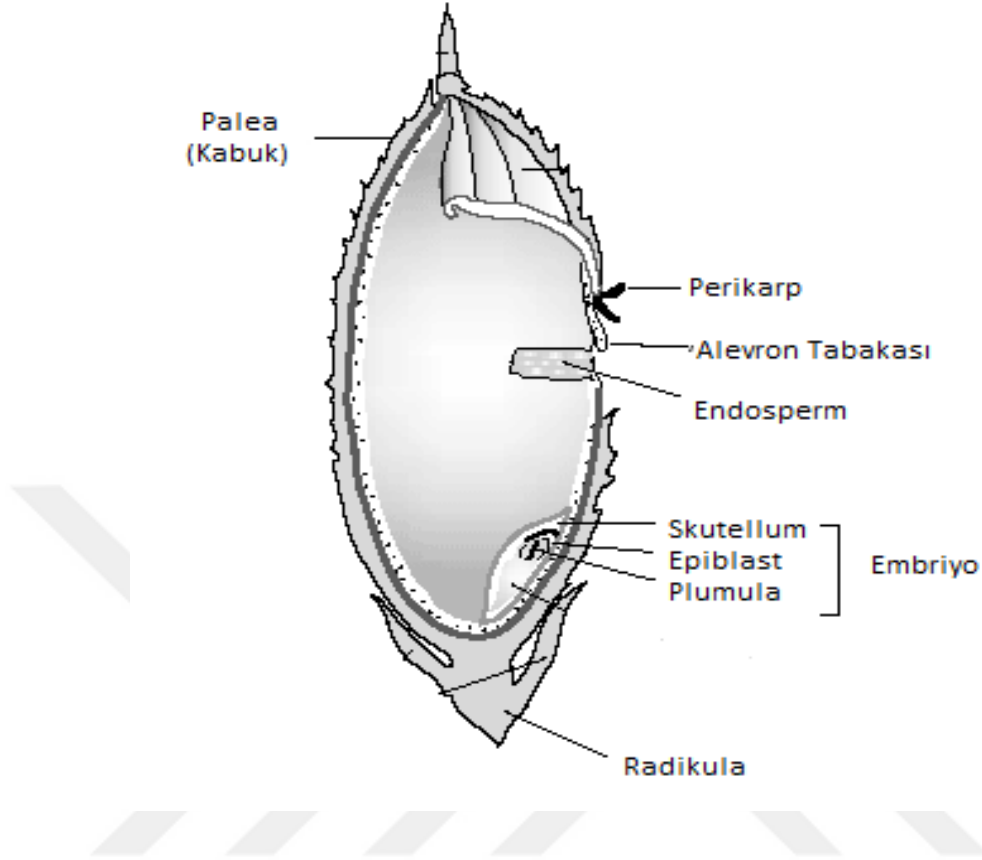
1. Çeltik embriyolarından doğrudan kallus eldesi.
2. Çimlenmiş çeltik fidecik kısımlarından kallus eldesi.

3.6.2.1. Çeltik Embriyolarından Doğrudan Kallus Eldesi

Her iki çeşide ait tohumlardan in vitro kallus kültürlerinin kurulmasında kullanılmak üzere her bir besi yeri için 50'şer tohum seçilmiştir. Seçilen tohumlar denemede en iyi sonuç veren S4 yüzey sterilizasyonu metodu ile steril edilmiştir. Bu tohumlar Tablo 3.6'da verilen 4 farklı besi yerlerine bir petriye 10 tohum düşecek şekilde beş tekrarlı ekilmiştir. Petriler kallus oluşturmak üzere karanlık ortamda bitki büyütme kabinine (25 °C) konulmuştur. Kültürlerin birinci haftasının sonunda petriler açılarak tohumların embriyo kısmında (Şekil 3.4) oluşmaya başlayan kalluslar steril pens ve bistüri kullanılarak endospermden ayrılmış ve aynı içerikteki besi yerlerine tekrar ekilmiştir. Ekimi tamamlanan petriler karanlık ortamda 25 °C'de 2 hafta kallus gelişimlerinin devamı için bekletilmiştir. Toplam 3 hafta sonunda petrilerdeki kallus oluşum yüzdeleri ve kallus yaş ağırlıkları tespit edilmiştir (Wani ve diğ. 2011).

Tablo 3.6: Osmancık-97 ve Mevlütbey çeltik çeşitlerine ait embriyolardan kallus kültürlerinin oluşturulması için kullanılan besi yeri içerikleri.

Besiyeri Kodu	2,4-D (mg/L)	Kinetin (mg/L)	Prolin (mg/L)	MS Makro-Mikro Tuzları (g/L)	Sukroz (g/L)	Agar (g/L)	pH
B1	2	0	560	4,302	30	8	5,8
B2	2	0,5	560	4,302	30	8	5,8
B3	3	0	560	4,302	30	8	5,8
B4	3	0,5	560	4,302	30	8	5,8

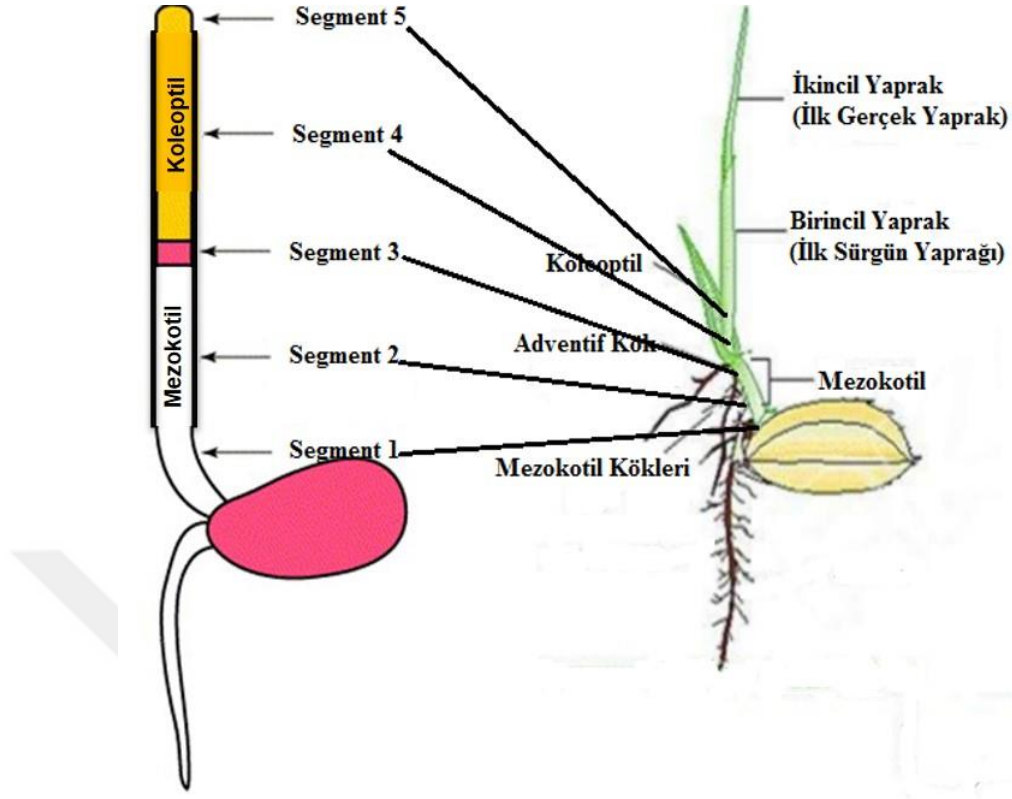


Şekil 3.4: Çeltik tohumunun morfolojik yapısı ve kısımları (Matsuo ve Hishikawa, 1993).

3.6.2.2. Çimlenmiş çeltik fidecik kısımlarından kallus eldesi

Kallus elde etmek için çimlenen çeltik tohumlarının mezokotil ve koleoptil segmentlerinden (Şekil 3.5) alınan eksplantlar kullanılmıştır. Bu eksplantlar MS organik ve inorganik tuzları, farklı 2,4-D ve kinetin konsantrasyonları ile hazırlanan besi yerlerine ekilmiştir. En uygun besi yeri içeriğini belirlemek amacıyla kurulan kallus denemesinde MS inorganikleri ve organikleri, 5 farklı 2,4-D ve 3 farklı kinetin konsantrasyonu ile desteklenmiştir (Tablo 3.7).

Yüzey sterilizasyonları S4 yöntemine göre (1 dakika % 70'lik alkol ve 30 dakika % 40 NaOCl) yapılarak bir hafta boyunca çimlendirilen her iki çeltik çeşidine ait tohumlardan 7 günlük fidecikler elde edilmiştir. Bu fideciklerin koleoptilleri çıkarıldıktan sonra mezokotil ve yaprakların alt kısımlarını kapsayan bölgeleri aseptik koşullarda 1 mm uzunluğunda kesilerek her bitkiden 5 eksplant (segment 1-5) hazırlanmıştır. Eksplantlar besi yerlerine ekilerek ekimi tamamlanan petriler karanlıkta 25 °C'de tutulmuş ve 3 hafta süresince kallus gelişimleri takip edilmiştir.



Şekil 3.5: Çimlenmiş çeltik fidelerinden kallus kültürlerinin kurulmasında kullanılan eksplant segmentleri.

Tablo 3.7: Çimlenmiş çeltik fidelerinden elde edilen eksplantlarla kurulan kallus denemesinde kullanılan besi yeri içerikleri.

Besi Yeri Kodu	Bazal Tuz	2,4-D mg/L	Kinetin mg/L	Prolin (mg/L)	Sukroz (%)
MS1	MS	1	0	560	30
MS2	MS	2	0	560	30
MS3	MS	3	0	560	30
MS4	MS	4	0	560	30
MS5	MS	5	0	560	30
MS6	MS	1	0,5	560	30
MS7	MS	2	0,5	560	30
MS8	MS	3	0,5	560	30
MS9	MS	4	0,5	560	30
MS10	MS	5	0,5	560	30
MS11	MS	1	1	560	30
MS12	MS	2	1	560	30
MS13	MS	3	1	560	30
MS14	MS	4	1	560	30
MS15	MS	5	1	560	30

3.7. M₃ GENERASYONUNDA *in vitro* TUZ (NaCl) SELEKSİYONLARI

M₂ generasyonunda *in vivo* ortamda 150 mM NaCl toleransı gösterdiği tespit edilmiş olan döllere elde edilen M₃ generasyonundaki fidelerde tuzluluk toleransının kontrolü için *in vitro* koşullarda kallus kültürleri kurulmuştur.

Kültürlerin kurulmasında, ön çalışmalar yapılarak belirlenmiş olan sterilizasyon yöntemleri, besi yeri içerikleri ve eksplantlar kullanılmıştır. Tuz toleransının *in vitro* koşullarda saptanabilmesi için mutant bitkilere ait 30'ar tohum ekilmiştir. Bu tohumların yüzey sterilizasyonu Tablo 3.5'te yer alan S4 yöntemine göre yapılmıştır.

In vivo koşullarda 150 mM NaCl toleranslı olduğu tespit edilmiş 43 mutant bitkiye ait tohumlar tuz içermeyen (kontrol) ve 150 mM NaCl içeren besi yerlerine ekilerek tuzluluk toleransının devamlılığı araştırılmıştır. Kontrol gruplarına ait steril tohumlar 2,5 mg/L 2,4-D, 560 mg/L prolin, 0,5 mg/L kinetin içeren MS besi yerlerine petri başına 10 tohum gelecek şekilde üç tekrarlı olarak ekilmiştir. *In vitro* tuzluluk toleranslarını belirleyebilmek üzere için belirtilen besi yerine 150 mM NaCl ilave edilmiştir. Ekimlerin yedinci gününde tohumların embriyo bölgesinde oluşmaya başlayan kalluslar aseptik koşullarda tohumdan kesilerek alınmış ve aynı içerikli besi yerlerine ekilmiştir. Dört haftalık olan kallusların gelişimleri, yaş ağırlıkları tartılarak belirlenmiştir. Her mutant bitkiye ait kallus yaş ağırlığı, NaCl içermeyen kontrol petrielerindeki kallus yaş ağırlıkları % 100 kabul edilerek değerlendirilmiştir.

3.8. BİYOKİMYASAL ANALİZLER

Osmancık-97 ve Mevlütbey çeltik çeşitlerine ait ve tuza toleranslı mutant bitkiler üzerinde tuz stresinin etkileri lipid peroksidasyon, prolin, total protein ve fotosentetik pigment konsantrasyonlarının belirlenmesi, peroksidaz, superoksit dismutaz ve katalaz enzim aktivitelerinin tayini ile gösterilmiştir.

3.8.1. Lipid Peroksidasyon Tayini

Bitkilere uygulanan tuz stresinin sonucu olarak meydana gelen oksidatif stresin oluşturduğu lipid peroksidasyon ürünü olan malondialdehit (MDA) miktarları Stewart ve Bewley (1980) metoduna göre kolorimetrik olarak saptanmıştır. Örneklerden alınan 0,1 g yaprak 1 mL distile su eklenerek havan yardımı ile homojenize edilmiştir. İçerisinde % 0,5 (v/w) tiobarbitürik asit

bulunan % 20'lik trikloroasetik asit çözeltisinden eşit hacimde eklenen örnekler 95 °C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. Sürenin sonunda örnekler buz banyosuna yerleştirilerek meydana gelen kolorimetrik reaksiyonlar sonlandırılmıştır. +4 °C'de 10000 g hızda 30 dakika santrifüj edilen örneklerin süpernatant kısımları alınarak yeni mikrofüj tüplerine toplanmıştır. Elde edilen süpernatantların absorbans değerleri 532 ve 600 nm dalga boylarında kaydedilerek hesaplama sonuçları $\mu\text{mol MDA/g.TA}$ cinsinden sunulmuştur.

3.8.2. Prolin Konsantrasyonlarının Tayini

Tuz stresinin Osmancık-97 ve Mevlütbey çeltik çeşitleri ile mutant bitkiler üzerinde meydana getirdiği oksidatif strese karşı, koruyucu osmoprotektan rolü olan prolinin birikim seviyeleri Bates ve diğ. (1973) metoduna göre tespit edilmiştir. 0,1 g yaprak dokusu havan kullanılarak % 3'lük (w/v) sülfosalisilik asit ile homojenize edilmiştir. 10000 g hızda 15 dakika santrifüj edilen örneklerin süpernatant kısımları alınarak eşit hacimde asetik asit ve ninhidrin reaktanı ile reaksiyona sokulmuştur. Reaksiyonun gerçekleşmesi için örneklerin bulunduğu mikrofüj tüpleri 100 °C'de 1 saat inkübe edilmiştir. Sürenin sonunda reaksiyonlar, mikrofüj tüplerinin buz içerisine yerleştirilmesi ile aynı anda sonlandırılmıştır. Reaksiyon karışımındaki prolin moleküllerini elde etmek için reaksiyon karışımı toluen ile ekstrakte edilmiştir. Konsantrasyon ölçümleri spektrofotometrik olarak 520 nm dalgaboyunda yapılarak, hesaplamalar prolin standardı ile hazırlanmış standart kalibrasyon eğrisine göre $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ proline $\text{g}^{-1}.\text{TA}$ cinsinden verilmiştir.

3.8.3. Fotosentetik Pigment Miktarı Tayini

Tuz stresinin Osmancık-97 ve Mevlütbey çeltik çeşitleri ile mutant bitkilerin fotosentetik pigment konsantrasyonları üzerindeki etkisi Arnon (1949) metoduna göre analiz edilmiştir. Bu yöntemle göre, 0,1 g yaprak dokusu havan kullanılarak sıvı azot yardımı ile toz hale getirilmiş ve % 80'lik (v/v) soğuk aseton ile ekstrakte edilmiştir. Homojenatlar Whatman No.2 filtre kağıtları ile süzölmüştür. Süzöntüler 470, 645 ve 663 nm dalga boylarında kör örnek (blank) olarak % 80'lik soğuk aseton kullanılarak ölçölmüştür. Fotosentetik pigment konsantrasyonları aşağıdaki denklemlere göre hesaplanmış ve $\mu\text{g/g.TA}$ cinsinden ifade edilmiştir.

$$\text{Klorofil a konsantrasyonu (mg / g x taze ağırlık)} = 11,24 \times A663 - 2,04 \times A645$$

$$\text{Klorofil b konsantrasyonu (mg / g x taze ağırlık)} = 20,13 \times A645 - 4,19 \times A663$$

$$\text{Toplam Klorofil (mg / g x taze ağırlık)} = 7,05 \times A663 + 13,09 \times A645$$

$$\text{Karotenoid (mg / g x taze ağırlık)} = (1000 \times A470 - 1,9 \times \text{Klfl a} - 63,14 \times \text{Klfl b})/214$$

3.8.4. Total Protein Konsantrasyonlarının Tayini

Tuz stresinin Osmancık-97 ve Mevlütbey çeltik çeşitleri ile mutant bitkilerin total protein konsantrasyonu üzerindeki etkilerini tespit etmek ve enzim aktivite çalışmalarında kullanmak üzere izolasyonları yapılmıştır. Sıvı azot kullanılarak havan yardımı ile toz hale getirilen 0,3 g bitki örnekleri 0,1 mM EDTA, % 0,2 Triton X-100, 1 mM PMSF, 2 mM DTT içeren 50 mM Tris HCl (pH 7,8) ile muamele edilmiştir. Homojenatlar 14000 rpm hızda +4 °C’de 30 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant kısımları yeni mikrofüj tüplerine aktarılmıştır. Protein konsantrasyonları Bradford (1976) metoduna göre protein standardı olarak sığır serum albumin (Sigma A2153) kullanılarak tespit edilmiştir. Sonuçlar µg protein/µL cinsinden hesaplanmıştır. Elde edilen total protein ekstraktları peroksidaz, superoksit dismutaz ve katalaz enzim aktivitelerinin belirlenmesinde kullanılmıştır.

3.8.5. Peroksidaz Enzim Aktivitesi Tayini

Tuz stresinin Osmancık-97 ve Mevlütbey çeltik çeşitleri ile mutant bitkilerin peroksidaz enzim aktiviteleri (POX; EC1.11.1.7) üzerindeki etkileri Seevers ve diğ. (1971) metoduna göre tayin edilmiştir. Bradford yöntemi ile konsantrasyonu tespit edilmiş 100 µg total protein örneği 20 mM guaiacol ve 20 mM H₂O₂ içeren reaksiyon tamponu ile karıştırılarak peroksidaz enziminin aktivitesi 470 nm dalga boyunda absorbans artışının 60 saniye boyunca 10 saniye aralıklarla ölçülmesi sonucunda hesaplanmıştır. Değerler U.mg⁻¹.TA cinsinden ifade edilmiştir.

3.8.6. Superoksit Dismutaz Enzim Aktivitesi Tayini

Superoksit dismutaz enzim aktivitesi tayini (SOD; EC 1.15.1.1), Beauchamp ve Fridovich (1971)’in tanımlamış oldukları metoda göre superoksit dismutazın nitro blue tetrazoliumu (NBT) fotokimyasal redüksiyonu ölçülerek hesaplanmıştır. Reaksiyonlar riboflavin ilavesi ile başlatılarak, örnekler 10 dakika yoğun ışık altında bekletilmiştir. 10 dakikanın sonunda 560 nm

dalga boyunda ölçümler alınarak NBT'nin SOD tarafından redüksiyonu U/mg.TA cinsinden hesaplanmıştır.

3.8.7. Katalaz Enzim Aktivitesi Tayini

Katalaz enzim aktivitesi (CAT; E.C 1.11.1.6) tayini Aebi (1984) metoduna göre H₂O₂'in parçalanmasının 240 nm dalgaboyunda 90 saniye süresince takip edilmesi ile ölçülmüştür. Katalaz aktivitesi U.mg⁻¹.TA cinsinden hesaplanmıştır.

3.9. ISSR (BASİT DİZİ TEKRARLARI ARASI POLİMORFİZM) YÖNTEMİ İLE POLİMORFİZMİN BELİRLENMESİ

3.9.1. Genomik DNA İzolasyonu

Moleküler analizlerde kullanılmak üzere genomik DNA izolasyonları setiltrimetilamonyum bromid (CTAB) metoduna göre yapılmıştır. Bu metoda göre 100 mg yaprak örneği sıvı azot ile dondurularak havan yardımı ile homojenize edilmiştir. Homojenetin üzerine 300 µl CTAB solüsyonu eklenerek karıştırılmıştır. Karıştırmanın ardından 500 µl CTAB tamponu ilave edilmiştir. 20 µl proteinaz K (20 mg/ml) (Sigma, P2308) eklenmesinin ardından 65 °C'de 90 dakika inkübasyon beklenmiştir. Inkübasyon sonucunda 20 µl RNaz A (10 mg/ml) (Sigma, R4642) eklenerek karıştırılmış ve 65 °C'de 10 dakika inkübe edilmiştir. Süre dolduğunda örnekler 16000 g hızda 10 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant 500 µl kloroform (Sigma, C2432) içeren santrifüj tüpüne transfer edilmiş ve 30 saniye çalkalanmıştır. 16000 g hızda 10 dakika santrifüj edilmiştir. Üst fazın 500 µl'si 500 µl kloroform içeren santrifüj tüpüne aktarılmış ve çalkalanmıştır. 16000 g hızda 5 dakika santrifüj edilen örneklerin üst fazı temiz tüplere aktarılmıştır. Aktarılan fazın hacminin iki katı hacimde (v/v) CTAB çöktürme solüsyonu eklenmiş ve mikropipet kullanılarak karıştırılmıştır. 60 dakika oda sıcaklığında inkübe edilen örnekler 16000 g hızda 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılarak pellet 350 µl 1,2 M NaCl içersinde çözülmüştür. 350 µl kloroform eklenen ve 30 saniye çalkalanan örnekler 16000 g hızda 10 dakika santrifüj edilmiştir. Üst faz temiz tüplere aktarılmış ve aktarılan hacmin 0,6 hacmi kadar (v/v) izopropanol (Sigma, I9516) eklenip çalkalanmıştır. Örnekler 16000 g hızda 10 dakika santrifüj edilerek süpernatantlar atılmış ve 500 µl % 70'lik (v/v) etanol (Sigma, E7023) eklenmiştir. Çalkalanan örnekler 16000 g hızda 10 dakika santrifüj edilip süpernatantlar atılmıştır. Pellet kurutulduktan sonra 30 µl steril distile su içinde çözülerek

-20 °C'ye kaldırılmıştır. İzolasyonların konsantrasyonları ve saflıkları Implen NanoPhotometer NP80 ile ölçülmüştür. Genomik DNA'lar % 0,8'lik agaroz jellerde görüntülenmiştir.

3.9.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Koşulları

150 mM NaCl toleranslı çeltik mutantları ile mutantların kökenlendiği çeltik çeşidi arasında, tuzluluk stresi uygulanmamış kontrol koşullarında ve stres altında meydana gelen genomik değişimler sonucu ortaya çıkabilecek polimorfizmi belirlemek için moleküler markör tekniklerinden ISSR kullanılmıştır. PZR, Bioline marka MyFi™ DNA Polimeraz enzimi kullanılarak başlatılmıştır. PZR reaksiyon karışımı Tablo 3.8'de gösterilmiştir. Reaksiyonlar HiMedia markalı Prima-Duo™ PZR cihazı kullanılarak Tablo 3.9'da belirtilen sıcaklık ve sürelerde gerçekleştirilmiştir. Kullanılan primerler ve bu primerlere ait bağlanma sıcaklıkları Tablo 3.10'da sunulmuştur.

Tablo 3.8: PZR reaksiyon karışımı bileşenleri ve konsantrasyonları.

	Konsantrasyon	Hacim (µl)	Son Konsantrasyon
5X MyFi Reaksiyon Tamponu	5 mM dNTPs + 15 mM MgCl ₂	5	1 mM dNTPs + 3 mM MgCl ₂
DNA	30 ng	1	30 ng
Primer	10 µM	1	10 µM
MyFi DNA Polimeraz	2U	0,5	1U
dH₂O	-	17,5	-
TOPLAM	-	25	-

Tablo 3.9: PZR reaksiyonlarının aşamaları, sıcaklıkları, süreleri ve döngü sayıları.

	Sıcaklık (°C)	Süre (sn)	Döngü sayısı
Başlangıç Denatürasyonu	95	60	1
Denatürasyon	95	30	40
Primer Bağlanma	*	30	
Uzama	72	150	
Son Uzama	72	600	1

*Primer bağlanma sıcaklıkları kullanılan primerlere göre değişkenlik göstermektedir.

Tablo 3.10: Kullanılan ISSR primerlerine ait diziler ve T_m sıcaklıkları.

Primer Kodu	Primer Dizisi	T _m Sıcaklığı (°C)
UBC808	AGA GAG AGA GAG AGA GC	38
UBC810	GAG AGA GAG AGA GAG AT	38
UBC811	GAG AGA GAG AGA GAG AC	38
UBC812	GAG AGA GAG AGA GAG AA	38
UBC814	CTC TCT CTC TCT CTC TA	45
UBC824	TCT CTC TCT CTC TCT CG	45
UBC825	ACA CAC ACA CAC ACA CT	38
UBC834	AGA GAG AGA GAG AGA GYT	45
UBC840	GAG AGA GAG AGA GAG AYT	45
UBC864	ATG ATG ATG ATG ATG ATG	45
UBC873	GAC AGA CAG ACA GAC A	38
UBC880	GGA GAG GAG AGG AGA	38

3.9.3. PZR Ürünlerinin Görüntülenmesi

ISSR primerleri kullanılarak gerçekleştirilen PZR reaksiyonlarının ürünleri % 1,8'lik agaroz jellerde 80 V sabit elektrik akımında 3 saat süreyle yürütülmüştür. Sürenin sonunda jeller ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad, ABD) kullanılarak görüntülenmiştir.

3.9.4. ISSR Bant Analizi ve Genetik Benzerliklerin Belirlenmesi

ISSR primerleri ile yapılan PZR uygulamalarında tekrarlı olarak elde edilen bantlar her bir jelde, 1 ve 0 olarak kayıt edilmiş olup, '1' bantın varlığını '0' ise bantın yokluğunu göstermektedir. NTSYS-PC 2.10d (Sayısal Taksonomi ve Çok Değişkenli Analiz Sistemi - Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System) genetik analiz programı kullanılarak tuz stresi uygulanmamış ve uygulanmış mutantlar ile mutantların kökenlendiği çeltik çeşidi arasındaki genotipik benzerlik Jaccard tablosuna göre oluşturulan UPGMA dendogramı olarak sunulmuştur.

3.10. İKİ BOYUTLU (2D) JEL ELEKTROFOREZİ

3.10.1. Protein İzolasyonu

150 mM NaCl toleranslı çeltik mutantları ile mutantların kökenlendiği çeltik çeşidi arasında, tuzluluk stresi uygulanmamış kontrol koşullarında ve stres altında meydana gelen proteomik değişiklikleri belirlemek amacı ile iki boyutlu jel elektroforezi yöntemi uygulanmıştır. Bu yöntemde kullanılmak üzere TCA-aseton metodu ile protein izolasyonları gerçekleştirilmiştir.

Her örneğe ait 300 mg bitki yaprağı sıvı azot yardımı ile havanda toz hale getirilmiştir. Örnekler 1,8 mL soğuk trikloroasetik asit (TCA) – merkaptoetanol (2ME) – aseton solüsyonu ile karıştırılarak 2 mL hacimli santifüj tüplerine aktarılmıştır. Tüpler -20 °C’de 1 saat bekletildikten sonra +4 °C 10000 g hızda 10 dakika santrifüj edilmiştir. Üst sıvılar dökülerek pelletler 1,8 mL aseton – 2ME solüsyonu ile çözündürülmüştür. Örnekler -20 °C’de 1 saat bekletildikten sonra +4 °C 10000 g hızda 15 dakika santrifüj edilmiştir. Bu işlem 2 kez daha tekrarlanarak pellet pigmentlerden arındırılmış ve Eppendorf Concentrator Plus cihazında vakum altında kurutulmuştur. Kurutulan protein pelletlerinin her 1 mg kütlesi için 60 µL Bio-Rad ReadyPrep Rehidrasyon/Protein Çözme (Rehydration/Sample) tamponu eklenmiştir. 1 dakika vorteks ile karıştırılan örnekler 2 kez 25 °C’de 10000 g hızda 15 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatantlar yeni santrifüj tüplerine alınmıştır (Méchín ve diğ., 2007).

3.10.2. Proteinlerin Saflaştırılması

Elde edilen proteinlerin 2 boyutlu jel elektroforezi için uygun saflığa getirilmesi işleminde Bio-Rad ReadyPrep™ 2-D CleanUp (saflaştırma) Kiti kullanılmıştır. Üretici firmanın talimatları doğrultusunda, her örnekten 100 µL alınarak üzerlerine 300 µL çöktürme ajanı (precipitation agent) I ilave edilmiştir. Örnekler tüplerin ters-düz edilmesi ile karıştırılarak buzda 15 dakika inkübe edilmiştir. Sürenin sonunda tüplere 300 µL çöktürme ajanı (precipitating agent) II ilave edilmiş ve tüpler yine ters-düz edilerek örnekler karıştırılmıştır. Örnekler 12000 g hızda 5 dakika santrifüj edilmiş ve üstte kalan supernatant kısımları pipet yardımı ile uzaklaştırılmıştır. Tüpler aynı koşullarda 30 saniye tekrar santrifüjlenerek kalabilecek süpernatant kalıntıları uzaklaştırılmıştır. Pelletlerin üzerine 40 µL yıkama solüsyonu (wash reagent) I ilave edilmiş ve yıkama sonrasında 12000 g hızda 5 dakika santrifüj yapılmıştır. Mikropipet yardımı ile üst sıvılar uzaklaştırılmış ve pelletlerin üzerine 25 µL Bio-Rad ReadyPrep proteomik analizler için gerekli saflıkta (proteomic grade) su ilave edilmiştir (Devraj ve diğ., 2009).

İzolasyon sonrasında pellet halinde elde edilen proteinlerin tamamen çözündürülmesi protein kayıplarını engellemede önem taşımaktadır. Proteinlerin çözündürülmesi aşaması, toplamda elde edilecek spot sayısını doğrudan etkilemektedir. Uygun çözündürme tamponunun, 2DE yönteminde ilk basamağın izoelektrik ayırım olmasından dolayı proteinleri kendi yüklerinde değişiklik yapmadan çözündürmesi gerekmektedir. Ayrıca protein komplekslerinin oluşmasına engel olarak aralarında meydana gelebilecek kovalent olmayan bağları parçalaması ve protein

alt ünitelerini birbirinden ayrı tutması deney başarısını arttıracaktır. Son olarak tüm elektroforez süresince proteinleri çözünmüş halde tutup agregasyonları engellemeli ve ortamda faaliyet gösterebilecek proteazları inhibe etmelidir (Rabilloud, 1996; Shaw ve Riederer, 2003; Weiss ve Görg, 2008). Çalışmamızda saflaştırılan proteinler, Bio-Rad ReadyPrep Rehidrasyon/Protein Çözme (Rehydration/Sample) tamponu (8 M üre, %2 CHAPS, 50 mM DTT, % 0,2 pH 3-10 amfolit ve eser miktarda bromofenol mavisi) ile çözündürülmüştür. Burada; üre hidrojen bağlarının oluşmasını engelleyen kaotrop ajan olarak, CHAPS iyonik olmayan deterjan olarak, DTT indirgeyici ajan olarak, bromofenol takip boyası olarak ve amfolit izoelektrik ayırım için pH gradienti oluşturuca ajan olarak görev yapmıştır (Rabilloud, 1996; Shaw ve Riederer, 2003; Weiss ve Görg, 2008).

3.10.3. Protein Konsantrasyonunun Tayini

Protein konsantrasyonları, hazırlanan standartlar ve izole edilen örnek dilüsyonları kullanılarak Lowry yöntemi kullanılarak Nano Drop 1000 (Thermo Scientific) cihazı ile belirlenmiştir. Proteinlerin konsantrasyonları $\mu\text{g protein}/\mu\text{L}$ cinsinden hesaplanmıştır. Hesaplamaların ardından örnekler hızlı dondurma işlemi sonrası -80°C 'de saklanmıştır (Lowry ve diğ., 1951).

3.10.4. Sodyum dodesil sülfat - Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) ile Örnek Kalitesinin İncelenmesi

İzole edilen ve konsantrasyonları belirlenen protein örnekleri % 12'lik SDS poliakrilamid jellere her kuyuda 20 μg olacak şekilde yüklenmiştir. Jeller 160 V elektrik akımında 60 dakika yürütülmüştür. Jeller 60 dakika fiksasyon solüsyonunda (% 10 asetik asit, % 40 metanol) inkübe edilmiştir. Jeller inkübasyon sonrasında koloidal Coomassie Brilliant Blue G-250 boyası içerisinde bantlar görünür hale gelene kadar boyanmıştır. Boyanma sonunda boya fazlalıkları distile su ile yıkama yapılarak uzaklaştırılmıştır. Jeller kurutularak bant keskinlikleri, örneklerin konsantrasyonları açısından değerlendirilerek bir sonraki basamak olan iki boyutlu elektroforez (2DE) için uygun olup olmadıkları kararlaştırılmıştır. Uygun olmayan örnekler aseton çöktürme metodu ile çöktürülerek bu basamak tekrarlanmıştır (Laemmli, 1970).

3.10.5. Protein Örneklerinin İzoelektrik Odaklanmaları ve 2D Jel Elektrofrezleri

Protein örneklerine ilk aşamada IPG stripler (şerit) üzerine geçebilmeleri için striplerle birlikte rehidrasyona tabi tutulmuştur. 17 cm (pH 3-10) IPG stripler için her bir örnekten 1000 µg protein örneği 300 µl 2DE rehidrasyon tamponu içerisinde çözündürülmüştür. Örneklerin içerisine striplerin pH'sine uygun olacak şekilde % 1 amphylote pH 3 - 10 ve % 1 TBP eklenmiştir. Bu aşamadan sonra protein örnekleri birinci boyut odaklama tepsileri (focusing tray) içerisine konulmuştur. Örneklerin üzerlerine uygun IPG stripler dikkatli bir şekilde yerleştirilerek 50 µA/IPG Strip sabit akım uygulanacak şekilde PROTEAN IEF (Bio-Rad, ABD) içerisinde 20°C'de aktif rehidrasyona bırakılmıştır. Aktif rehidrasyon sırasında 30 dk sonunda örneğin buharlaşmasını önlemek için IPG striplerin üzerilerine 2 - 3 ml mineral yağı ilave edilerek yaklaşık 16 saat rehidrasyon işlemine devam ettirilmiştir.

Rehidrasyon işleminin ardından IPG striplerin izoelektrik odaklamasına gerçekleştirilmiştir. Rehidrasyon sonunda IPG stripler alınarak üzerlerinde fazla miktarda bulunan yağ kurutma kağıdı ve su yardımı ile temizlenmiştir. Bunu takiben yeni bir odaklama tepsisi içerisine konularak üzerlerine mineral yağ eklenmiştir. Odaklama tepsileri daha sonra PROTEAN IEF içerisine konularak Tablo 3.11'de verilen koşullarda 20 °C'de odaklanmıştır. Odaklama sırasında proteinler ait oldukları izoelektrik noktalarına göre IPG strip üzerinde sıralanmıştır (Yaprak ve diğ., 2018).

Tablo 3.11: İzoelektrik Odaklama (IEF) voltaj, süre ve ayarları.

	Voltaj (V)	Süre (dk)	Volt - saat	Eğim
1. Adım	250	20	-	Lineer
2. Adım	10000	150	-	Lineer
3. Adım	10000	-	40000	Seri
Toplam		420	50000	

Odaklama sonrasında ikinci boyut elektroforez işlemi için 17 cm'lik stripler dengeleme tamponu (equilibrium buffer) I (6 M üre, 0,375 M tris-HCl pH 8,8, % 2 SDS, % 20 gliserol, % 2 DTT) ve dengeleme tamponu II (6 M üre, 0,375 M tris-HCl pH 8,8, %2 SDS, %20 gliserol, %2 (w/v) iodoasetamid) içerisinde 30 dk'lık sürelerle yıkanmıştır. Bu aşamadan sonra stripler hazırlanan % 12'lik 22 x 24 cm'lik SDS PAGE jellere yerleştirilerek Dodeca Cell (Bio-Rad) cihazı içerisinde 16 °C'de 35 mA akımda 30 dk, 48 mA akımda 5 saat yürütülerek moleküler

ağırlıklarına (MW) göre ikinci boyutta (2D) ayrılmışlardır (Laemmli ve diğ., 1970). Elektroforez sonrasında jeller % 40 metanol, % 10 asetik asit içerisinde en az bir saat fikse edilerek koloidal Coomassie Brilliant Blue G-250 boyası içerisinde gece boyu boyanmıştır.

3.10.6. 2DE Jellerin Analizi

Boyanan jellerin görüntüleri VersaDoc 4000MP sistemi (Bio-Rad, ABD) ile beyaz ışık kullanılarak kaydedilmiştir. Jellerin ilk görüntü ayarları bu cihazda yapıldıktan sonra, jel görüntüleri analiz bilgisayarına aktararak analizleri PDQuest Advanced (Bio-Rad, ABD) programı ile gerçekleştirilmiştir. Jeller, kontrolleri ile karşılaştırılarak proteinlerin ifade seviyeleri artan ve azalan protein spotları şeklinde program yardımı ile belirlenmiştir. Belirlenen her bir protein spotu ayrı ayrı değerlendirilerek, istatistiksel olarak anlamlı olan spotların seçimi yapılmıştır. Seçilen protein spotları Spot-cutter robotu (Bio-Rad, ABD) ile kesilmiştir. Kesim sonrası analizler Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Anabilim Dalı Tıbbi Biyoloji Bölümü DEKART Proteomiks Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

3.10.7. In-Gel Tripsin Kesimi ve Zip-Tip C18

Protein spotlarından peptidlerin elde edilebilmesi için proteinlerin jel içinde peptidlerine ayrılması ve ardından jelden izole edilmeleri gerekmektedir (Shevchenko ve diğ., 2006). Bu işlem için spot örnekleri % 50 asetonitril (ACN) ve 25 mM amonyum bikarbonat çözeltisi içerisinde boyadan arındırmak için orbital çalkalayıcı üzerinde yıkanmıştır. Yıkama sonunda disülfid bağlarının kırılması (reducing) için örnekler % 10 tris-2-karboksietil fosfin (TCEP) içeren 25 mM amonyum bikarbonat içerisinde 60 °C'de 10 dk inkübe edilmiştir. Ardından son konsantrasyonu 100 mM olan iyodoasetamid (IAA) içeren 25 mM amonyum bikarbonat içerisinde oda sıcaklığında karanlıkta 1 saat bekletilerek indirgenmiş olan sistin yan zincirlerinden metillendirilmiştir (alkylation). Bu işlem sonunda % 100'lük ACN içerisine alınan spotlar, ACN uzaklaştırıldıktan sonra son konsantrasyonu 10 ng/μl olan tripsin ile 30°C'de gece boyu kesime alınmıştır. Örneklerin Zip-Tip işleminden önce uçlar ACN ve % 0,1 triflorik asit ile dengelenmiştir. Her örneğin 25 - 30 defa pipetlenmesinin ardından, MALDI matriks (4-alfa siyanosinaminik asit) ile MALDI plate üzerine elüsyonu yapılmıştır.

3.10.8. MALDI TOF-TOF Analizi

Zip-tip sonrası MALDI platelere yerleştirilen örneklerin AbSciex 5800 MALDI-TOF-TOF (MS/MS) cihazında analizleri yapılmıştır. MALDI-TOF-TOF bir kütle spektrometresi olup lazer ışığı kullanarak iyonize ettiği peptitleri vakumlu bir tüp içerisinde ayırttırdıktan sonra kütle/yük (m/z) oranlarına ve peptitlerin amino asit dizilimlerine göre tanımlamaya yardımcı olur. Cihazdan elde edilen veriler online MASCOT data bankasından (<http://www.matrixscience.com>) ProteinPilot™ (AbSciex™) programı kullanılarak hangi proteine ait oldukları belirlenmiştir. Elde edilen proteinler arasındaki biyolojik ilişkiyi ortaya koymak ve hücrel yolakları belirlemek için ise, IPA (Ingenuity Pathway Analysis) ve PANTHER (<http://www.pantherdb.org/>) programları kullanılmıştır.

MALDI kalibrasyonu içsel ve dışsal kalibrant kullanılarak yapılmıştır. Her bir spektrum için ortalama 200 lazer vuruşu kullanılmıştır. Elde edilen tüm spektrumlar (m/z), arama parametreleri; bir hatalı kesim bölgesi, fikse edilmiş modifikasyon olarak karbamidomethyl (sistein), değişken modifikasyon olarak Met oksidasyonu, peptid yükü + 1, monoizotopik kütle değerleri, peptid kütle toleransı ± 50 ppm, fragment kütle toleransı $\pm 0,25$ Da olarak belirlenmiş ve MASCOT veri bankasında analiz edilmiştir.

3.11. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

Osmancık-97 ve Mevlütbey çeltik çeşitlerine ait kontrol ve farklı dozlarda gama radyasyonu ile ışınlanmış bitkilerin in vitro ve in vivo koşullardaki büyüme parametrelerinden bitki boy uzunluğu, kök uzunluğu, taze ağırlık ve morfolojik zararlanma değerlendirilmesinden elde edilen veriler ile farklı NaCl konsantrasyonlarına in vitro ve in vivo koşullarda maruz bırakıldıktan sonraki tüm biyokimyasal analizlerinin (total protein, lipid peroksidasyon, prolin birikimi, fotosentetik pigment, total protein, peroksidaz enzim aktivitesi, superoksit dismutaz enzim aktivitesi katalaz enzim aktivitesi) değerlendirilmeleri GraphPad Prism 4 (<https://www.graphpad.com>) istatistik programı kullanılarak yapılmıştır. Programda tek yönlü ANOVA testi yapılmış ve testte istatistiksel olarak anlamlı bulunan grupların karşılaştırması Student- Newman Keuls testi ile yapılmıştır (Zar, 1984).

Kontrol ve mutant bitkiler arasındaki genetik uzaklığın belirlenmesi için ISSR analizinde elde edilen amplifikasyon bantları polimorfik olup olmamasına göre 1 (var) veya 0 (yok) olarak

sınıflandırılıp matris oluşturulmuştur. Daha sonra “S” olarak adlandırılan genetik benzerlik katsayısı MultiVariate Statistical Packege V3.1 (<https://www.kovcomp.co.uk/mvsp>; 2018) paket programı kullanılarak hesaplanmıştır (Nei ve Li, 1979).

$$S = 2 \times NAB / NA + NB$$

NAB: A ve B bireylerinin ortak bant sayısı

NA: A bireyinin toplam bant sayısı

NB: B bireyinin toplam bant sayısı.

Bitkilerin birbirine göre olan genetik uzaklığı ise “D” olarak adlandırılarak $D = 1 - S$ formülü ile tespit edilmiştir. Kümeleme analizi ve UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) yöntemine göre genetik yakınlığı gösteren dendrogramların oluşturulmasında MultiVariate Statistical Packege V3.1 paket programı kullanılmıştır.

4. BULGULAR

Çeltikte tuza toleranslı mutantların teşvik edilmesi için tarla denemelerinde kullanılacak gama radyasyon dozlarının belirlenmesi amacı ile bir ön çalışma yapılmıştır.

4.1. ÇELTİK ÇEŞİTLERİNİN RADYASYON HASSASİYETİNİN TESPİTİ

0, 100, 200, 300, 400, 500, 600 ve 700 Gy gama radyasyonu uygulanmış Osmancık-97 ve Mevlütbey tohumlarından yetiştirilen 14 günlük bitkilerde çimlenme yüzdeleri, ortalama bitki boyları ve ortalama bitki yaş ağırlıkları saptanmıştır (Tablo 4.1 ve Tablo 4.2). Gama radyasyonu ile ışınlanan çeltik çeşitlerinde artan gama radyasyonu dozuna paralel olarak çimlenme yüzdesinde, ortalama bitki boyları ve ortalama bitki yaş ağırlıklarında azalma saptanmıştır. 500 Gy gama radyasyon uygulanmış Osmancık-97 ve Mevlütbey çeltik çeşitlerinde çimlenme yüzdeleri sırası ile % 52 ve % 48'dir. Benzer şekilde 600 Gy'de bu yüzdeler sırası ile % 26 ve % 14 olarak bulunmuştur. 700 Gy gama radyasyonu dozunda hiçbir çeltik tohumu çimlenmemiştir. Gama radyasyonunun, çeltik çeşitlerinin bitki boyları üzerine etkisi Şekil 4.1 ve Şekil 4.2'de gösterilmiştir. Osmancık-97 ve Mevlütbey çeltik çeşitlerine ait kontrol bitkilerinin ortalama bitki boyları sırayla 9,65 ve 9,85 cm olarak bulunmuştur. 500 Gy'lik gama radyasyon dozunda ortalama bitki boyu sırasıyla 3,92 ve 3,84 cm'ye düşmüştür. Bitki boylarında meydana gelen bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Radyasyonun ortalama bitki yaş ağırlıklarına üzerine etkisi de bitki boylarına benzer bir sonuç göstermiş ve bu azalmalarda istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

Fide boyunu % 30 oranında azaltan (GR₃₀) ve fide boyunu % 50 azaltan (GR₅₀) gama radyasyonu dozları tespit edilmiştir (Şekil 4.3). Osmancık-97 çeltik çeşidinin GR₃₀ dozu 400 Gy, GR₅₀ dozu 480 Gy olarak belirlenmiştir. Mevlütbey çeltik çeşidinin GR₃₀ dozu 260 Gy, GR₅₀ dozu 450 Gy olarak saptanmıştır.

Tablo 4.1: Radyasyonun Osmancık-97 çeltik çeşidi çimlenme oranı (%), ortalama bitki boyu (cm), ortalama bitki yaş ağırlığı (g) üzerine etkileri.

Osmancık-97	Çimlenme (%)	Ortalama Bitki Boyu		Ortalama Yaş Ağırlık	
		cm*	%	g*	%
Kontrol	100	9,65 ± 1,78 ^a	100	0,1943 ± 0,05 ^a	100
100 Gy	96	7,95 ± 1,08 ^b	82,38	0,1726 ± 0,03 ^b	88,83
200 Gy	90	7,87 ± 1,44 ^b	81,55	0,1374 ± 0,03 ^c	70,72
300 Gy	80	7,78 ± 1,05 ^b	80,62	0,1275 ± 0,03 ^c	65,62
400 Gy	76	6,81 ± 1,39 ^c	70,56	0,1256 ± 0,05 ^c	64,64
500 Gy	52	3,92 ± 0,80 ^d	37,3	0,1060 ± 0,02 ^d	54,56
600 Gy	26	2,70 ± 0,55 ^e	27,97	0,0605 ± 0,01 ^e	31,14
700 Gy	-	-	-	-	-

* Aynı harfle gösterilmeyenler, kontrol ve ışınlanmış deney gruplarının ortalama bitki boyu ve ortalama yaş ağırlık bakımından aralarındaki farkların, Student Newman-Keuls Metodu testine göre en az 0,05 önemli olduğunu ifade etmektedir. ± Standart Sapma.



Şekil 4.1: Radyasyonun Osmancık-97 çeltik çeşidi bitki boyları üzerine etkisi.

Tablo 4.2: Radyasyonun Mevlütbey çeltik çeşidi çimlenme oranı (%), ortalama bitki boyu (cm), ortalama bitki yaş ağırlığı (g) üzerine etkileri.

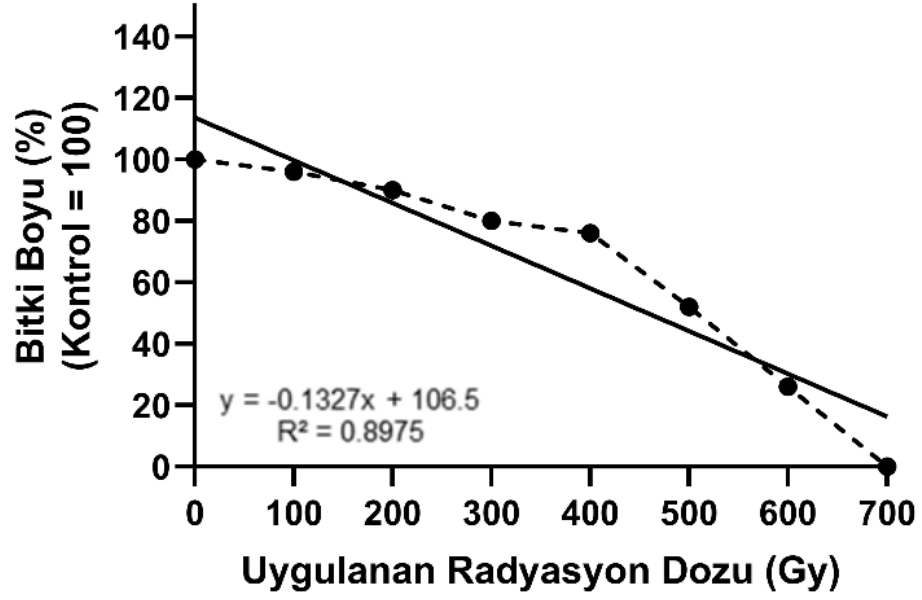
Mevlütbey	Çimlenme (%)	Ortalama Bitki Boyu		Ortalama Yaş Ağırlık	
		cm*	%	g*	%
Kontrol	100	9,85 ± 2,28 ^{a*}	100	0,1577 ± 0,03 ^a	100
100 Gy	88	9,11 ± 2,37 ^b	92,49	0,1222 ± 0,03 ^b	77,49
200 Gy	82	7,93 ± 1,33 ^c	80,51	0,1196 ± 0,03 ^b	75,84
300 Gy	74	6,23 ± 1,43 ^d	63,25	0,1044 ± 0,03 ^c	66,20
400 Gy	70	6,11 ± 0,95 ^d	62,03	0,0993 ± 0,02 ^c	62,97
500 Gy	48	3,84 ± 0,83 ^e	38,99	0,0746 ± 0,01 ^d	47,31
600 Gy	14	1,12 ± 0,13 ^f	11,37	0,0364 ± 0,01 ^e	23,08
700 Gy	-	-	-	-	-

* Aynı harfle gösterilmeyenler, kontrol ve ışınlanmış deney gruplarının ortalama bitki boyu ve ortalama yaş ağırlık bakımından aralarındaki farkların, Student Newman-Keuls Metodu testine göre en az 0,05 önemli olduğunu ifade etmektedir. ± Standart Sapma.

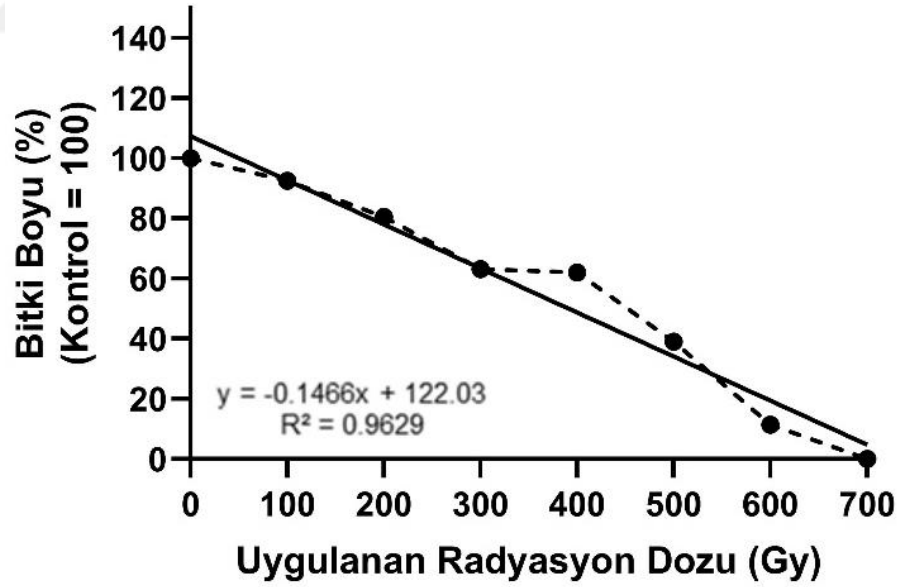


Şekil 4.2: Radyasyonun Mevlütbey çeltik çeşidi bitki boyları üzerine etkisi.

Osmancık-97



Mevlütbey



Şekil 4.3: Osmancık-97 ve Mevlütbey çeşitlerinde radyasyonun bitki boyu üzerine etkisi.

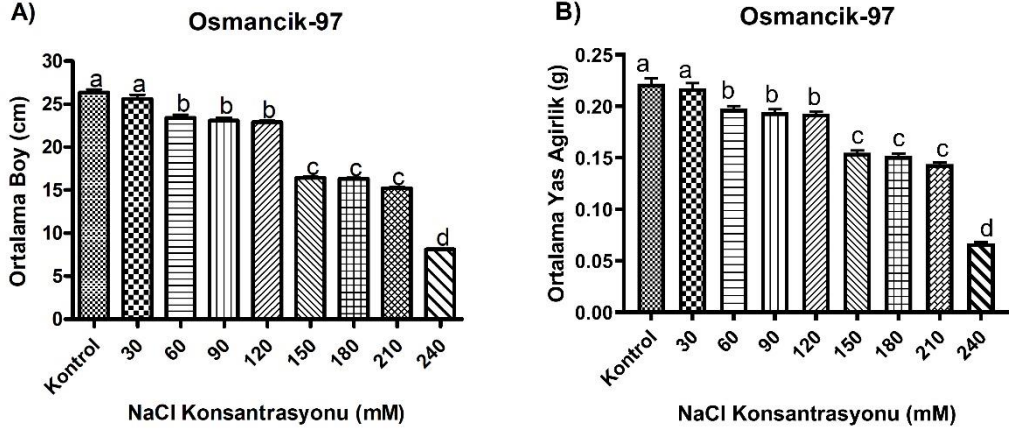
4.2. ÇELTİK ÇEŞİTLERİNİN TUZ (NaCl) HASSASİYETLERİNİN TESPİTİ

Tuzluluğun Osmancık-97 ve Mevlütbey çeltik çeşitleri üzerine etkisini belirlemek amacı ile ortalama bitki boyu ve bitki yaş ağırlıkları saptanmıştır (Tablo 4.3). 0, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 ve 240 mM tuz (NaCl) konsantrasyonlarına maruz bırakılan Osmancık-97 ve Mevlütbey çeltik çeşitlerinde ortalama bitki boyları artan tuz konsantrasyonuna bağlı olarak azalmıştır (Şekil 4.4A, 4.5A ve 4.6A-B).

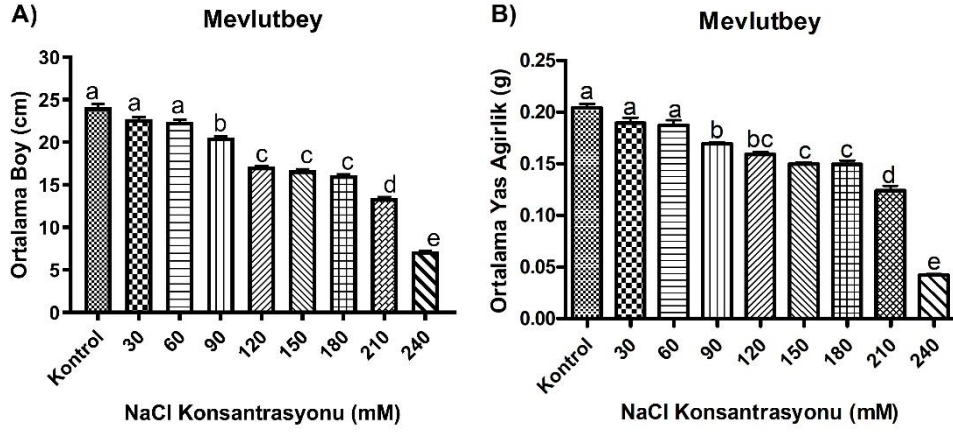
Tablo 4.3: Tuz stresinin Osmancık-97 ve Mevlütbey çeltik çeşitleri ortalama bitki boyu (cm) ve ortalama bitki yaş ağırlığı üzerine etkileri.

	Osmancık-97		Mevlütbey	
	Ort. Boy (cm)	Ort. Ağırlık (g)	Ort. Boy (cm)	Ort. Ağırlık (g)
Kontrol	26,34 ± 2,63 ^{a*}	0,22 ± 0,04 ^a	24,12 ± 2,85 ^a	0,20 ± 0,03 ^a
30 mM	25,61 ± 3,43 ^a	0,22 ± 0,05 ^a	22,73 ± 1,76 ^b	0,19 ± 0,04 ^a
60 mM	23,40 ± 2,54 ^b	0,19 ± 0,02 ^b	22,41 ± 1,50 ^b	0,19 ± 0,03 ^a
90 mM	23,10 ± 2,47 ^b	0,18 ± 0,02 ^b	20,55 ± 1,32 ^c	0,17 ± 0,01 ^b
120 mM	22,92 ± 1,56 ^b	0,19 ± 0,01 ^b	17,13 ± 0,69 ^d	0,16 ± 0,02 ^b
150 mM	16,41 ± 1,09 ^c	0,16 ± 0,02 ^c	16,71 ± 0,95 ^d	0,15 ± 0,01 ^c
180 mM	16,30 ± 1,01 ^c	0,15 ± 0,02 ^c	16,12 ± 0,88 ^d	0,15 ± 0,03 ^c
210 mM	15,25 ± 0,75 ^c	0,14 ± 0,01 ^c	13,44 ± 0,85 ^e	0,12 ± 0,03 ^d
240 mM	8,12 ± 0,59 ^d	0,07 ± 0,01 ^d	7,20 ± 0,45 ^f	0,04 ± 0,01 ^e

* Aynı harfle gösterilmeyenler, kontrol ve tuz uygulanmış deney gruplarının ortalama bitki boyu ve ortalama yaş ağırlık bakımından aralarındaki farkların, Student Newman-Keuls Metodu testine göre en az $P < 0,05$ önemli olduğunu ifade etmektedir. ± Standart Sapma.



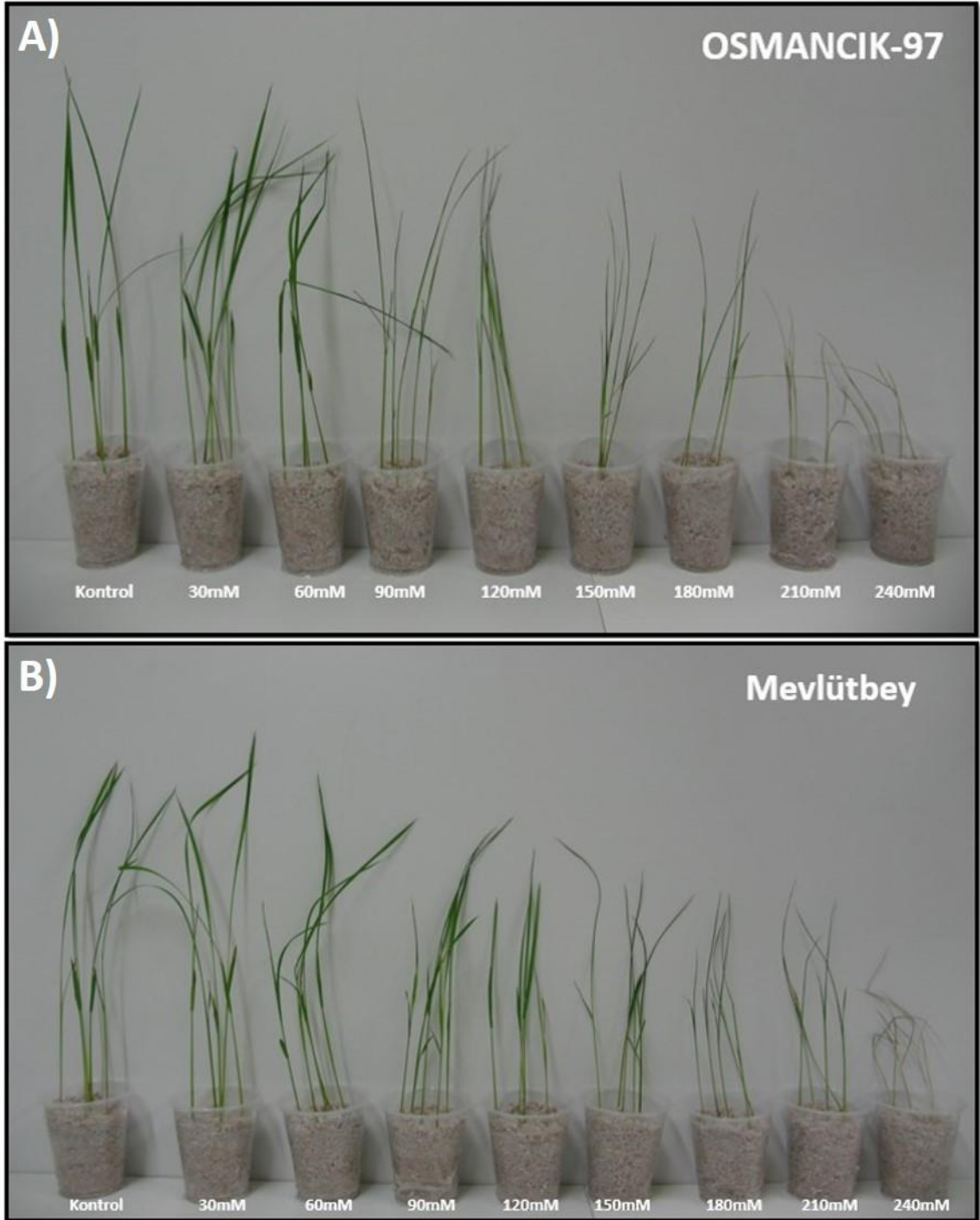
Şekil 4.4: Tuz stresinin Osmancık-97 çeltik çeşidi ortalama bitki boyu (A) ve ortalama bitki yaş ağırlığı (B) üzerine etkisi.



Şekil 4.5: Tuz stresinin Mevlütbey çeltik çeşidi ortalama bitki boyu (A) ve ortalama bitki yaş ağırlığı (B) üzerine etkisi.

Osmancık-97 çeltik çeşidine ait kontrol bitkilerinde bitki boyu 26,34 cm iken 150 mM’da ortalama bitki boyu 16,41 cm’ye inmiştir. 240 mM’da ise ortalama bitki boyu 8,12 cm’dir (Şekil 4.4A ve Tablo 4.3). Bu çeşitte 60 mM NaCl konsantrasyonundan itibaren kontrol grubuna göre istatistiksel bir farklılık görülmeye başlanmış, ancak en belirgin azalma 150 mM konsantrasyonunda görülmüştür. Mevlütbey çeltik çeşidine ait kontrol bitkilerinde bitki boyu 24,12 cm iken 150 mM’da ortalama bitki boyu 16,71 cm’ye inmiştir (Şekil 4.5A ve Tablo 4.3). 240 mM’da ise ortalama bitki boyu 7,20 cm’dir. Bu çeşitte 30 mM NaCl konsantrasyonundan itibaren kontrol grubuna göre istatistiksel bir farklılık görülmeye başlanmış, ancak en belirgin azalma 120 mM konsantrasyonunda görülmüştür. Her iki çeltik çeşidinin ortalama yaş

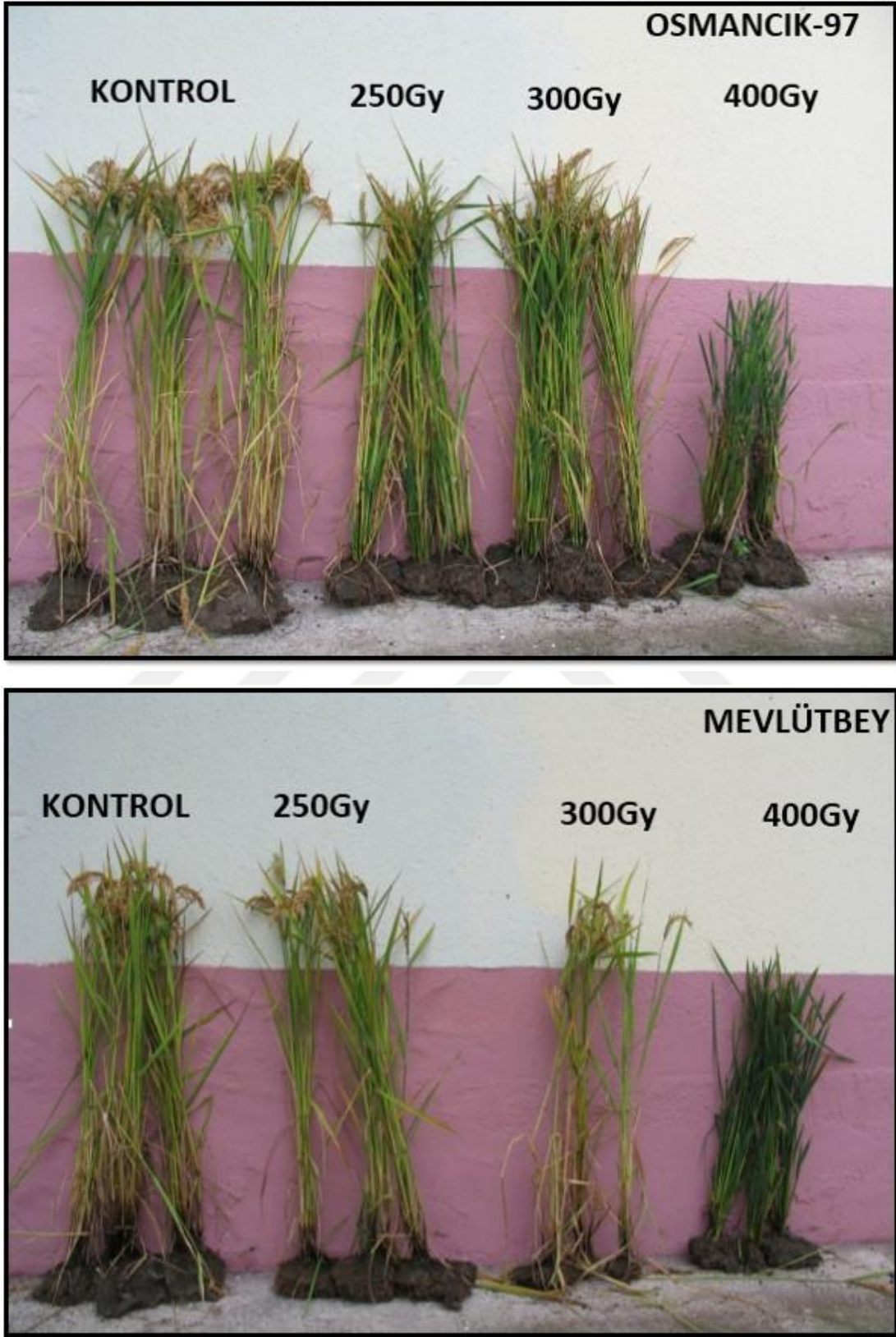
ağırlıkları tuz konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak azalmış ve bu azalmanın 150 mM NaCl konsantrasyonunda istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır (Şekil 4.4B, Şekil 4.5B ve Tablo 4.3).



Şekil 4.6: Tuz stresinin Osmancık-97 (A) ve Mevlütbey (B) çeltik bitkileri üzerine etkisi.

4.3. M₁ GENERASYONUNA AİT MUTANTLARIN ELDESİ

Çeltik çeşitlerinde tuzluluğa toleranslı mutantları teşvik etmek amacı ile 250, 300 ve 400 Gy gama radyasyon dozları ile ışınlanan tohumlar ile bir tarla denemesi kurulmuştur. Bu tarla denemesinde kontrol ve radyasyon dozlarına maruz bırakılan tohumlardan yetiştirilen bitkiler her muamelede toplu olarak hasad edilmiştir (Şekil 4.7). Gama radyasyonunun M₁ generasyonu üzerinde meydana getirdiği değişikliklere ait çimlenme, yaşayan fide, sterilitte, fertilite ve yatma yüzdeleri ile ortalama salkım, salkım dane, ortalama sürgün, kardeşlenme ve çiçeklenme gün sayıları, ayrıca ortalama bitki boyu, salkım uzunluğu ve 1000 dane ağırlığı saptanmıştır (Tablo 4.4). Osmancık-97 ve Mevlütbey çeşitlerine ait ışınlanmamış tohumların tarla koşullarında çimlenme oranları sırası ile % 93,8 ve % 91'ken ışınlama yapılan en yüksek radyasyon dozu olan 400 Gy'de bu oranlar % 55,2 ve % 50,1'e kadar azalmıştır. 250 Gy gama radyasyonu ile ışınlanan tohumlardan çimlenip yaşayan fide yüzdeleri kontrole yakın olup, dozun artışına paralel olarak azalma göstermiştir. Bu yüzdeler 400 Gy gama radyasyonu uygulanan Osmancık-97 çeşidinde % 87,1 ve Mevlütbey çeşidinde % 89,7 oranındadır. Her iki çeltik çeşidi de uygulanan tüm radyasyon dozlarında kontrol bitkilerine göre ortalama bitki boyu, salkım sayısı, salkım uzunluğu, sürgün sayısı, 1000 dane ağırlığı ve fertilite yüzdesi bakımından azalmıştır. Kardeşlenme sayısı bakımından Osmancık-97 çeşidi radyasyona bağlı bir azalma göstermezken, Mevlütbey çeşidinde 300 ve 400 Gy radyasyon dozlarında kardeşlenme sayıları azalmıştır. 400 Gy gama radyasyonu dozu, her iki çeşitten elde edilen bitkilerin çiçeklenme gün sayısını 2 gün geçiktirmiştir. Tarla koşullarında Osmancık-97 çeşidine ait kontrol ve 250 Gy'de yatma gözlemlenmemiştir. 300 Gy'de bitkilerin % 5 oranında yattığı ve 400 Gy'de bu oranın % 25'e yükseldiği belirlenmiştir. Mevlütbey çeşidine ait kontrol ve 250 Gy'de yatma gözlemlenmezken, 300 Gy'de yatma oranının % 15 olduğu görülmüştür. 400 Gy'de bu oran % 20'ye yükselmiştir.



Şekil 4.7. Osmancık-97 ve Mevlütbey çeşitlerine ait 0 (Kontrol), 250, 300 ve 400 Gy’lik dozlarda

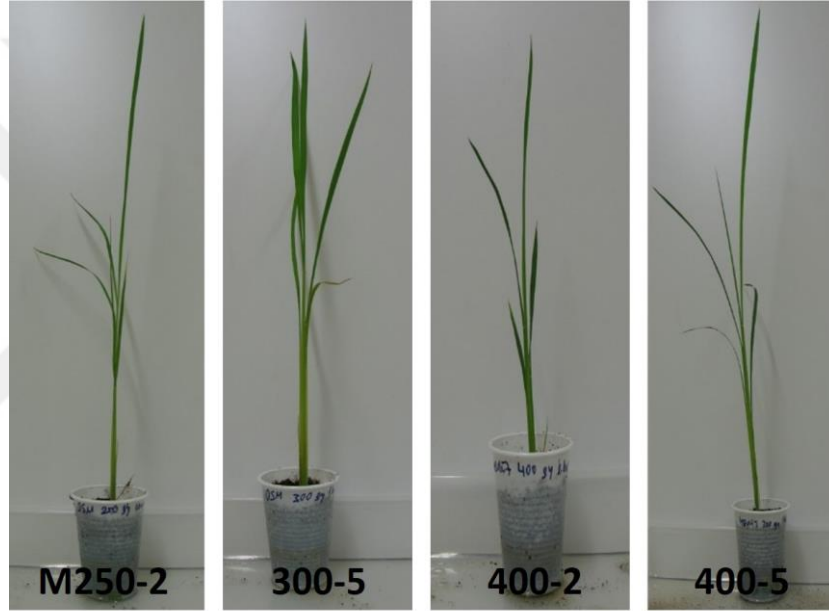
Tablo 4.4. M₁ generasyonuna ait mutantların eldesi için kurulan tarla denemesi sonuçları.

Çeşitler	Osmancık-97				Mevlütbey			
Dozlar	Kontrol	250 Gy	300 Gy	400 Gy	Kontrol	250 Gy	300 Gy	400 Gy
Çimlenme (%)	93,8	88,6	79,1	55,2	91	82,4	68,1	50,1
Yaşayan Fide (%)	95,4	93	87,3	87,1	95,8	90,8	86,7	89,7
Ortalama Bitki Boyu (%) (Kontrol=100)	100	98,3	97,4	92,1	100	99,1	95,5	93,7
Ortalama Salkım Sayısı	15,4 ±0,8 ^{a*}	13,2 ±1,1 ^b	11,3 ±1,3 ^c	10,7 ±0,9 ^c	15,7 ±1,3 ^a	14,2 ±0,9 ^b	10,6 ±1,3 ^c	9,8 ±1,2 ^c
Ortalama Salkım Uzunluğu (cm)	15,15 ±0,743 ^a	14,21 ±0,547 ^b	14,52 ±0,623 ^b	12,95 ±0,489 ^c	18,34 ±0,763 ^a	16,67 ±0,627 ^b	16,56 ±0,669 ^b	14,12 ±0,541 ^c
Salkım Dane Sayısı	190,9 ±4,2 ^a	150,6 ±5,4 ^b	147,4 ±4,8 ^b	142,3 ±5,8 ^b	196,3 ±4,9 ^a	162,0 ±5,3 ^b	134,1 ±4,7 ^c	130,3 ±5,8 ^c
Sterilite (%)	2,7	4,1	6,9	14,9	1,6	10,8	13,7	18,8
Fertilite (%)	97,3	95,9	93,1	85,1	98,4	89,2	86,3	81,2
Ortalama Sürgün sayısı	20,2 ±2,1 ^a	19,4 ±1,9 ^a	14,6 ±2,3 ^b	14,1 ±1,8 ^c	18,6 ±1,7 ^a	18,2 ±2,2 ^a	13,1 ±2,4 ^b	12,6 ±1,9 ^b
Kardeşlenme sayısı	3	3	3	3	3	3	2	2
Çiçeklenme gün sayısı	78	79	80	80	83	83	83	85
Yatma (%)	0	0	5	25	0	0	15	20
1000 dane Ağırlığı (g)	33,08	32,28	31,76	31,29	30,77	29,41	29,34	29,28

* Aynı harfle gösterilmeyenler, kontrol ve radyasyon uygulanmış deney gruplarının ortalama salkım sayısı, salkım uzunluğu, salkım dane sayısı ve sürgün sayısı bakımından aralarındaki farkların, Student Newman-Keuls Metodu testine göre en az 0,05 önemli olduğunu ifade etmektedir. ± Standart Sapma.

4.4. M₂ GENERASYONUNDA TUZLULUĞA TOLERANSLI MUTANTLARIN İN VİVO SELEKSİYONU

Karadeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü deneme tarlalarında hasadı yapılarak elde edilen M₂ generasyonuna ait tohumların arasından 150 mM tuz (NaCl) konsantrasyonuna toleranslı bireyler (Şekil 4.8) önce in vivo koşullarda saptanmıştır. Bu amaçla T.C. İstanbul Kültür Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü laboratuvarlarındaki iklim odası kullanılmıştır. Kontrollü koşullarda yetiştirilen M₂ döllerine ait ekilen ve çimlenen tohum sayıları, klorofil mutanlığı, tuza toleranslı mutant sayıları Tablo 4.5'te sunulmuştur.



Şekil 4.8: M₂ generasyonunda tuza toleranslı olarak seçilen seçilen 250-2, 300-5, 400-2 ve 400-5 mutantları.

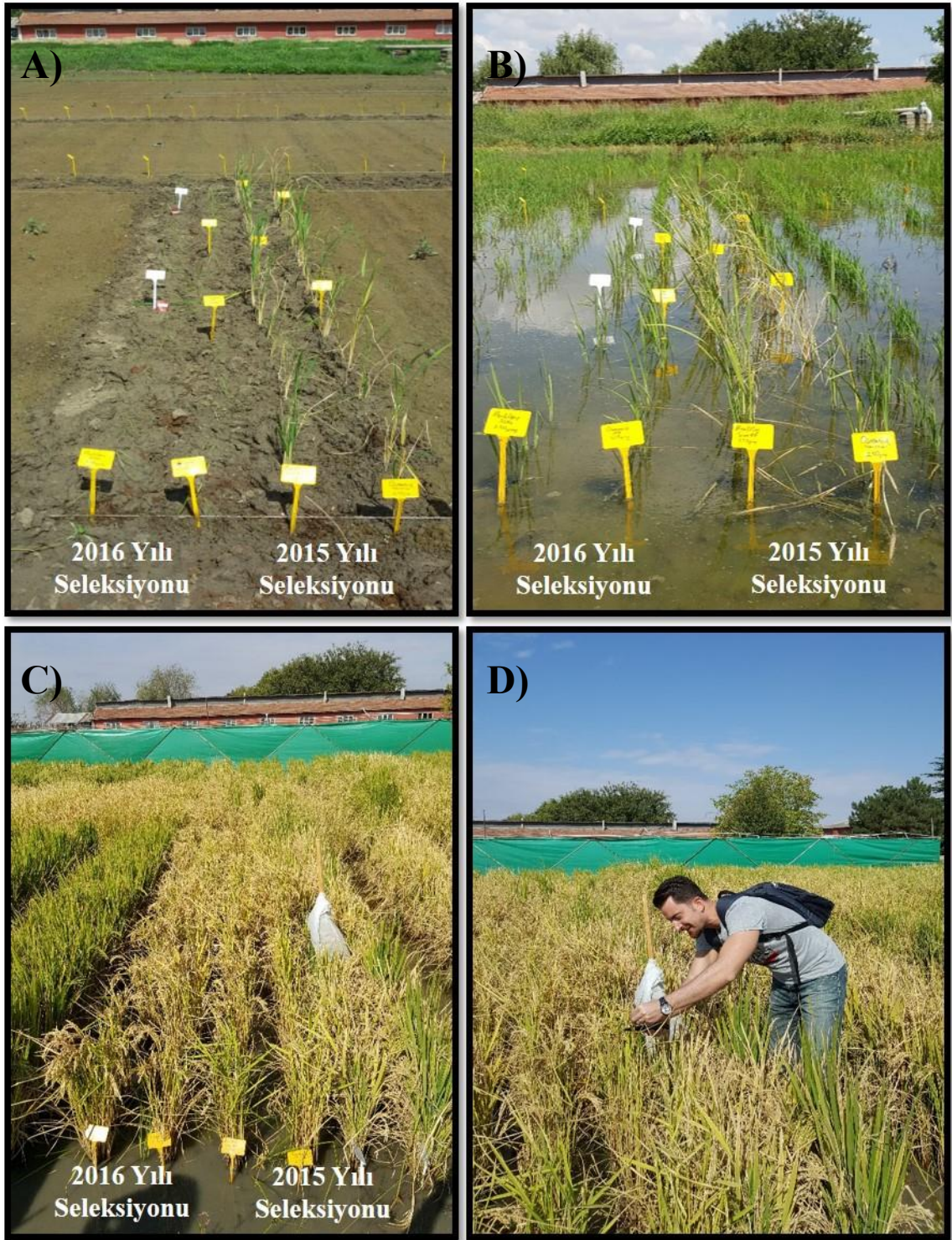
Tablo 4.5: M₂ generasyonunda belirlenen klorofil mutantları ile 150 mM NaCl konsantrasyonuna toleranslı mutantların sayı ve yüzdeleri.

Çeşitler	Uygulanan Radyasyon Dozları (Gy)	Ekilen Tohum Sayısı	Çimlenme		Klorofil Mutanlığı		Tuza Toleranslı Mutant	
			Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
Osmancık-97	250	3000	2229	74,3	11	0,49	29	1,3
	300	3000	2082	69,4	19	0,91	29	1,39
	400	3000	2024	67,5	7	0,35	18	0,89
Mevlütbey	250	3000	2107	70,2	18	0,85	23	1,09
	300	3000	2023	67,4	8	0,40	21	1,04
	400	3000	1819	60,6	6	0,33	8	0,44

Uygulanan radyasyon dozları, M_1 generasyonunda olduğu gibi M_2 generasyonuna ait her iki çeşitten ekilen 18000 tohumun (her muamele için 3000'er tohum) kontrollü koşullardaki çimlenme yüzdelerini de doz artışına paralel olarak azaltmıştır. Bununla beraber 12284 fide yetiştirilmiş ve bu fidelerden mutantlar seçilmiştir. Osmancık-97 çeşidi için 250, 300 ve 400 Gy'lik radyasyon dozlarında saptanan klorofil mutant yüzdesi sırasıyla 0,49, 0,91 ve 0,35'tir. Mevlütbey çeşidinde ise sırasıyla 0,85, 0,40 ve 0,33'tür. Klorofil mutanti sayısı Osmancık-97 için en yüksek 300 Gy'de bulunurken, Mevlütbey çeşidinde 250 Gy'de saptanmıştır. Tuz mutanti olarak Osmancık-97'de yine 300 Gy'de en yüksek oranda (% 1,39) mutant seçilirken, Mevlütbey çeşidinde 250 Gy'de (% 1,09) seçilmiştir. M_2 döllerinden 76'sı Osmancık-97 çeşidinden, 52'si Mevlütbey çeşidinden olmak üzere toplam 128 tuza toleranslı mutant seçim gerçekleştirilmiştir.

4.4.1. Tuza Toleranslı Mutantlardan Tohum Eldesi

In vivo koşullarda tuza toleranslı olarak belirlenen mutantlardan (M_2) tohum almak amacıyla Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü (Edirne) araştırma tarlalarına çeltik fideleri ekilmiştir (Şekil 4.9A-B). Seçilen mutant fidelerden elde edilen tohumlar tek bitki hasadı yöntemi ile toplanmıştır (Şekil 4.9C-D). Her bir mutanttan tek bitki hasadı ile elde edilen tohum miktarları da Tablo 4.6'da verilmiştir. Tarla denemesinden elde edilen toplam 86 bitkiden 250, 300 ve 400 Gy dozlarında Osmancık-97 çeşidine ait sırasıyla 12, 16 ve 15 mutant bitkiden ve Mevlütbey çeşidine ait sırasıyla 16, 18 ve 9 mutant bitkiden tohum alınmıştır.



Şekil 4.9: M₂ generasyonuna ait tuza toleranslı mutantların tohum almak üzere tarlaya ekimi **A)** fidelerin tarlada şaşırtılması, **B)** parsellerin su ile kaplanması, **C)** hasad öncesi parsellerin kurutulması, **D)** hasat dönemlerinde çeltik bitkilerine ait görünüm.

Tablo 4.6: M₃ generasyonuna ait 150 mM NaCl konsantrasyonuna toleranslı mutantlardan elde edilen tohum miktarları.

Mevlütbey				Osmancık-97			
2015 Seleksiyonu Mutant Kodu	Tohum Miktarı (g)	2016 Seleksiyonu Mutant Kodu	Tohum Miktarı (g)	2015 Seleksiyonu Mutant Kodu	Tohum Miktarı (g)	2016 Seleksiyonu Mutant Kodu	Tohum Miktarı (g)
250-1	68,19	250-1	116,76	250-1	83,64	250-1	51,84
250-10	74,31	250-2	25,43	250-2	22,15	250-2	56,33
250-2	73	250-3	44,66	250-3	30,16	250-3	40,34
250-3	50,65	250-4	37,48	250-4	8,81	250-4	55,67
250-4	57,23	250-5	48,83	250-5	62,55	250-5	23,56
250-5	24,1	250-6	54,93	250-6	11,16	300-1	37,04
250-6	54,24	300-1	18,06	250-7	32,68	300-2	59,53
250-7	78,39	300-2	4,42	300-1	20,92	300-3	69,65
250-8	52,23	300-3	48,49	300-10	23,43	300-4	11,35
250-9	6,76	300-4	24,52	300-2	95,22	300-5	51,97
300-1	10,73	300-5	36,04	300-3	110,24	300-6	12,1
300-2	50,69	300-6	58,41	300-4	29,3	400-1	38,8
300-3	13,36	300-7	66,13	300-5	39,66	400-10	108,15
300-4	46,34	300-8	41,21	300-6	42,28	400-2	31,71
300-5	35,97	300-9	51,83	300-7	12,13	400-3	15,1
300-6	28,36	400-1	28,56	300-8	41,79	400-4	17,77
300-7	24,4	400-2	35,49	300-9	32,12	400-5	35,9
300-8	16,03	400-3	30,21	400-1	34,48	400-6	29,7
300-9	42,05	400-4	13,31	400-2	0,81	400-7	24,27
400-1	36,21	400-5	20,09	400-3	17,5	400-8	45,12
400-2	17,03	400-6	65,63	400-4	21,38	400-9	11,37
400-3	31,32			400-5	102,28		

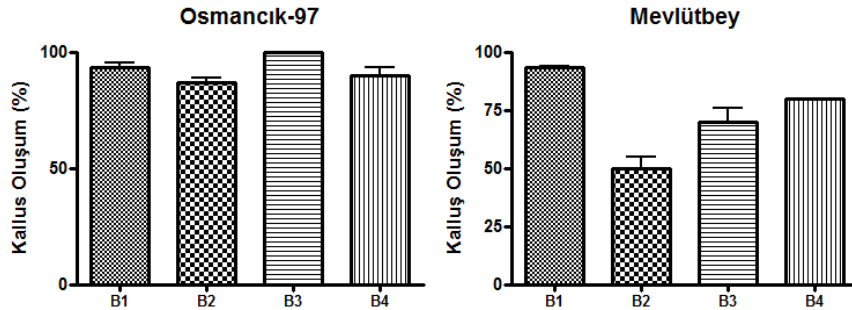
4.5. ÇELTİK ÇEŞİTLERİNİN İN VİTRO KALLUS KÜLTÜRLERİNİN KURULMASI

İn vitro kallus kültürlerinin kurulması işlemlerinde kullanılacak yüzey sterilizasyonu metodunu belirlemek için denenen farklı süre ve NaOCl konsantrasyonları içeren S1, S2, S3 ve S4 sterilizasyon yöntemlerine ait kontaminasyon oranları Tablo 4.7’de sunulmaktadır. S2 ve S4 kodlu yüzey sterilizasyonu metodlarının kontaminasyonu tamamen engelledikleri belirlenmiştir. Buna göre % 50’lik ticari çamaşır suyunda 30 dakika (S2) ve % 40’lık ticari çamaşır suyunda 30 dakika muamele edilen tohumlarda kontaminasyon bulunmamıştır. Bu nedenle tohumların % 40’lık çamaşır suyunda 30 dakika tutulması tüm çalışmalar için uygun yüzey sterilizasyon metodu olarak saptanmıştır.

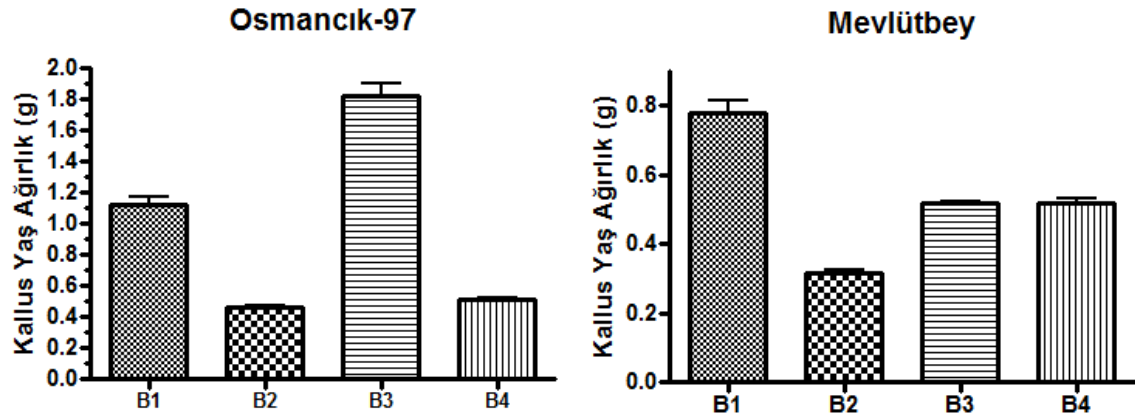
Tablo 4.7: Denemesi yapılan yüzey sterilizasyonu metodlarında gözlemlenen kontaminasyon sayı ve yüzdeleri.

Sterilizasyon Kodu	Kontamine Tohum (Adet)	Kontaminasyon Yüzdesi (%)
S1	20	50
S2	0	0
S3	10	25
S4	0	0

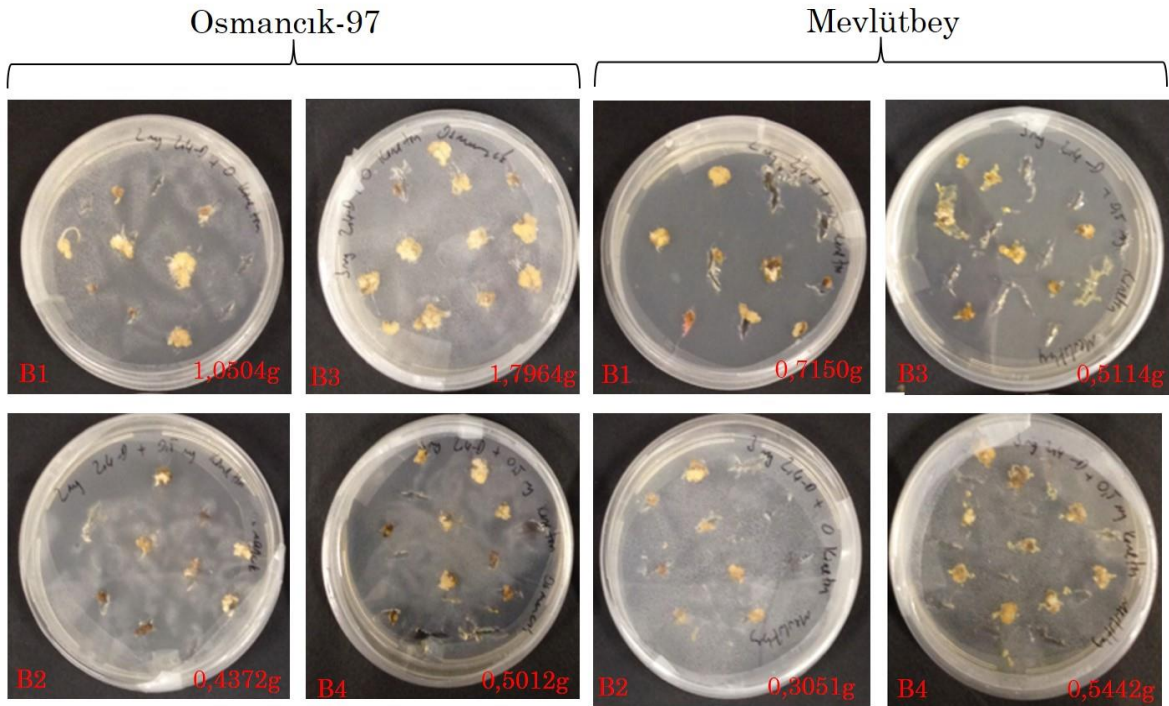
Çeltik embriyolarından kallus oluşumunun teşvik edilmesi için farklı 2,4-D ve kinetin konsantrasyonları ile desteklenmiş MS besi yerlerinin kallus oluşum yüzdeleri Şekil 4.10’da ve ortalama kallus yaş ağırlıkları Şekil 4.11’de sunulmuştur. Osmancık-97 çeşidinde en yüksek kallus oluşum yüzdesi % 100 ile B3 besiyerinde (3 mg/L 2,4-D) ve Mevlütbey çeşidinde % 93,3 oranında B1 besiyerinden (2 mg/L 2,4-D) elde edilmiştir (Şekil 4.12).



Şekil 4.10: Denemesi yapılan B1, B2, B3 ve B4 besiyerlerinin kallus oluşturma yüzdeleri.



Şekil 4.11: Denemesi yapılan B1, B2, B3 ve B4 besi yerlerinde oluşan kallusların ortalama yaş ağırlıkları.



Şekil 4.12: Osmancık-97 ve Mevlütbey çeşitlerinde kallus teşviki için denenen B1, B2, B3 ve B4 besi yerlerinde kallus gelişimi.

Osmancık-97 ve Mevlütbey çeşidine ait embriyolardan kallus elde edilen besi yeri içerikleri 2,4-D ve kinetin konsantrasyonları değiştirilerek MS bazal tuzları ile tekrar edilmiştir. Ayrıca çimlendirilmiş çeltik fideciklerine ait farklı bitki segmentlerinden elde edilen eksplantlar kullanılarak kallus eldesi denenmiştir. MS1 – MS15 besi yerlerine ekilen Osmancık-97 ve Mevlütbey çeşitlerinin kallus sonuçları Tablo 4.8 ve 4.9’da sunulmuştur.

Tablo 4.8: Osmancık-97 çeltik çeşidinin farklı bitki segmentlerinden kurulan denemelerin kallus oluşum sayı ve yüzdeleri.

Besin Yeri Kodu	Osmancık-97					
	Eksplant Sayısı	Kallus Sayısı	Kallus (%)	Eksplant Sayısı	Kallus Sayısı	Kallus (%)
	(Segment 1-2)			(Segment 3-4-5)		
MS1	6	1	16,7	9	0	0
MS2	6	2	33,3	9	0	0
MS3	6	0	0,0	9	0	0
MS4	6	3	50,0	9	0	0
MS5	6	1	16,7	9	0	0
MS6	6	0	0,0	9	0	0
MS7	6	0	0,0	9	0	0
MS8	6	2	33,3	9	0	0
MS9	6	0	0,0	9	0	0
MS10	6	3	50,0	9	0	0
MS11	6	1	16,7	9	0	0
MS12	6	2	33,3	9	0	0
MS13	6	4	66,7	9	0	0
MS14	6	0	0,0	9	0	0
MS15	6	1	16,7	9	0	0

Tablo 4.9: Mevlütbey çeltik çeşidinin farklı bitki segmentlerinden kurulan denemelerin kallus oluşum sayı ve yüzdeleri.

Besin Yeri Kodu	Mevlütbey					
	Eksplant Sayısı	Kallus Sayısı	Kallus (%)	Eksplant Sayısı	Kallus Sayısı	Kallus (%)
	(Segment 1-2)			(Segment 3-4-5)		
MS1	6	0	0,0	9	0	0
MS2	6	1	16,7	9	0	0
MS3	6	1	16,7	9	0	0
MS4	6	3	50,0	9	0	0
MS5	6	1	16,7	9	0	0
MS6	6	1	16,7	9	0	0
MS7	6	0	0,0	9	0	0
MS8	6	1	16,7	9	0	0
MS9	6	0	0,0	9	0	0
MS10	6	3	50,0	9	0	0
MS11	6	0	0,0	9	0	0
MS12	6	2	33,3	9	0	0
MS13	6	3	50,0	9	0	0
MS14	6	1	16,7	9	0	0
MS15	6	0	0,0	9	0	0

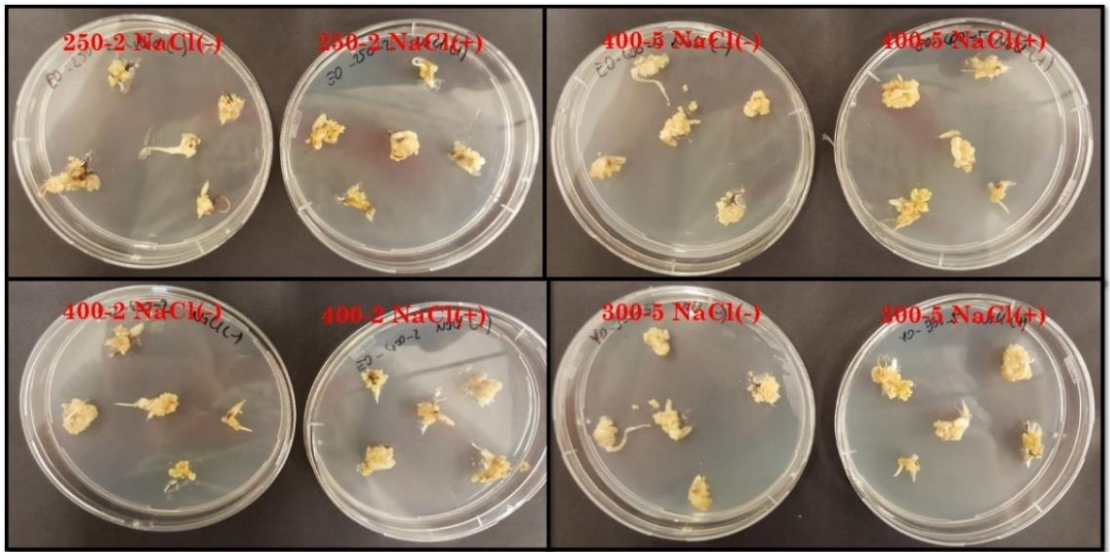
Osmancık-97 ve Mevlütbey çeşitlerine ait 1. ve 2. yaprak segmentlerinin MS4, MS10 ve MS13 kodlu besi yerlerine ekilmesi ile % 50 oranında kallus gelişimi elde edilirken, 3., 4. ve 5. segmentlerle kurulan hiçbir denemede kallus elde edilememiştir.

4.6. İN VİVO KOŞULLARDA BELİRLENEN 150 mM NaCl TOLERANSLI MUTANTLARIN İN VİTRO KONTROLÜ

150 mM NaCl toleransı gösteren M₃ generasyonu mutantlarına ait tohumlarda M₄ generasyonunda, tuzluluğa toleransın devam edip etmediğinin kontrol edilmesi için İstanbul Kültür Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Bitki Doku Kültürü Laboratuvarı'nda kurulan kallus kültürlerine ait yaş ağırlık yüzdeleri Tablo 4.10 ve Tablo 4.11'de sunulmuştur. 2015 ve 2016 yıllarında Osmancık-97 çeşidinden elde edilen 250-2, 300-5, 400-2 ve 400-5 mutantları, 150 mM NaCl içeren besi yeri ortamında NaCl içermeyen kontrollerine kıyasla % 100'den daha fazla yaş ağırlığa sahip kalluslar oluşturmuştur (Tablo 4.10 ve Şekil 4.13). Bu mutantlarda kallus yaş ağırlıkları tuz uygulanmamış kontrollerine göre sırasıyla % 103,2, 109,7, 100,9 ve 100,9 oranındadır.

Tablo 4.10: M₄ generasyonundaki Osmancık-97 mutantlarının 150 mM NaCl içeren besi yerlerinde geliştirdiği kallusların ortalama yaş ağırlık yüzdeleri.

2015 Seleksiyonu	Ortalama Kallus Yaş Ağırlık (%)		2016 Seleksiyonu	Ortalama Kallus Yaş Ağırlık (%)	
	Kontrol	150 mM NaCl		Kontrol	150 mM NaCl
250-1	100	19,1	250-1	100	18,7
250-2	100	20,0	250-2	100	103,2
250-3	100	18,3	250-3	100	19,8
250-4	100	18,3	250-4	100	19,2
250-5	100	18,8	250-5	100	16,6
250-6	100	78,7	300-1	100	29,8
250-7	100	34,4	300-2	100	28,5
300-1	100	16,9	300-3	100	78,3
300-10	100	14,7	300-4	100	14,0
300-2	100	33,1	300-5	100	109,7
300-3	100	15,2	300-6	100	18,3
300-4	100	19,6	400-1	100	19,7
300-5	100	16,3	400-10	100	16,8
300-6	100	75,7	400-2	100	17,5
300-7	100	94,0	400-3	100	16,8
300-8	100	25,7	400-4	100	16,2
300-9	100	14,4	400-5	100	100,9
400-1	100	27,9	400-6	100	18,4
400-2	100	100,9	400-7	100	18,8
400-3	100	19,4	400-8	100	95,4
400-4	100	33,7	400-9	100	18,9
400-5	100	95,4			

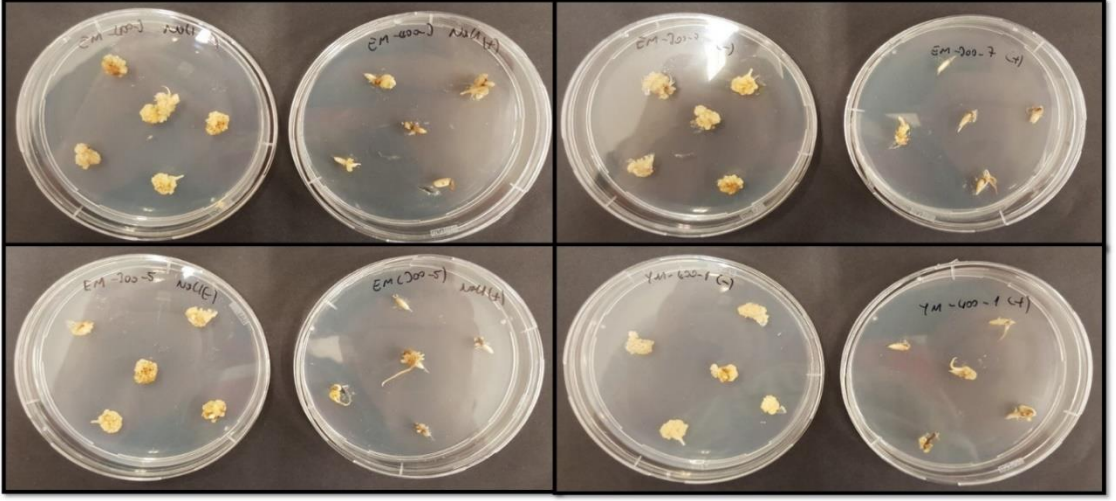


Şekil 4.13: 150 mM NaCl ve tuz içermeyen kontrol koşullarında Osmancık-97 mutantlarının kallus gelişimi (M₄ generasyonu).

Tablo 4.11: M₄ generasyonundaki Mevlütbey mutantlarının 150 mM NaCl içeren besi yerlerinde geliştirdiği kallusların ortalama yaş ağırlık yüzdeleri.

2015 Seleksiyonu	Ortalama Kallus Yaş Ağırlık (%)		2016 Seleksiyonu	Ortalama Kallus Yaş Ağırlık (%)	
	Kontrol	150 mM NaCl		Kontrol	150 mM NaCl
250-1	100	27,0	250-1	100	19,2
250-10	100	32,0	250-2	100	22,9
250-2	100	24,1	250-3	100	18,2
250-3	100	19,8	250-4	100	17,0
250-4	100	22,6	250-5	100	21,0
250-5	100	23,6	250-6	100	19,2
250-6	100	22,1	300-1	100	17,8
250-7	100	19,6	300-2	100	19,3
250-8	100	44,2	300-3	100	21,4
250-9	100	19,7	300-4	100	29,6
300-1	100	22,9	300-5	100	18,5
300-2	100	19,1	300-6	100	18,9
300-3	100	19,4	300-7	100	20,3
300-4	100	25,6	300-8	100	17,8
300-5	100	19,4	300-9	100	18,6
300-6	100	22,9	400-1	100	22,5
300-7	100	19,3	400-2	100	19,0
300-8	100	22,7	400-3	100	20,0
300-9	100	23,5	400-4	100	17,3
400-1	100	33,8	400-5	100	22,4
400-2	100	24,7	400-6	100	16,8
400-3	100	20,5			

Mevlütbey çeşidinden elde edilen mutantlar 150 mM NaCl uygulanmış besi yerlerine ekildiğinde, mutantların tamamında kallus yaş ağırlıkları stress uygulanmamış kontrolün altında kalmıştır (Tablo 4.9). En yüksek kallus oluşum yüzdesi % 44,2 ile 250-8 mutantında elde edilmiştir (Şekil 4.14).

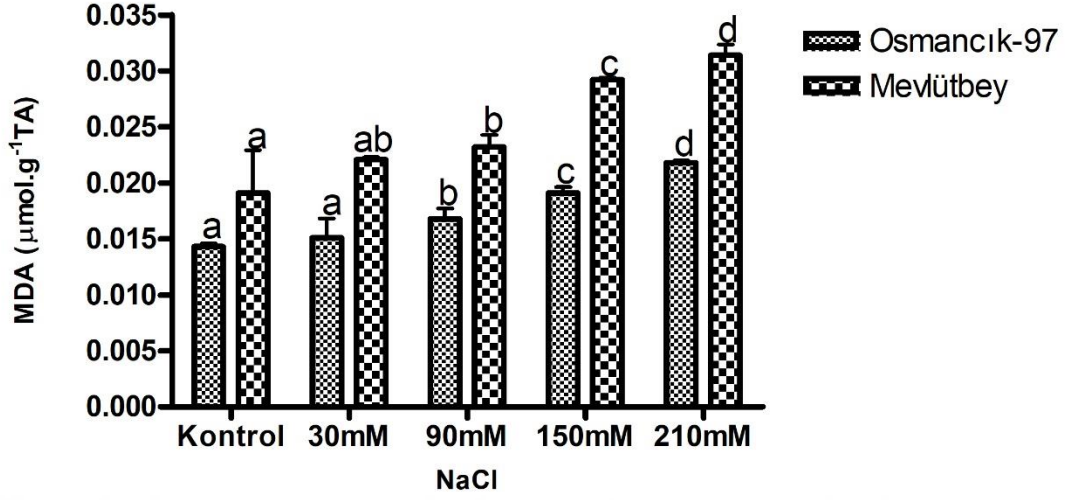


Şekil 4.14: 150 mM NaCl ve tuzsuz kontrol koşullarında Mevlütbey mutantlarının kallus gelişimi (M_4 generasyonu).

4.7. BİYOKİMYASAL ANALİZLER

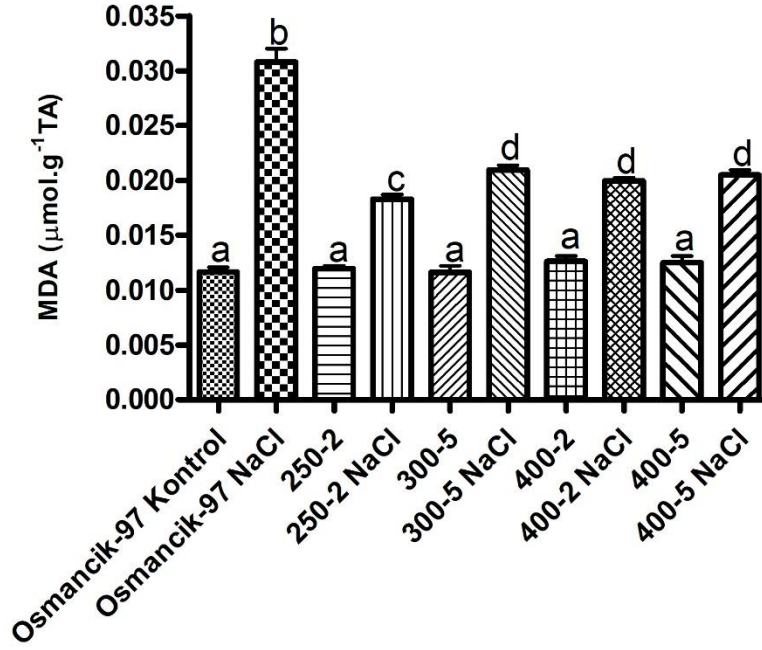
4.7.1. Lipid Peroksidasyon Analizi

Tuz stresinin Osmancık-97 ve Mevlütbey çeltik çeşitleri üzerindeki etkisi oksidatif stresin meydana getirdiği lipid peroksidasyonun ürünü olan malondialdehit (MDA) miktarlarının kolorimetrik olarak ölçülmesi ile saptanmıştır. Tuzluluğun meydana getirdiği oksidatif strese bağlı olarak her iki çeltik çeşidinde de konsantrasyona bağlı lipid peroksidasyon artışı tespit edilmiştir (Şekil 4.15). Uygulanan tüm tuz konsantrasyonlarında MDA miktarları Osmancık-97 ile karşılaştırıldığında Mevlütbey çeşidinde daha yüksek olduğu görülmüştür. Osmancık-97 çeşidine ait kontrollerde MDA miktarı $0,0143 \mu\text{mol.g}^{-1}\text{TA}$ iken, uygulanan en yüksek tuz konsantrasyonu olan 210 mM'da $0,0218 \mu\text{mol.g}^{-1}\text{TA}$ oranındadır. Mevlütbey çeşidine ait kontrol bitkilerinin MDA miktarı $0,0191 \mu\text{mol.g}^{-1}\text{TA}$ ile Osmancık-97'den yüksek bulunmuştur. Benzer şekilde 210 mM NaCl uygulamasının ardından bu oran $0,0314 \mu\text{mol.g}^{-1}\text{TA}$ ulaşmıştır.



Şekil 4.15: Tuz stresinin Osmancık-97 ve Mevlütbey çeltik çeşitleri MDA oranlarına etkisi. Farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklılıklar, 0.05 seviyesinde önemlidir.

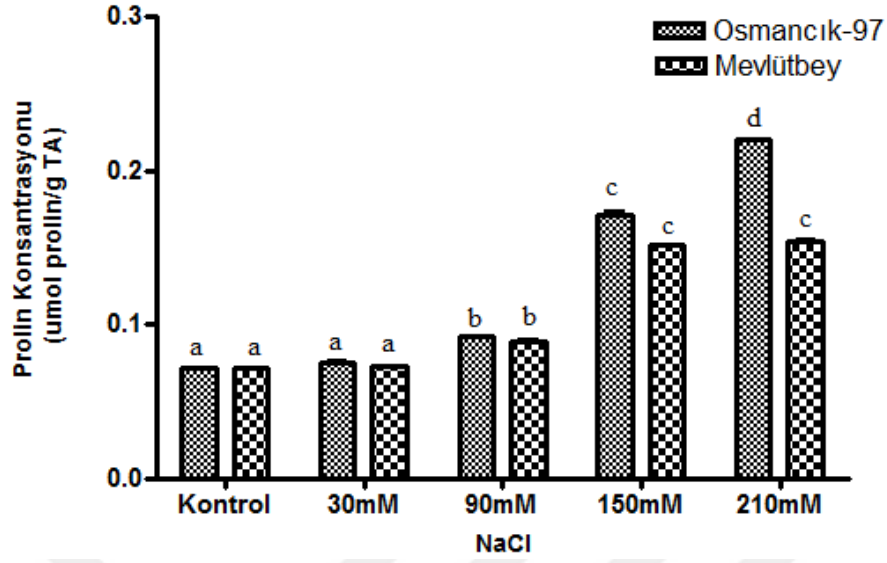
Tuz stresi uygulanmamış Osmancık-97 çeltik çeşidi ile bu çeşitten kökenlenen dört mutantta saptanan MDA oranları arasında istatistiksel bir fark bulunamamıştır. Lipid moleküllerinde oksidatif zararlanmaya paralel kontrollerde 0,0117 $\mu\text{mol.g}^{-1}\text{TA}$ seviyesinde bulunan lipid peroksidasyon, 150 mM NaCl stresi uygulanmış Osmancık-97 çeşidinde 0,0308 $\mu\text{mol.g}^{-1}\text{TA}$ olarak bulunmuştur. 150 mM NaCl uygulanmış mutantların tamamında lipid peroksidasyon, stres uygulanmamış kontrollerine göre artış göstermiştir. Ancak meydana gelen bu artışların stres uygulanmış Osmancık-97 çeşidinden daha düşük olduğu saptanmıştır ($P < 0,05$) (Şekil 4.16). Tuz stresi uygulanmış mutantlar arasında en yüksek lipid peroksidasyon 0,0209 $\mu\text{mol.g}^{-1}\text{TA}$ değeri ile 300-5 mutantında elde edilmiştir.



Şekil 4.16: Osmancık-97 çeltik çeşidi ve tuza toleranslı mutantların kontrol ve tuz stresi uygulanmış bitkilerine ait MDA oranlarında meydana gelen değişimler. Farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklılıklar, 0.05 seviyesinde önemlidir.

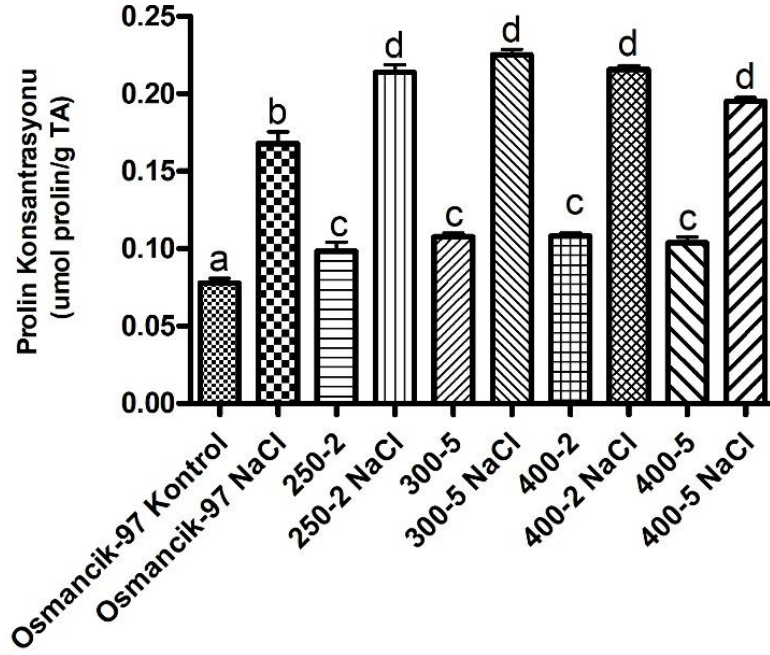
4.7.2. Prolin Konsantrasyonlarının Tayini

Oksidatif strese karşı koruyucu osmoprotektan rolü olan prolinin konsantrasyonlarındaki değişiklikler Bates ve diğ. (1973) metoduna göre tespit edilmiştir. Her iki çeltik çeşidinde de 90 mM NaCl konsantrasyonunda kontrole göre artış görülür. Osmancık-97 çeşidinde ait kontrol bitkilerinde prolin konsantrasyonu 0,0718 μmol prolin/g.TA iken, Mevlütbey çeşidinde 0,0717 μmol prolin/g.TA olarak bulunmuştur. Prolin konsantrasyonları her iki çeşitte de en yüksek değerlere 210 mM NaCl konsantrasyonunda ulaşmış olup, değerler Osmancık-97 ve Mevlütbey için sırasıyla 0,220 ve 0,154 μmol prolin/g.TA olarak saptanmıştır (Şekil 4.17).



Şekil 4.17: Tuz stresinin Osmancık-97 ve Mevlütbey çeltik çeşitlerinde prolin konsantrasyonları üzerine etkileri. Farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklılıklar, 0.05 seviyesinde önemlidir.

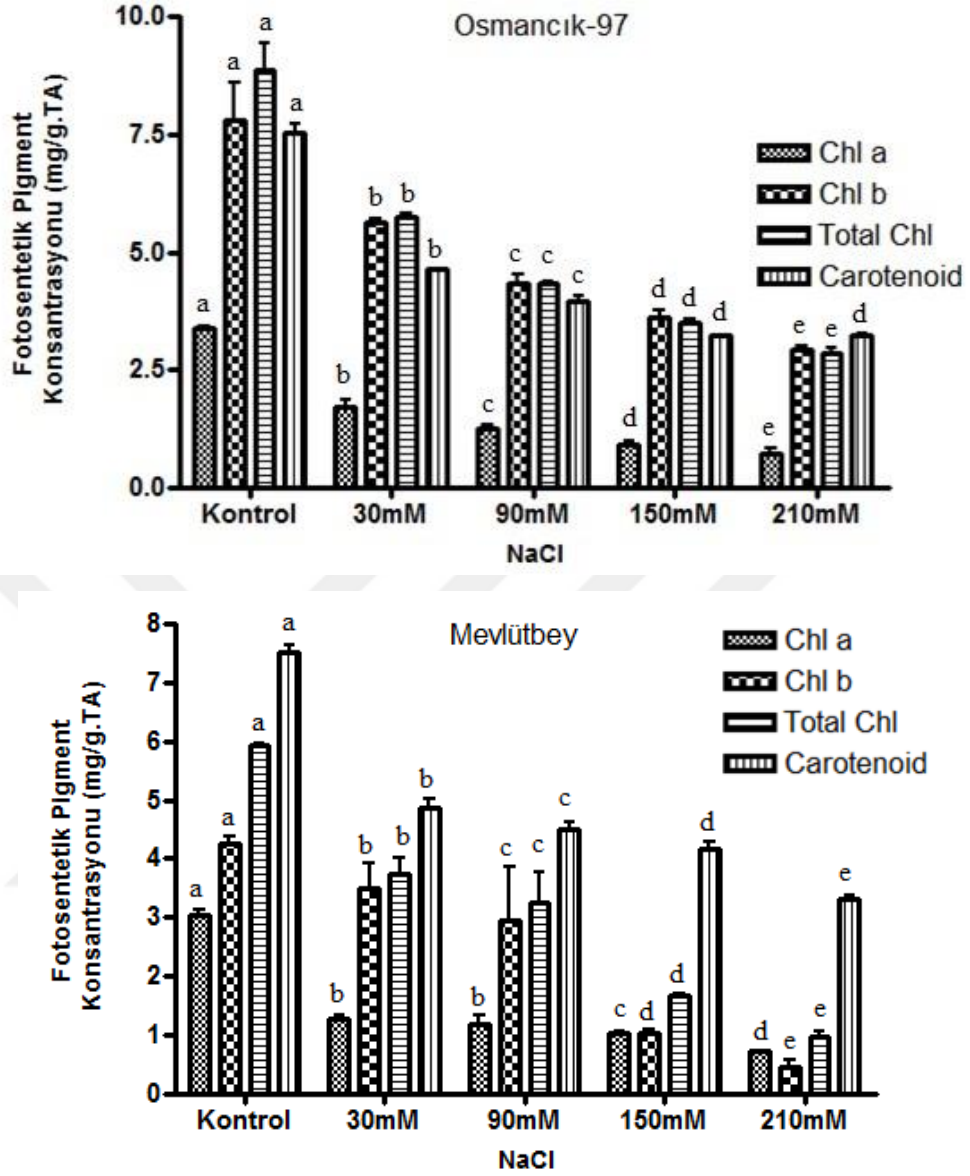
Osmancık-97 kökenli mutantlarda 150 mM NaCl stresi uygulanmasının ardından kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı seviyelerde prolin artışı saptanmıştır (Şekil 4.18). Stres uygulanmayan mutant çeşitlerin tamamında prolin konsantrasyonları, stres uygulanmamış Osmancık-97 çeşidine göre yüksek bulunmuştur. Stres uygulanmamış mutantlar arasında en yüksek prolin miktarı 0,108 µmol prolin/g.TA ile 300-5 mutantında bulunmuştur. 150 mM NaCl uygulaması ardından seçilen tüm mutantların prolin konsantrasyonları, tuz stresi uygulanmamış kontrollerine göre ve stres uygulanmış Osmancık-97 çeşidine göre önemli artışlar göstermiştir ($P < 0.05$).



Şekil 4.18: Osmancik-97 çeşidi ve mutant çeltiklerine ait kontrol ve tuz uygulanmış bitkilerine ait prolin konsantrasyonlarında meydana gelen değişimler. Farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklılıklar, 0.05 seviyesinde önemlidir.

4.7.3. Fotosentetik Pigment Miktarı Tayini

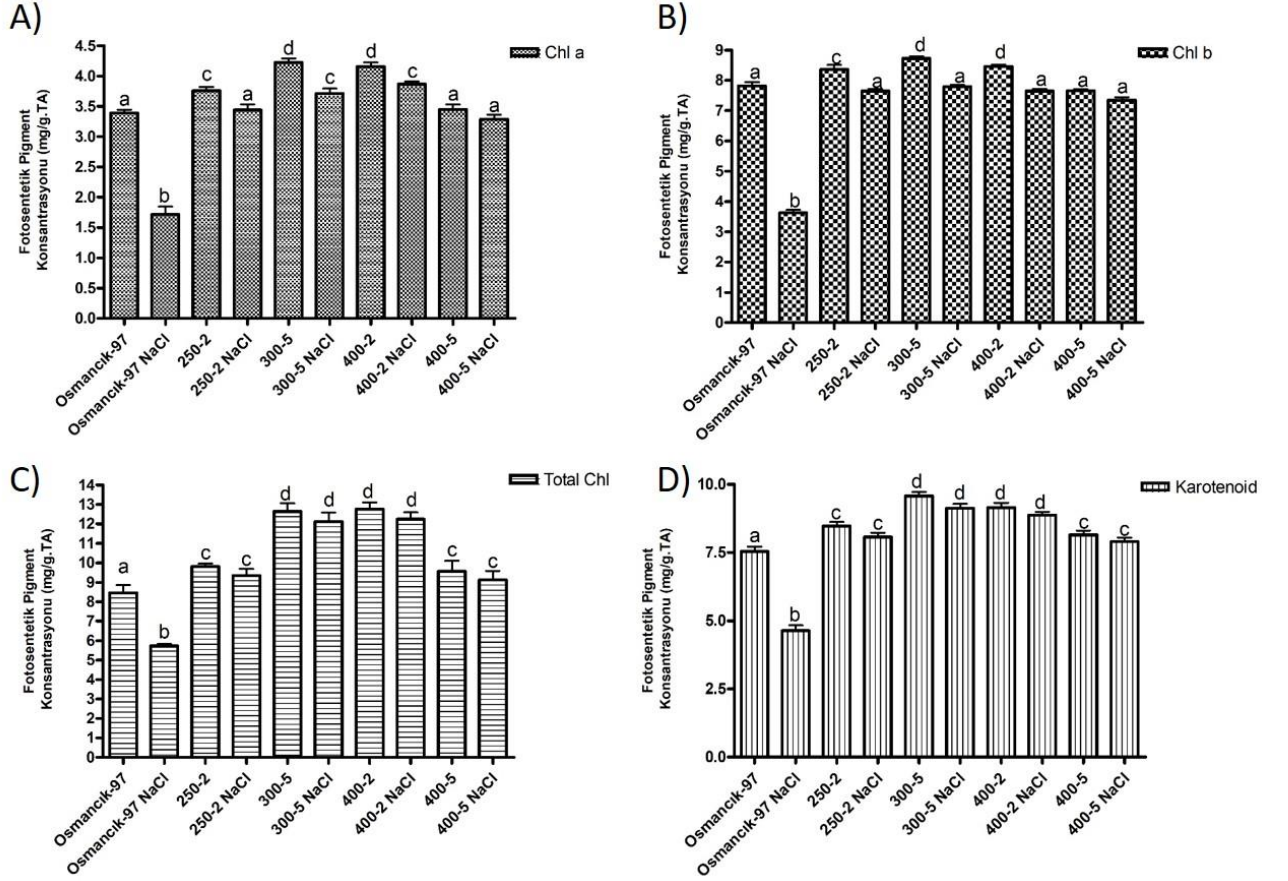
Tuz stresinin Osmancik-97 ve Mevlütbey çeltik çeşitleri fotosentetik pigment miktarları üzerine etkileri spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. NaCl konsantrasyonundaki artışa paralel olarak tüm klorofil a, klorofil b, total klorofil ve karotenoid konsantrasyonlarında azalma tespit edilmiştir (Şekil 4.19). Pigment konsantrasyonlarındaki azalma her iki çeşitte de en fazla 210 mM NaCl konsantrasyonu uygulanan deney gruplarında bulunmuştur.



Şekil 4.19: Tuz stresinin Osmancık-97 ve Mevlütbey çeltik çeşitlerinde fotosentetik pigment konsantrasyonları üzerine etkileri. Farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklılıklar, 0.05 seviyesinde önemlidir.

Osmancık-97 çeltik çeşidi ve bu çeşitten elde edilen tuza toleranslı mutantlarda 150 mM NaCl uygulaması sonrasında fotosentetik pigment konsantrasyonları belirlenmiştir (Şekil 4.20). Osmancık-97 çeşidinde, klorofil a, klorofil b, total klorofil ve karotenoid konsantrasyonları tuz uygulaması ile istatistiksel olarak anlamlı azalma göstermiştir. Mutant bitkilerin tamamında fotosentetik pigment konsantrasyonları Osmancık-97 çeşidinden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur. Tuz uygulamasının ardından mutant bitkilerde kendi

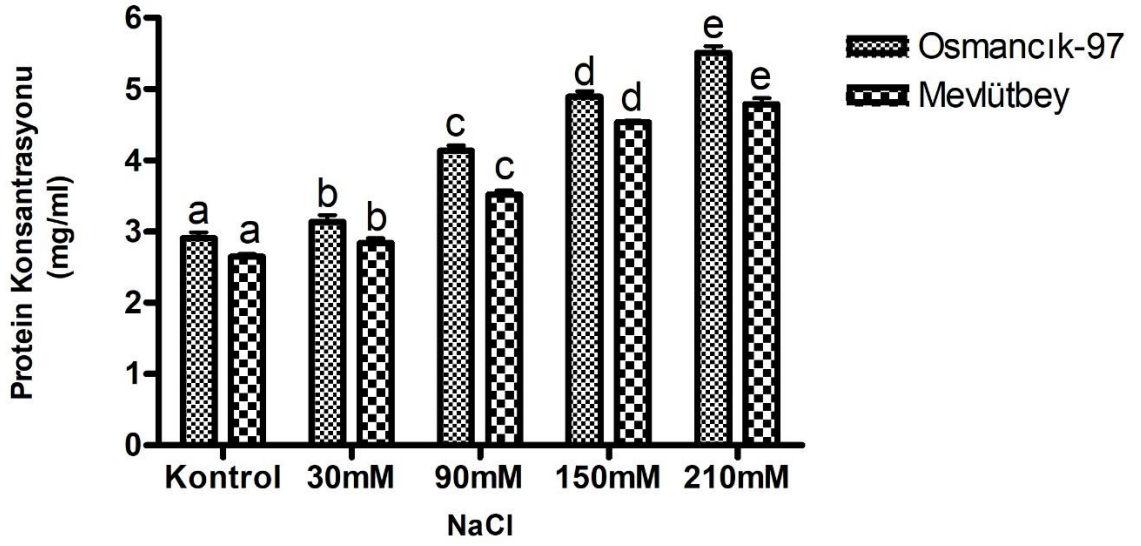
kontrollerine göre azalma görülse de, tuz stresi uygulanan tüm mutantların fotosentetik pigment konsantrasyonları stres uygulanmamış Osmancık-97 çeşidinden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur.



Şekil 4.20: Tuz stresinin Osmancık-97 çeşidi ve 250-2, 300-5, 400-2, 400-5 mutantları A) klorofil a, B) klorofil b, C) total klorofil ve D) karotenoid pigment konsantrasyonları üzerine etkisi. Farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklılıklar, 0.05 seviyesinde önemlidir.

4.7.4. Total Protein Konsantrasyonu Tayini

Tuz stresinin Osmancık-97 ve Mevlütbey çeltik çeşitleri total protein konsantrasyonları üzerine etkileri spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. NaCl konsantrasyonundaki artışa paralel olarak tüm deney gruplarında total protein konsantrasyonlarında istatistiksel olarak anlamlı artış tespit edilmiştir (Şekil 4.21).

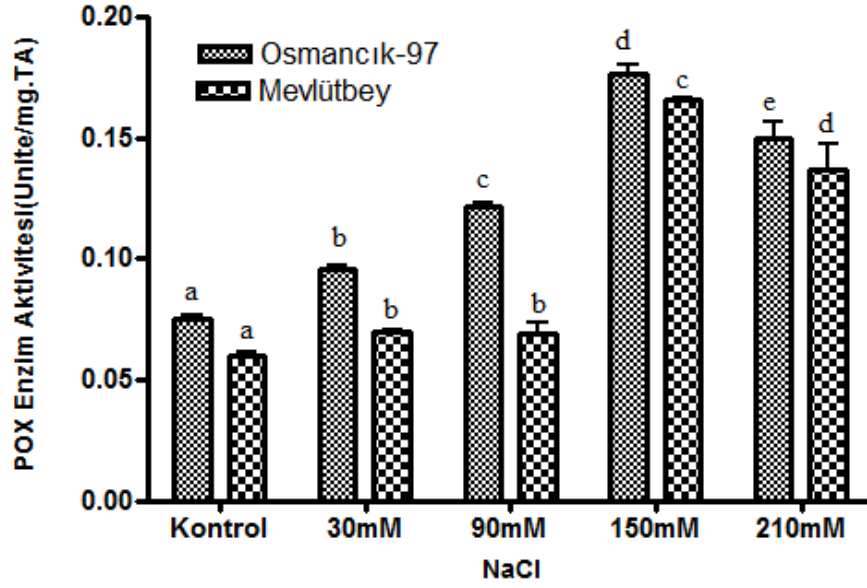


Şekil 4.21: Tuz stresinin Osmancık-97 ve Mevlütbey çeltik çeşitlerinde total protein konsantrasyonları üzerine etkileri. Farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklılıklar, 0.05 seviyesinde önemlidir.

Tuz stresi uygulanmamış Osmancık-97 ve Mevlütbey çeşitlerinde protein konsantrasyonları sırasıyla 2,926 ve 2,812 mg/mL olarak bulunmuştur. Uygulanan en yüksek tuz konsantrasyonu olan 210 mM’da değerlendirilen çeltik çeşitlerinin protein konsantrasyonları sırasıyla 5,794 ve 5,012 mg/mL seviyelerine kadar yükselmiştir.

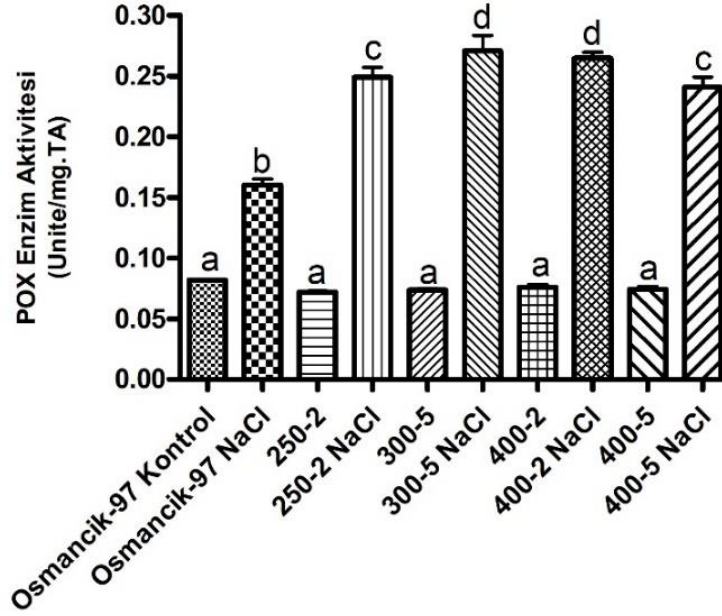
4.7.5. Peroksidaz Enzim Aktivitesi Tayini

Osmancık-97 çeşidinde 150 mM NaCl konsantrasyonuna kadar olan tuz stresi peroksidaz enzim aktivitesinde artışa sebep olmuştur (Şekil 4.22). Kontrol bitkilerinde 0,075 U/mg.TA seviyesinde olan peroksidaz aktivitesi, 150 mM NaCl uygulanmış bitkilerde 0,177 U/mg.TA seviyesine yükselmiştir. 210 mM NaCl uygulamasının ardından aktivite, kontrole ve diğer tuz uygulamalarına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksektir. Ancak saptanan peroksidaz aktivitesi 150 mM uygulanan bitkilere göre bir azalma göstermiştir. Mevlütbey çeşidi peroksidaz enzim aktivitesi tüm tuz uygulamalarında Osmancık-97 çeşidinin altında aktivite değerleri göstermiştir. Tuz uygulanmamış kontrol bitkilerinde 0,060 U/mg.TA olan enzim aktivitesi, 150 mM tuz uygulamasında 0,166 U/mg.TA seviyesine artmıştır. 210 mM NaCl uygulamasında ise Osmancık-97 çeşidine benzer olarak istatistiksel bakımdan anlamlı bir azalma göstermiştir (Şekil 4.22).



Şekil 4.22: Tuz stresinin Osmancık-97 ve Mevlütbey çeltik çeşitlerinde peroksidaz enzim aktivitesi. Farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklılıklar, 0.05 seviyesinde önemlidir.

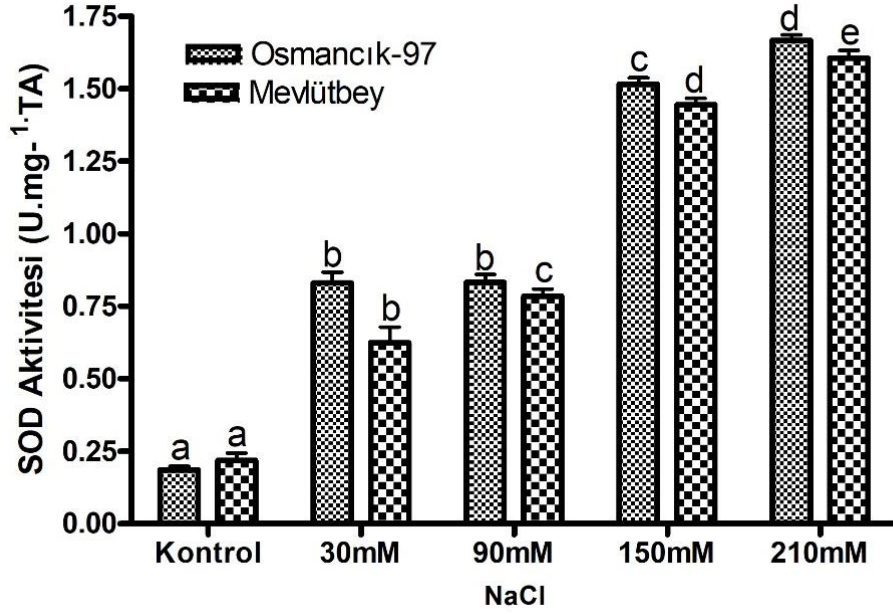
Osmancık-97 çeşidi kontrolü ile bu çeşitten kökenlenen mutantların tuz uygulanmamış kontrolleri ile arasında peroksidaz enzim aktivitesi bakımından istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmemiştir (Şekil 4.23). 150 mM NaCl stresi uygulanan dört mutantın peroksidaz enzim aktivitesi, tuz stresi uygulanmamış kontrollerine göre ve stres uygulanmış Osmancık-97 çeşidine göre istatistiksel olarak önemli artışlar göstermiştir ($P < 0.05$). Mutantlar arasında en yüksek peroksidaz aktiviteleri 0,271 ve 0,265 U/mg.TA değerleri ile 300-5 ve 400-2 mutantlarından elde edilmiştir.



Şekil 4.23: Osmancık-97 ve mutant çeltik çeşitlerinin kontrol ve tuz uygulanmış bitkilerine ait peroksidaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişimler. Farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklılıklar, 0.05 seviyesinde önemlidir.

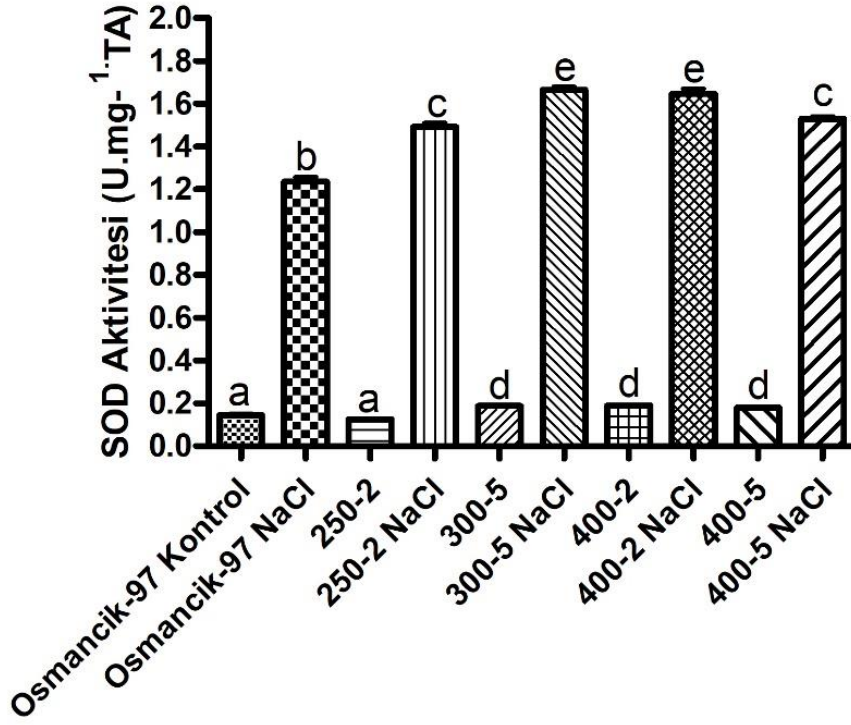
4.7.6. Superoksit Dismutaz Enzim Aktivitesi Tayini

Superoksit dismutaz enzim aktivitesi bakımından Osmancık-97 ve Mevlütbey çeltik çeşitlerinin her ikisi üzerinde de uygulanan tuz stresi, tüm NaCl konsantrasyonlarında kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı artışlara sebep olmuştur (Şekil 4.24). Tuz stresi uygulanmamış Osmancık-97 kontrol bitkilerinde superoksit dismutaz aktivitesi % 9,23 seviyesindeyken, 210 mM NaCl uygulanan bitkilerde % 83,38 seviyesine çıkmıştır (Şekil 4.24). Mevlütbey çeltik çeşidinde tuz uygulanmamış kontrol bitkilerinde SOD aktivitesi % 10,89 seviyesindeyken, 210 mM NaCl uygulanan bitkilerde SOD aktivitesi % 80,32 seviyesine yükselmiştir.



Şekil 4.24: Tuz stresinin Osmancık-97 ve Mevlütbey çeltik çeşitlerinde superoksit dismutaz enzim aktivitesi üzerine etkileri. Farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklılıklar, 0.05 seviyesinde önemlidir.

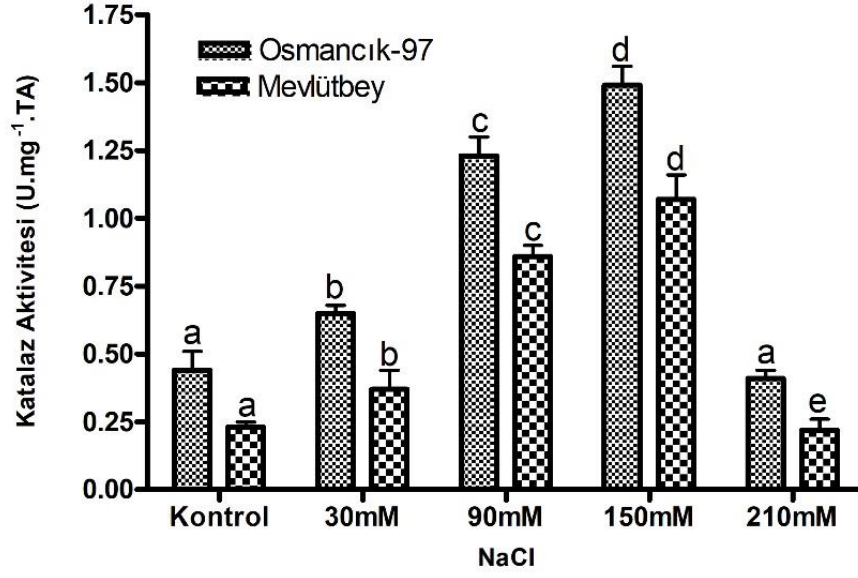
SOD aktivitesi tuz stresi uygulanmamış Osmancık-97 kontrol bitkilerinde % 7,16 seviyesindeyken, 150 mM NaCl uygulaması ile % 61,81 seviyesine yükselmiştir (Şekil 4.25). Tuz stresi uygulanmamış 300-5, 400-2 ve 400-5 mutantları arasındaki SOD aktiviteleri farkı istatistiksel bakımdan anlam içermezken ($P > 0,05$), Osmancık-97 ve 250-2 mutantının SOD aktivite değerlerine göre anlamlı bulunmuştur. 150 mM NaCl uygulaması ile en yüksek SOD aktivitesi 300-5 mutantında elde edilmiştir. Tuz mutantlarının tuz stresi uygulanmamış kontrolleri ile aralarında SOD aktivitelerinde bir artış vardır ve bu artış istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0,05$).



Şekil 4.25: Osmancık-97 ve mutant çeltik çeşitlerinin kontrol ve tuz uygulanmış bitkilerine ait superoksit dismutaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişimler. Farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklılıklar, 0.05 seviyesinde önemlidir.

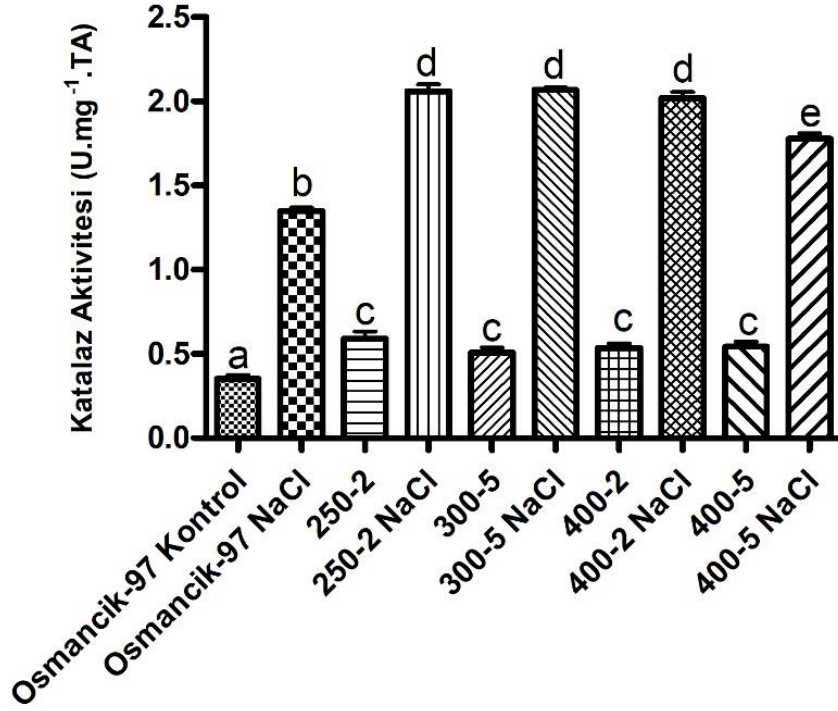
4.7.7. Katalaz Enzim Aktivitesi Tayini

Tuz stresi, Osmancık-97 çeşidinde 150 mM NaCl konsantrasyonuna kadar katalaz enzim aktivitesinde artışa sebep olmuştur. Kontrol bitkilerinde 17,16 U.mg⁻¹.TA seviyesinde olan katalaz aktivitesi, 150 mM NaCl uygulanmış bitkilerde 58,74 U.mg⁻¹.TA seviyesine yükselmiştir. 210 mM NaCl uygulamasının ardından aktivite, kontrole seviyesine kadar azalma göstermiştir. Mevlütbey çeşidinde katalaz enzimi tüm tuz uygulamalarında Osmancık-97 çeşidinin altında aktivite değerleri göstermiştir. Tuz uygulanmamış kontrol bitkilerinde 8,95 U.mg⁻¹.TA olan enzim aktivitesi, 150 mM tuz uygulamasıyla, 42,20 U.mg⁻¹.TA seviyesine artmıştır. 210 mM NaCl uygulamasında Osmancık-97 çeşidinde olduğu gibi, 150 mM'daki aktivite değerine göre istatistiksel olarak anlamlı azalma görülmüştür (Şekil 4.26).



Şekil 4.26: Tuz stresinin Osmancık-97 ve Mevlütbey çeltik çeşitlerinde katalaz enzim aktivitesi üzerine etkileri. Farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklılıklar, 0.05 seviyesinde önemlidir.

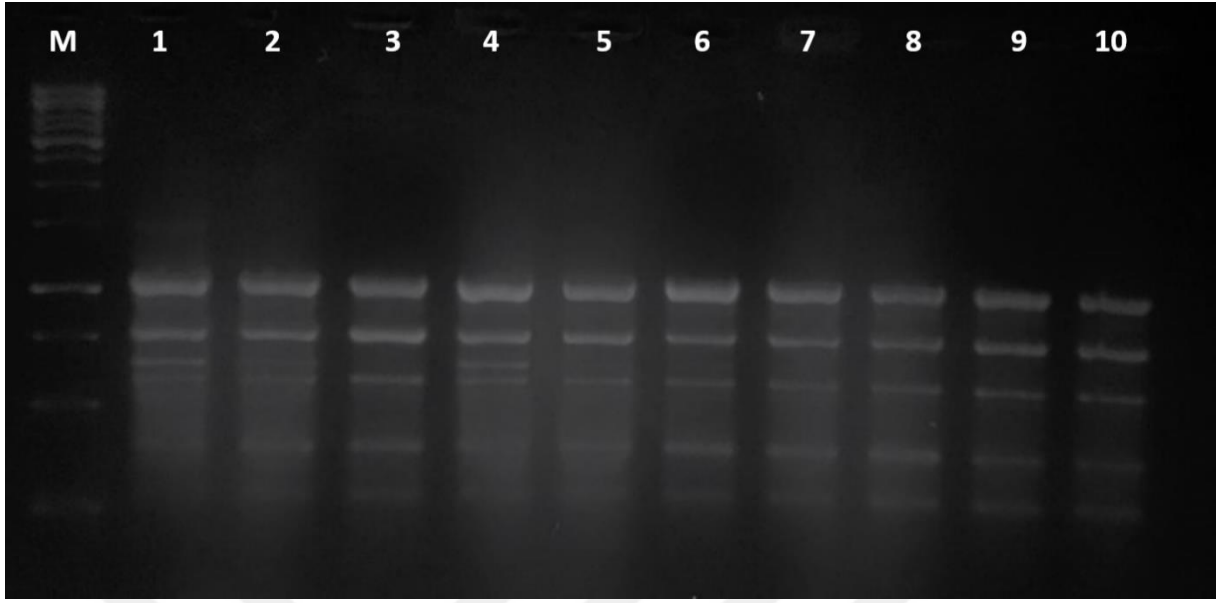
Osmancık-97 çeşidinden kökenlenen mutantların tuz uygulanmamış kontrolleri ile Osmancık-97 çeşidi kontrolleri arasında katalaz enzim aktivitesi bakımından istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmiştir (Şekil 4.27). 150 mM NaCl stresi uygulanan dört mutantın katalaz enzim aktivitesi, tuz stresi uygulanmamış kontrollerine göre ve stres uygulanmış Osmancık-97 çeşidine göre istatistiksel olarak önemli artışlar göstermiştir ($P < 0.05$). Mutantlar arasında en yüksek katalaz aktivitesi $82,37 \text{ U.mg}^{-1}.\text{TA}$ değeri ile 300-5 mutantında elde edilmiştir.



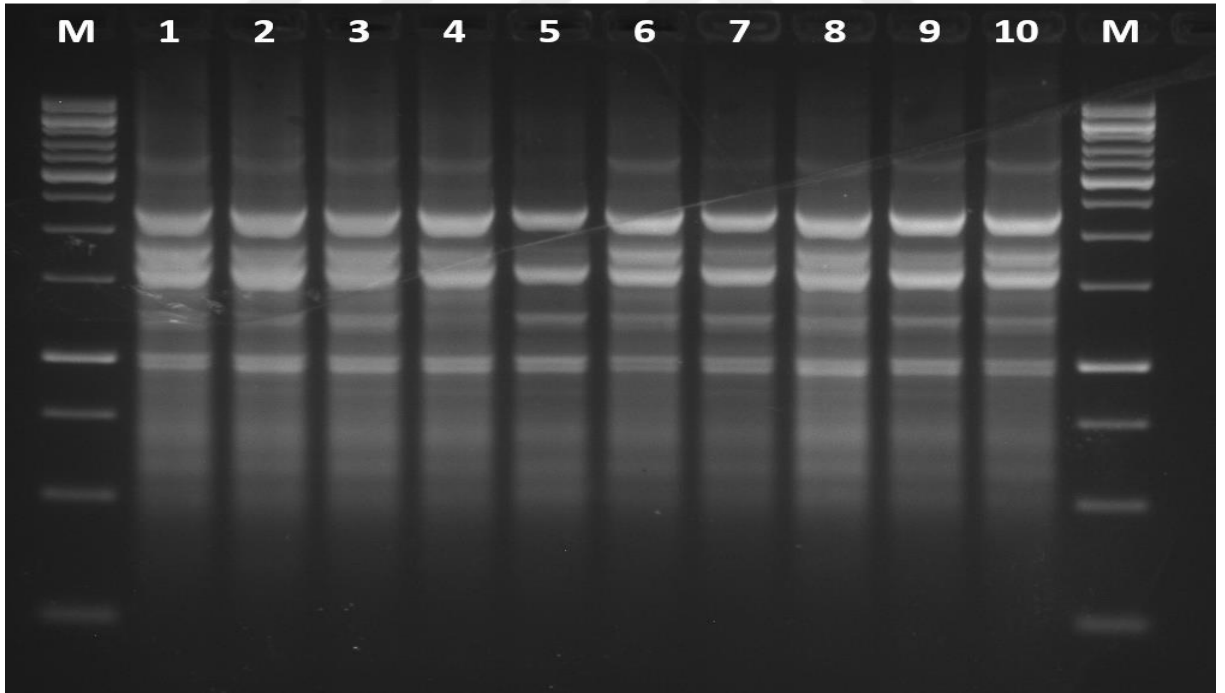
Şekil 4.27: Osmancık-97 ve mutant çeltik çeşitlerinin kontrol ve tuz uygulanmış bitkilerine ait katalaz enzim aktivitesinde meydana gelen değişimler. Farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklılıklar, 0.05 seviyesinde önemlidir.

4.8. ISSR (BASİT DİZİ TEKRARLARI ARASI POLİMORFİZM) YÖNTEMİ İLE POLİMORFİZMİN BELİRLENMESİ

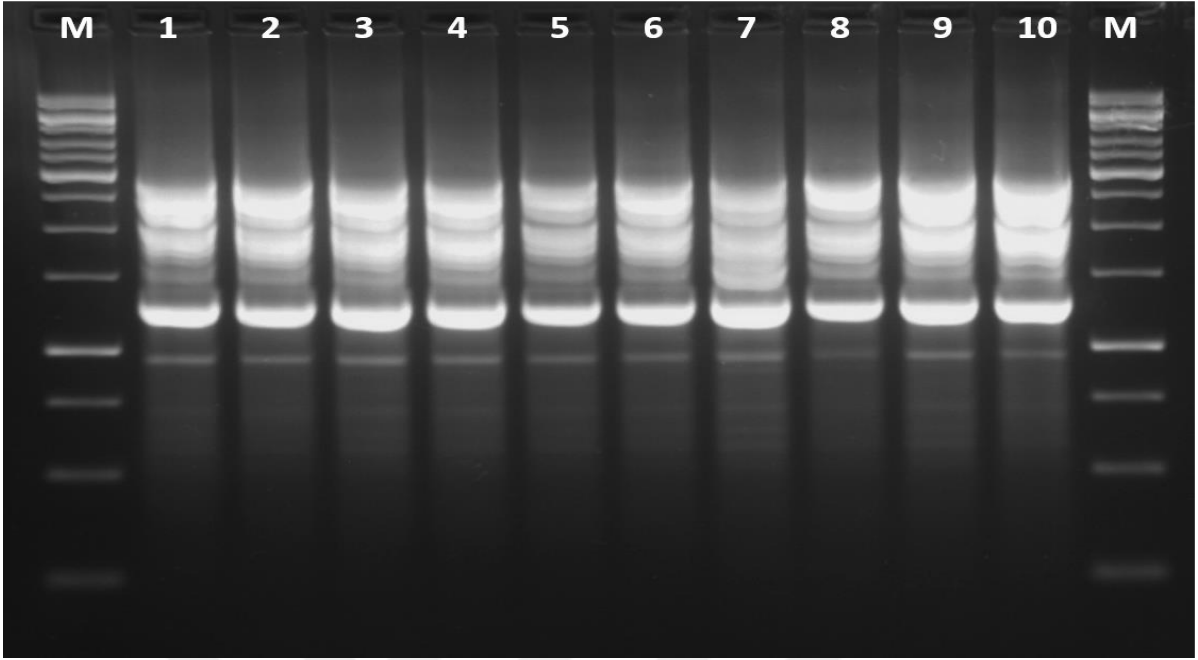
Çalışmamızda 150 mM NaCl uygulanmış ve uygulanmamış Osmancık-97 ve bu çeşitten kökenlenen 4 mutanttan elde edilen genomik DNA'lar kullanılarak ISSR primerleri ile PZR gerçekleştirilerek bant profilleri elde edilmiştir (Şekil 4.29 – 4.40). Çalışılan 12 primerden toplam 114 bant fragmanı elde edilmiş olup bu fragmanlarının 17 tanesi (% 14,9) polimorfik bulunmuştur (Tablo 4.12). En fazla total bant veren primer 16 bant ile UBC825 olurken, en az bant 6'şar bant ile UBC808 ve UBC864 primerlerinde elde edilmiştir. En fazla polimorfik bant UBC873'te elde edilmiş olup, UBC812 ve UBC864 primerlerinde tüm bantlar monomorfik bulunmuştur. Çalışmada NTSYS PC 2.0 paket programı ile üretilen genetik benzerlik matrisinden (Tablo 4.13) yararlanarak dendogram elde edilmiştir (Şekil 4.28). Oluşan dendogram sonucunda Osmancık-97 ve dört mutant arasındaki genetik ilişki Jaccard benzerlik katsayısına göre 0,3 ve 0,94 arasında bulunmuştur.



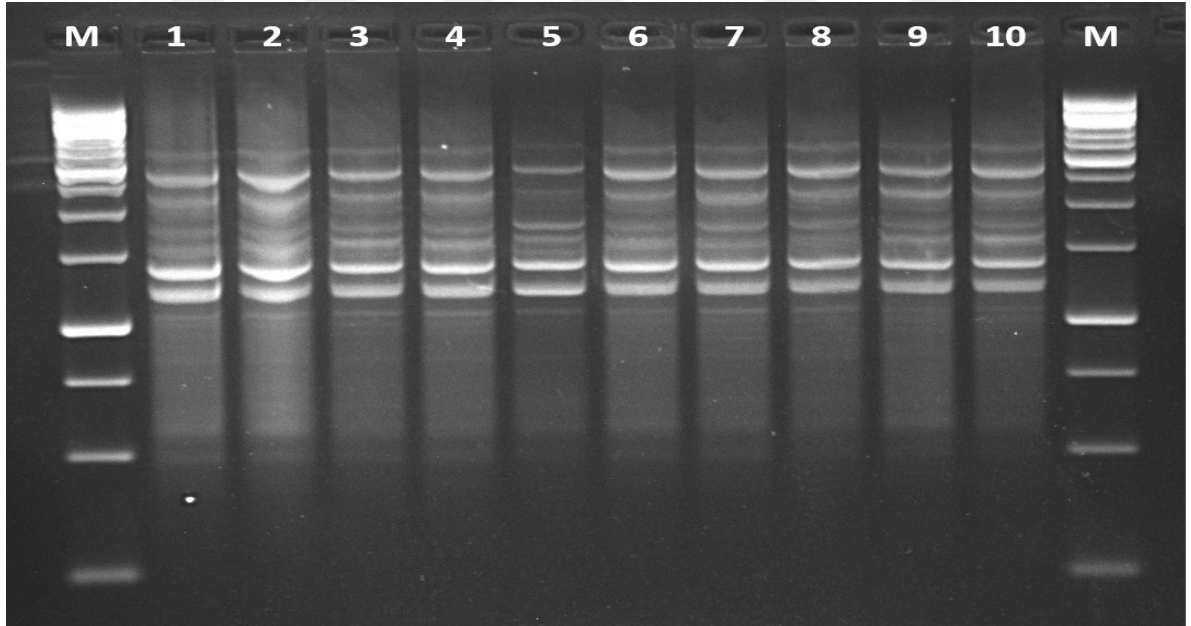
Şekil 4.28: UBC808 ISSR primeri bant profili. M: Markör; 1: Osmancık-97 Kontrol; 2: Osmancık-97 150 mM NaCl; 3: EO-250-2 Kontrol; 4: EO-250-2 150 mM NaCl; 5: EO-300-5 Kontrol; 6: EO-300-5 150 mM NaCl; 7: YO-400-2 Kontrol; 8: YO-400-2 150 mM NaCl; 9: EO-400-5 Kontrol; 10: EO-400-5 150 mM NaCl.



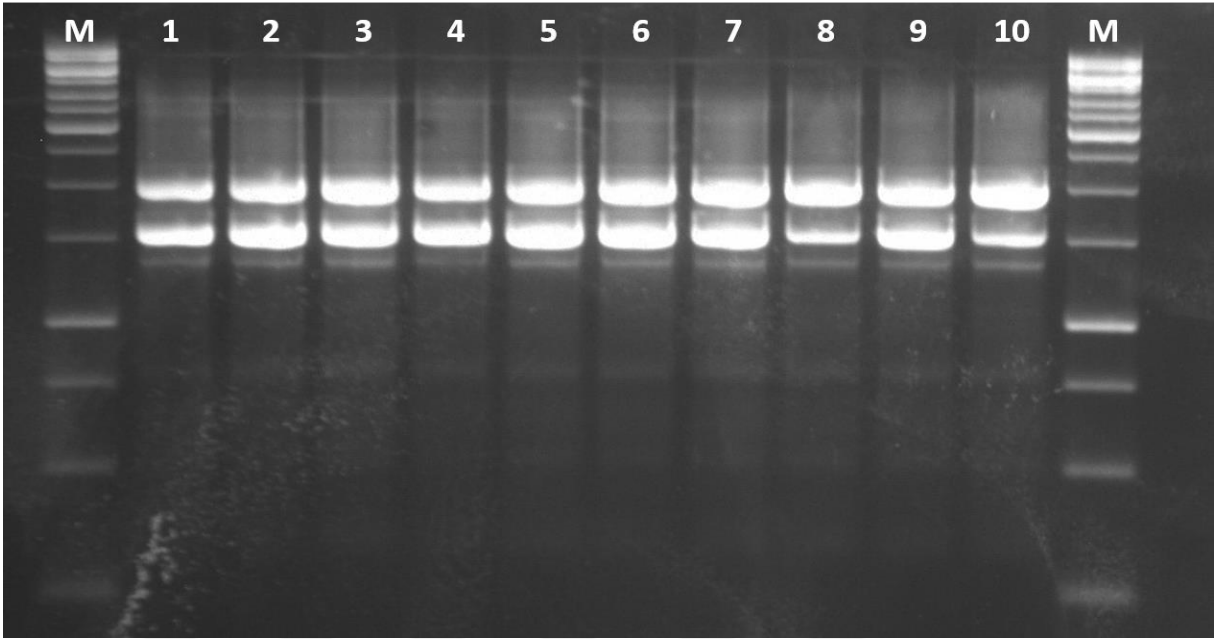
Şekil 4.29: UBC810 ISSR primeri bant profili. M: Markör; 1: Osmancık-97 Kontrol; 2: Osmancık-97 150 mM NaCl; 3: EO-250-2 Kontrol; 4: EO-250-2 150 mM NaCl; 5: EO-300-5 Kontrol; 6: EO-300-5 150 mM NaCl; 7: YO-400-2 Kontrol; 8: YO-400-2 150 mM NaCl; 9: EO-400-5 Kontrol; 10: EO-400-5 150 mM NaCl.



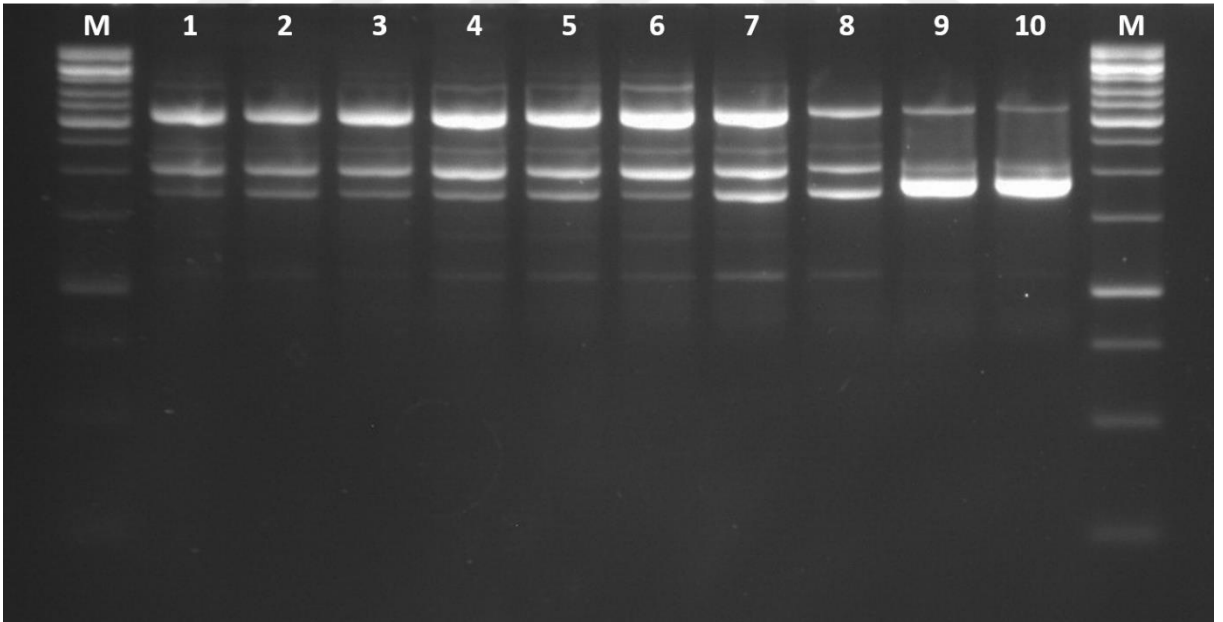
Şekil 4.30: UBC811 ISSR primeri bant profili. M: Markör; 1: Osmancık-97 Kontrol; 2: Osmancık-97 150 mM NaCl; 3: EO-250-2 Kontrol; 4: EO-250-2 150 mM NaCl; 5: EO-300-5 Kontrol; 6: EO-300-5 150 mM NaCl; 7: YO-400-2 Kontrol; 8: YO-400-2 150 mM NaCl; 9: EO-400-5 Kontrol; 10: EO-400-5 150 mM NaCl.



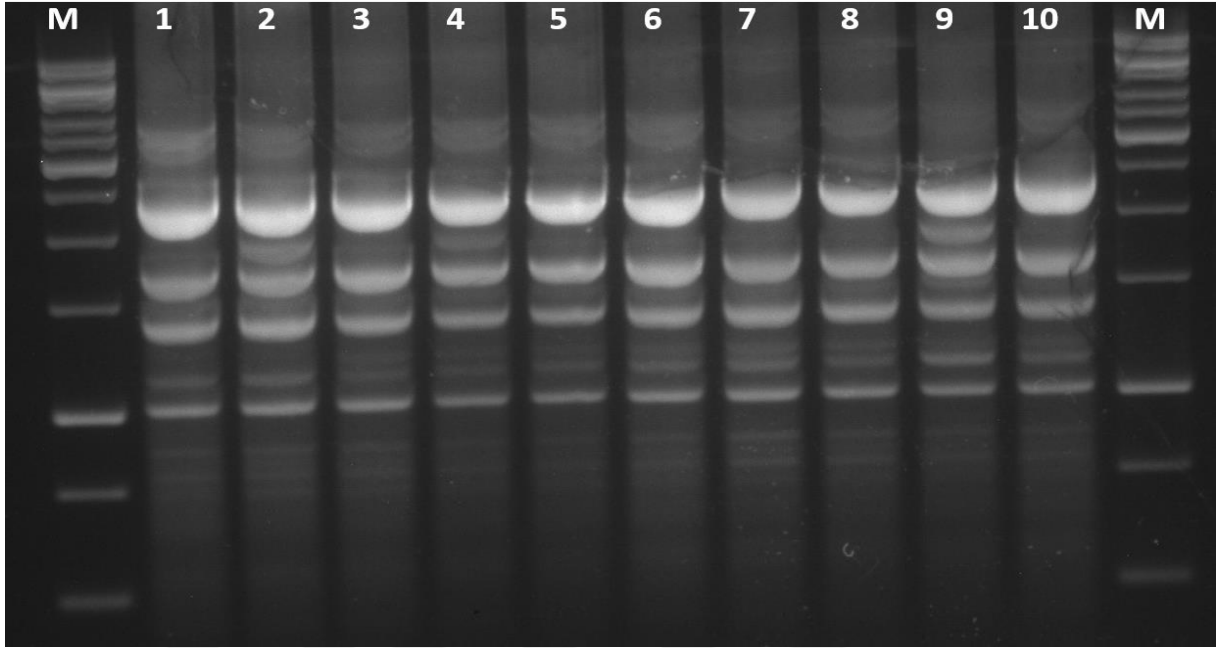
Şekil 4.31: UBC812 ISSR primeri bant profili. M: Markör; 1: Osmancık-97 Kontrol; 2: Osmancık-97 150 mM NaCl; 3: EO-250-2 Kontrol; 4: EO-250-2 150 mM NaCl; 5: EO-300-5 Kontrol; 6: EO-300-5 150 mM NaCl; 7: YO-400-2 Kontrol; 8: YO-400-2 150 mM NaCl; 9: EO-400-5 Kontrol; 10: EO-400-5 150 mM NaCl.



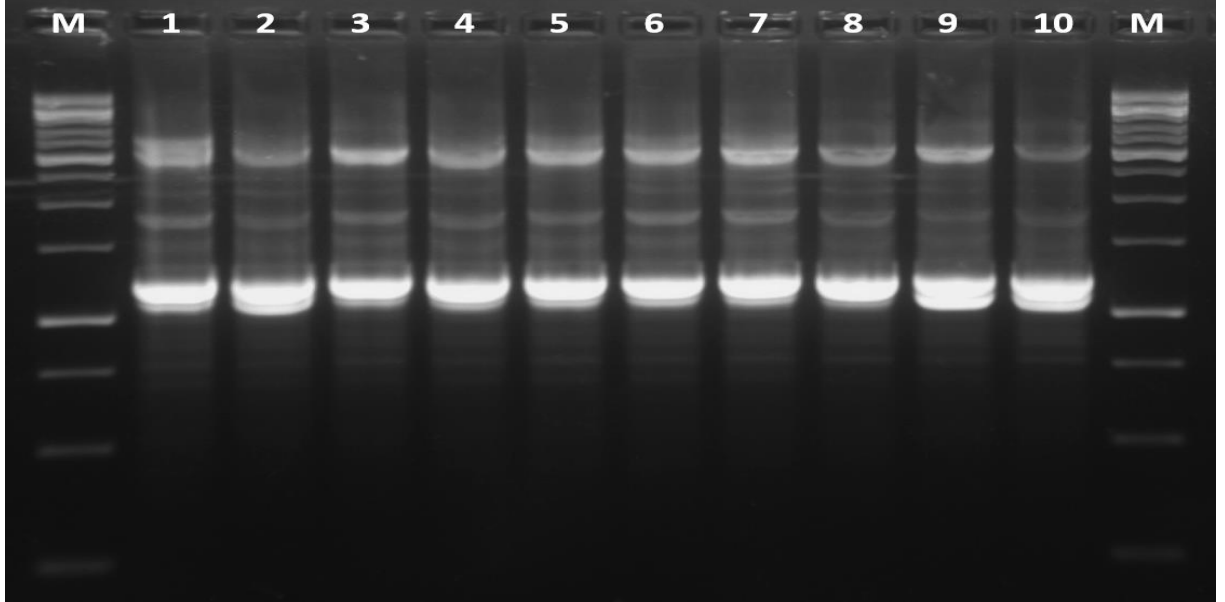
Şekil 4.32: UBC814 ISSR primeri bant profili. M: Markör; 1: Osmancık-97 Kontrol; 2: Osmancık-97 150 mM NaCl; 3: EO-250-2 Kontrol; 4: EO-250-2 150 mM NaCl; 5: EO-300-5 Kontrol; 6: EO-300-5 150 mM NaCl; 7: YO-400-2 Kontrol; 8: YO-400-2 150 mM NaCl; 9: EO-400-5 Kontrol; 10: EO-400-5 150 mM NaCl.



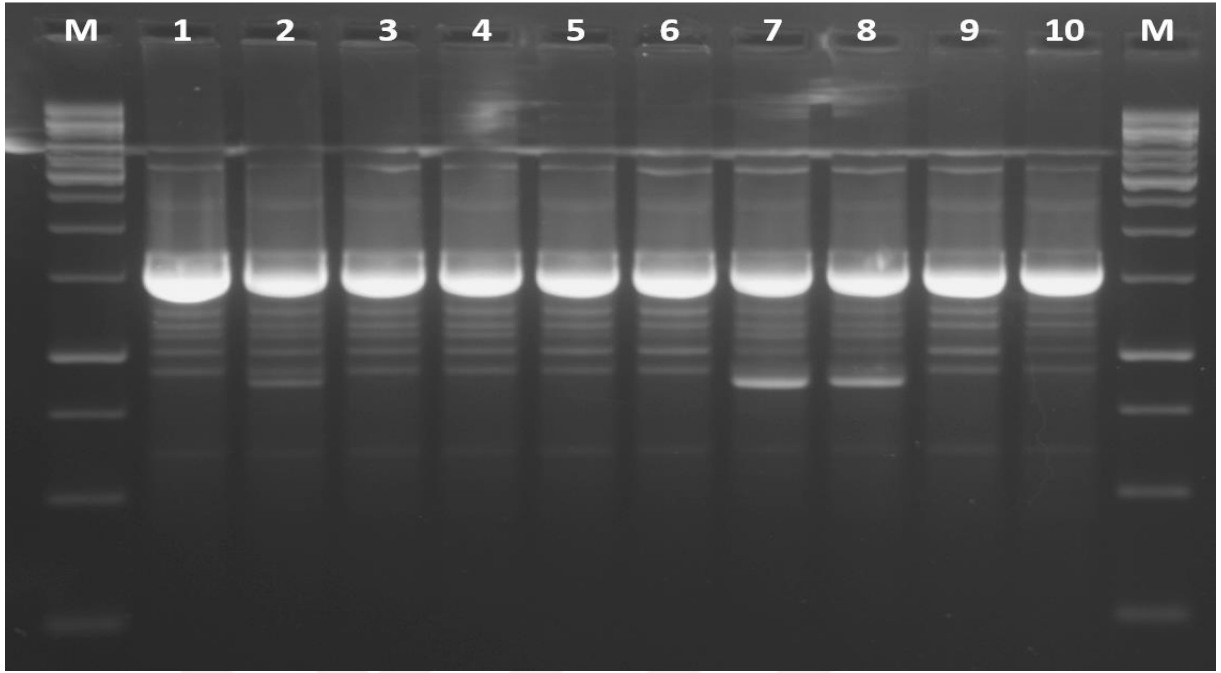
Şekil 4.33: UBC824 ISSR primeri bant profili. M: Markör; 1: Osmancık-97 Kontrol; 2: Osmancık-97 150 mM NaCl; 3: EO-250-2 Kontrol; 4: EO-250-2 150 mM NaCl; 5: EO-300-5 Kontrol; 6: EO-300-5 150 mM NaCl; 7: YO-400-2 Kontrol; 8: YO-400-2 150 mM NaCl; 9: EO-400-5 Kontrol; 10: EO-400-5 150 mM NaCl.



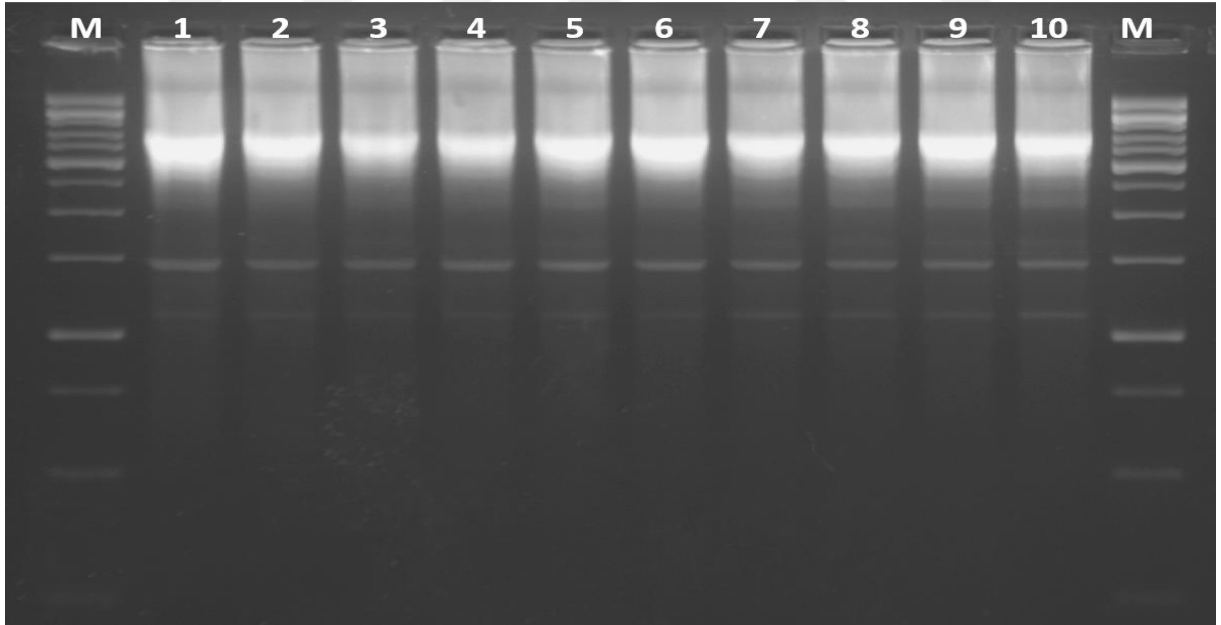
Şekil 4.34: UBC825 ISSR primeri bant profili. M: Markör; 1: Osmancık-97 Kontrol; 2: Osmancık-97 150 mM NaCl; 3: EO-250-2 Kontrol; 4: EO-250-2 150 mM NaCl; 5: EO-300-5 Kontrol; 6: EO-300-5 150 mM NaCl; 7: YO-400-2 Kontrol; 8: YO-400-2 150 mM NaCl; 9: EO-400-5 Kontrol; 10: EO-400-5 150 mM NaCl.



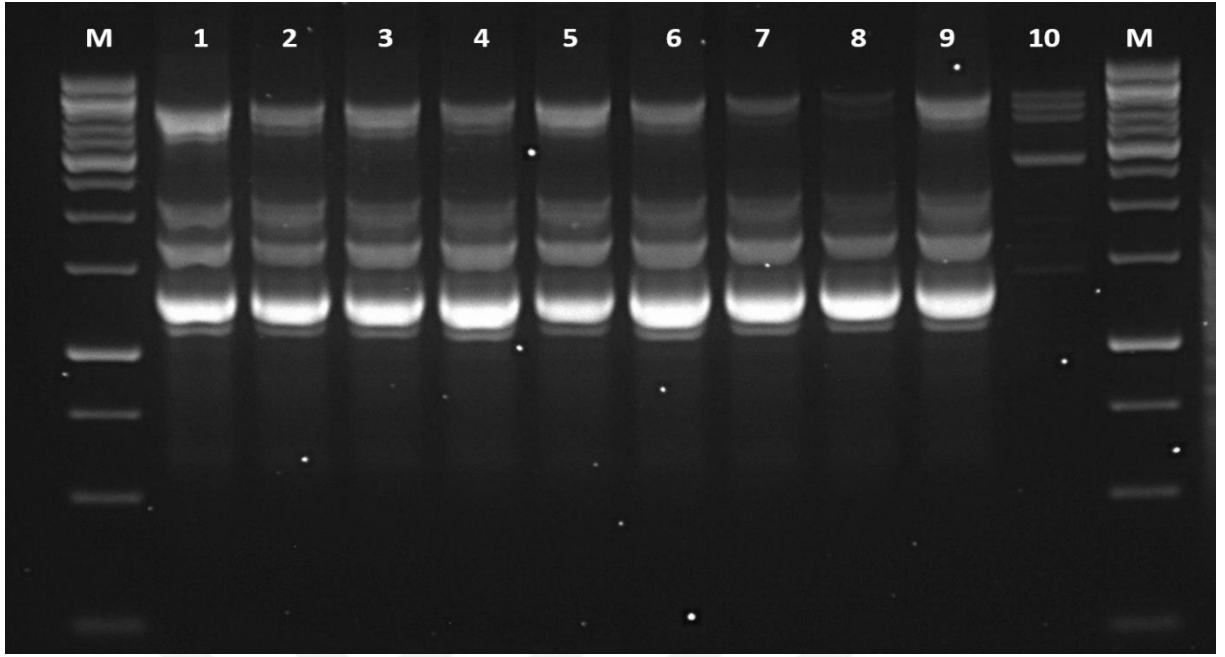
Şekil 4.35: UBC834 ISSR primeri bant profili. M: Markör; 1: Osmancık-97 Kontrol; 2: Osmancık-97 150 mM NaCl; 3: EO-250-2 Kontrol; 4: EO-250-2 150 mM NaCl; 5: EO-300-5 Kontrol; 6: EO-300-5 150 mM NaCl; 7: YO-400-2 Kontrol; 8: YO-400-2 150 mM NaCl; 9: EO-400-5 Kontrol; 10: EO-400-5 150 mM NaCl.



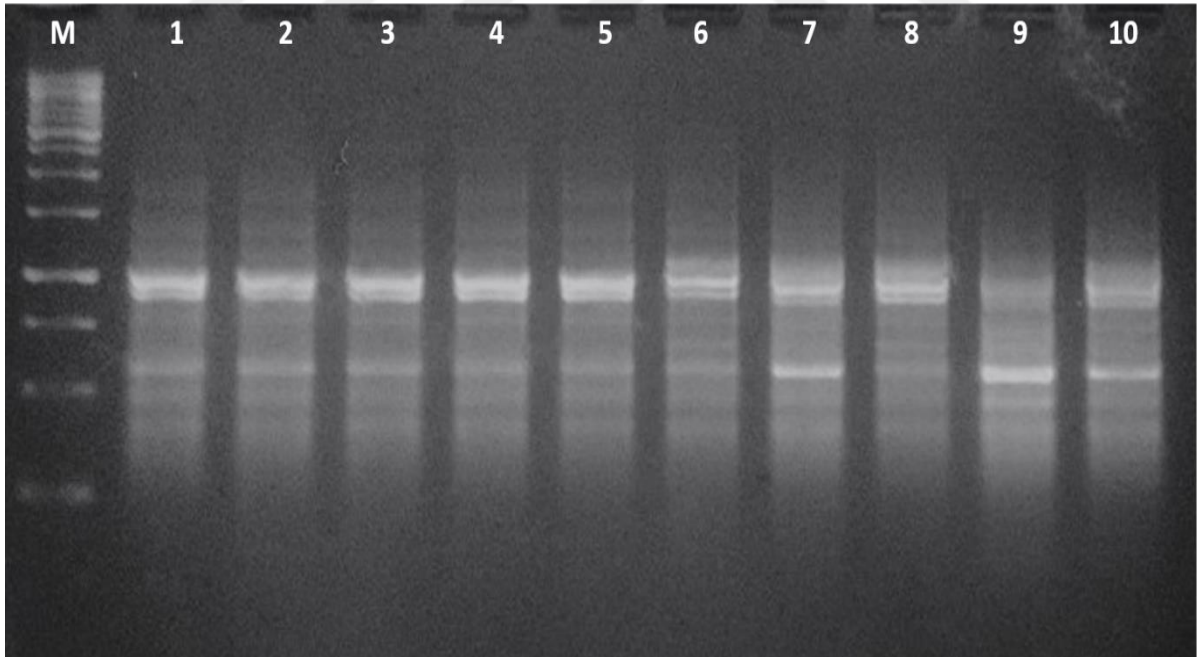
Şekil 4.36: UBC840 ISSR primeri bant profili. M: Markör; 1: Osmancık-97 Kontrol; 2: Osmancık-97 150 mM NaCl; 3: EO-250-2 Kontrol; 4: EO-250-2 150 mM NaCl; 5: EO-300-5 Kontrol; 6: EO-300-5 150 mM NaCl; 7: YO-400-2 Kontrol; 8: YO-400-2 150 mM NaCl; 9: EO-400-5 Kontrol; 10: EO-400-5 150 mM NaCl.



Şekil 4.37: UBC864 ISSR primeri bant profili. M: Markör; 1: Osmancık-97 Kontrol; 2: Osmancık-97 150 mM NaCl; 3: EO-250-2 Kontrol; 4: EO-250-2 150 mM NaCl; 5: EO-300-5 Kontrol; 6: EO-300-5 150 mM NaCl; 7: YO-400-2 Kontrol; 8: YO-400-2 150 mM NaCl; 9: EO-400-5 Kontrol; 10: EO-400-5 150 mM NaCl.



Şekil 4.38: UBC873 ISSR primeri bant profili. M: Markör; 1: Osmancık-97 Kontrol; 2: Osmancık-97 150 mM NaCl; 3: EO-250-2 Kontrol; 4: EO-250-2 150 mM NaCl; 5: EO-300-5 Kontrol; 6: EO-300-5 150 mM NaCl; 7: YO-400-2 Kontrol; 8: YO-400-2 150 mM NaCl; 9: EO-400-5 Kontrol; 10: EO-400-5 150 mM NaCl.



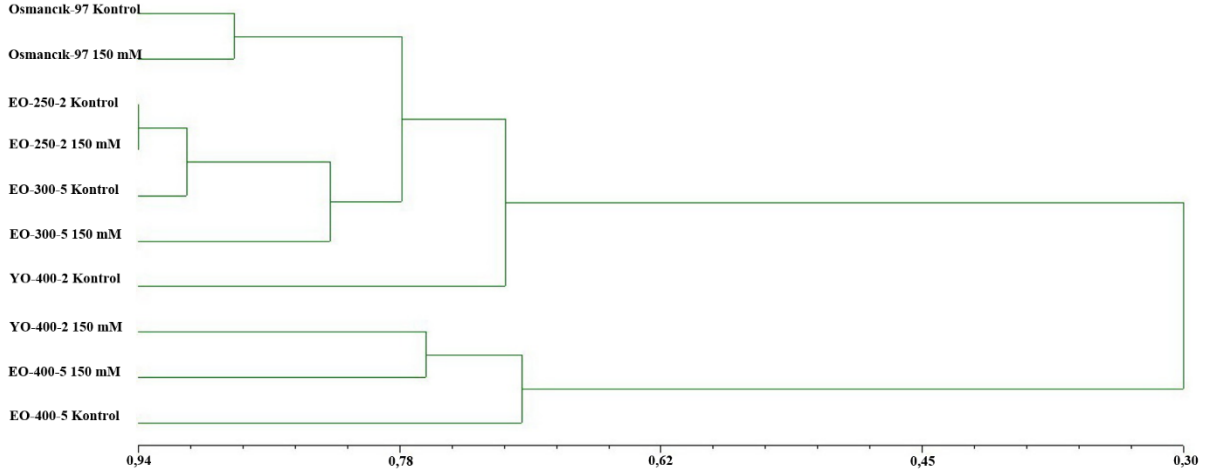
Şekil 4.39: UBC880 ISSR primeri bant profili. M: Markör; 1: Osmancık-97 Kontrol; 2: Osmancık-97 150 mM NaCl; 3: EO-250-2 Kontrol; 4: EO-250-2 150 mM NaCl; 5: EO-300-5 Kontrol; 6: EO-300-5 150 mM NaCl; 7: YO-400-2 Kontrol; 8: YO-400-2 150 mM NaCl; 9: EO-400-5 Kontrol; 10: EO-400-5 150 mM NaCl.

Tablo 4.12: ISSR amplifikasyonları sonucu oluşan bant sayıları ve polimorfizm oranları.

Primer Adı	Total Bant	Polimorfik Bant	Monomorfik Bant	Total Polimorfizm Yüzdesi
UBC808	6	1	5	16,67
UBC810	14	1	13	7,14
UBC811	11	2	9	18,18
UBC812	12	0	12	0,00
UBC814	8	2	6	25,00
UBC824	8	4	4	50,00
UBC825	16	2	14	12,50
UBC834	13	2	11	15,38
UBC840	11	1	10	9,09
UBC864	6	0	6	0,00
UBC873	9	8	1	88,89
UBC880	9	2	7	22,22
Toplam	114	17	97	14,90

Tablo 4.13: ISSR primerlerine göre Osmancık-97 150 mM NaCl toleranslı mutantlarına ait kontrol ve tuz stresi uygulanmış bitkilerin Jaccard yöntemine göre birbirlerine olan genetik benzerlikleri.

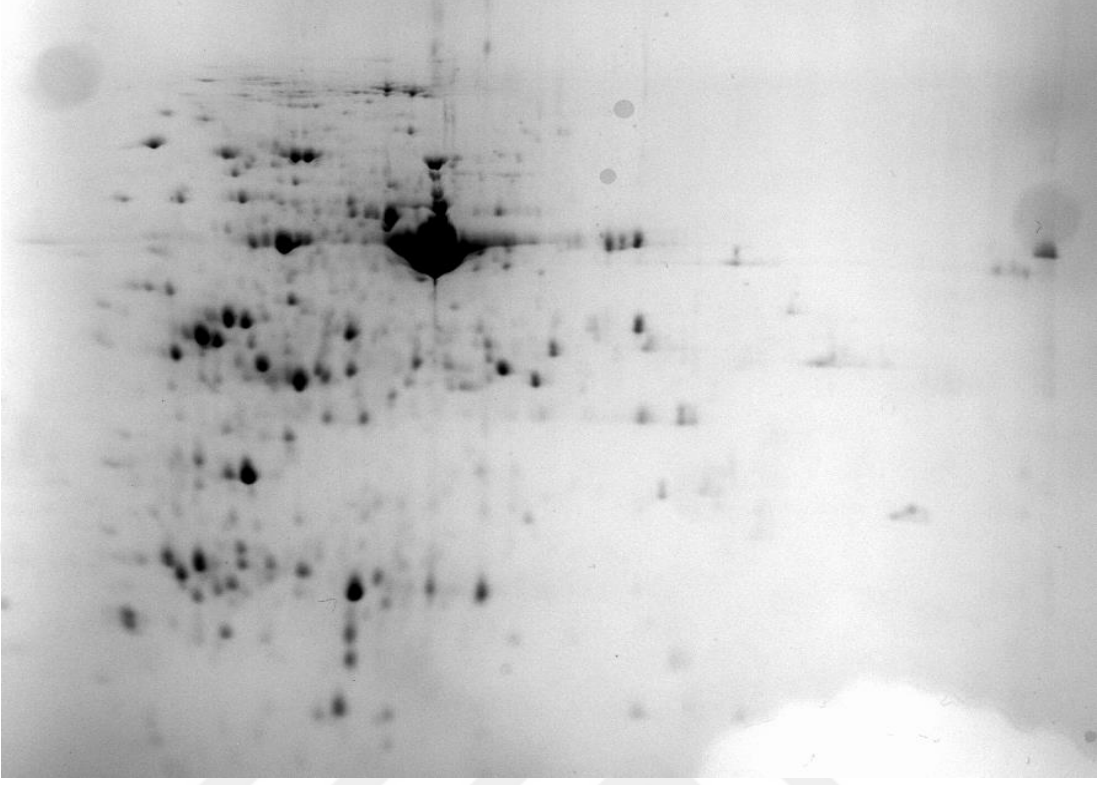
	Osm (-)	Osm (+)	250-2 (-)	250-2 (+)	300-5 (-)	300-5 (+)	400-2 (-)	400-2 (+)	400-5 (-)	400-5 (+)
Osm(-)	1									
Osm(+)	0,8824	1								
250-2(-)	0,7647	0,7647	1							
250-2(+)	0,8235	0,8235	0,9412	1						
300-5(-)	0,8824	0,7647	0,8824	0,9412	1					
300-5(+)	0,7647	0,6471	0,7647	0,8235	0,8824	1				
400-2(-)	0,6471	0,6471	0,7647	0,7059	0,7647	0,7647	1			
400-2(+)	0,2353	0,3529	0,3529	0,2941	0,2353	0,3529	0,4706	1		
400-5(-)	0,2353	0,2353	0,3529	0,2941	0,2353	0,3529	0,3529	0,6471	1	
400-5(+)	0,2353	0,2353	0,3529	0,2941	0,2353	0,3529	0,2353	0,7647	0,7647	1



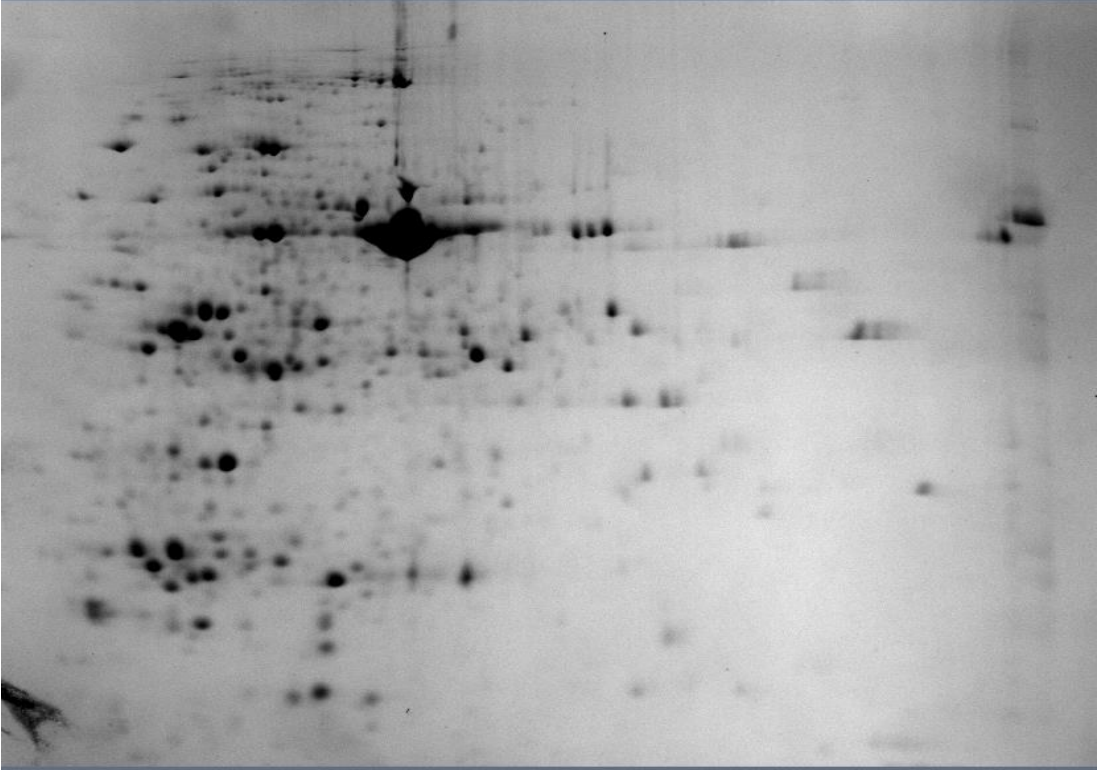
Şekil 4.40: 150 mM NaCl uygulanmış ve uygulanmamış Osmancık-97 ve mutant çeltik çeşitleri arasında ISSR primerleri ile amplifikasyon sonuçlarına göre oluşturulan UPGMA dendrogramı.

4.9. İKİ BOYUTLU (2D) JEL ELEKTROFOREZİ

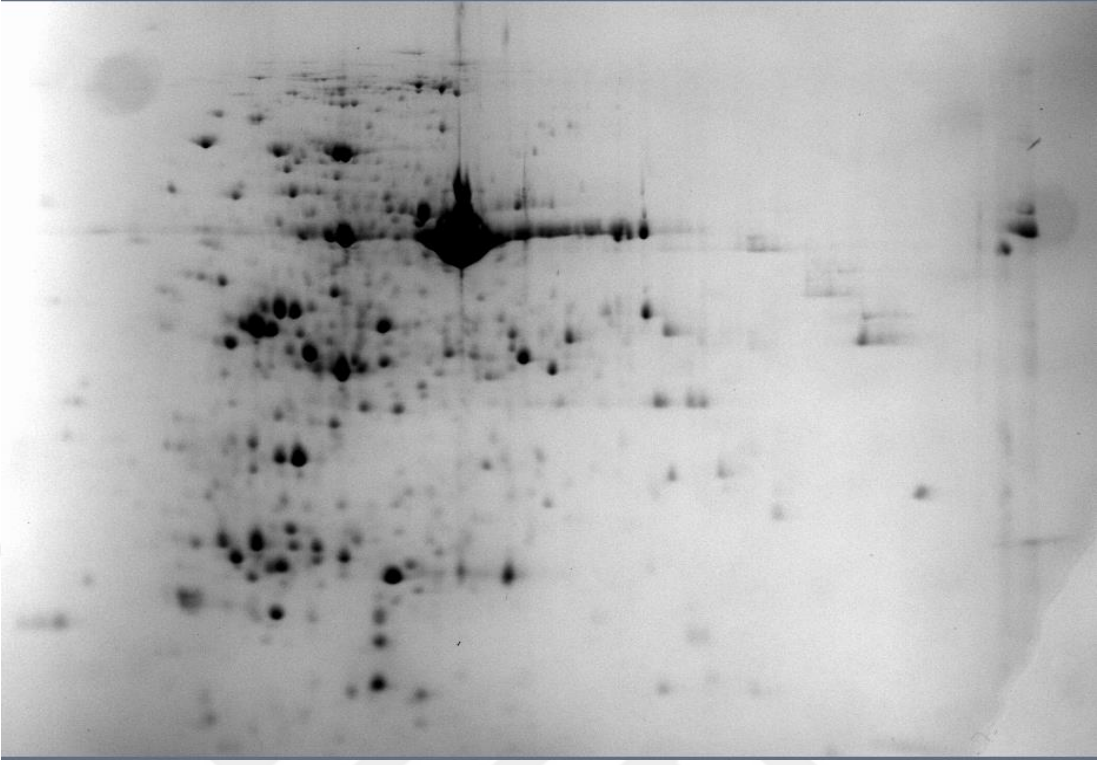
Osmancık-97 ile bu çeltikten kökenlenen 4 mutanta ait NaCl uygulanmamış kontrol bitkilerinden ve 150 mM NaCl uygulanmış bitkilerinden izole edilen proteinlerin 2-D jel elektroforezi gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.41 – 4.50). İfadelerinde istatistiksel olarak anlamlı değişim tespit edilen 30 spot (Şekil 4.51) dizilenmiştir. Dizilen proteinlerin % 16 kloroplast, % 13 nükleus, % 30 tilekoid membran, % 7 sitoplazma, % 7 sitosol, % 7 mitokondri, % 10 stroma, % 7 hücre iskeleti ile % 3'ünün birçok farklı kısımda lokalize olmuş proteinler olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.52).



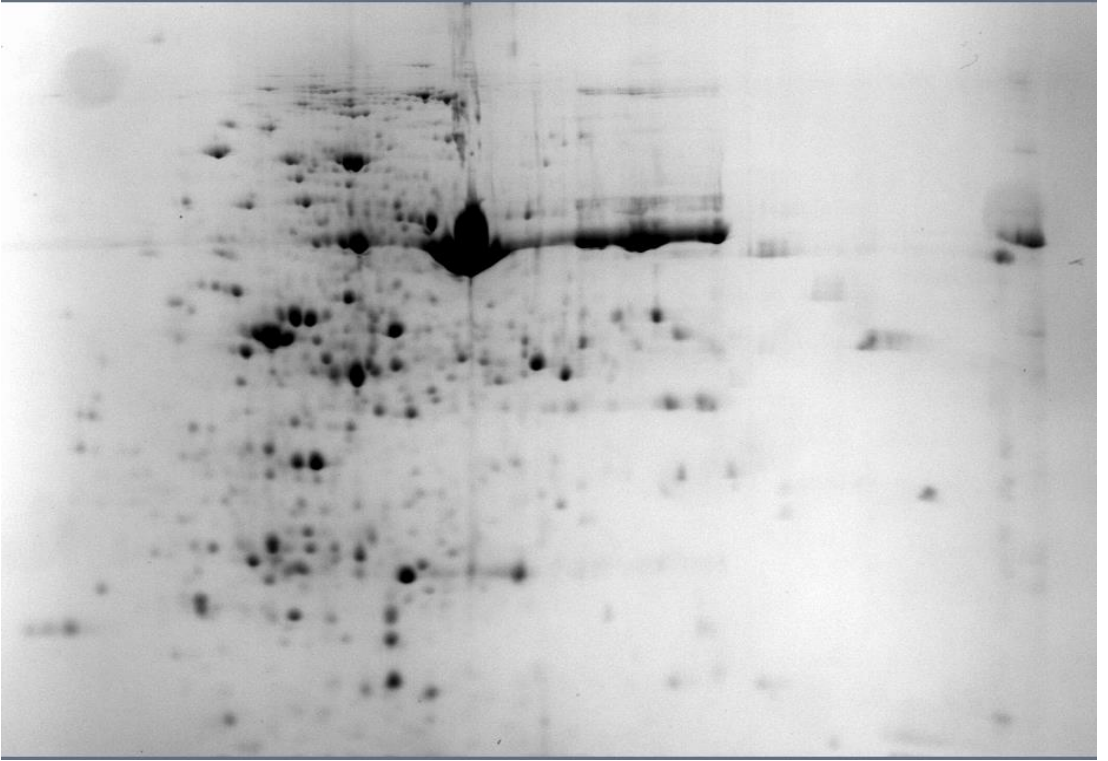
Şekil 4.41: Osmancık-97 çeltik çeşidine ait kontrol bitkilerinin iki boyutlu protein profili.



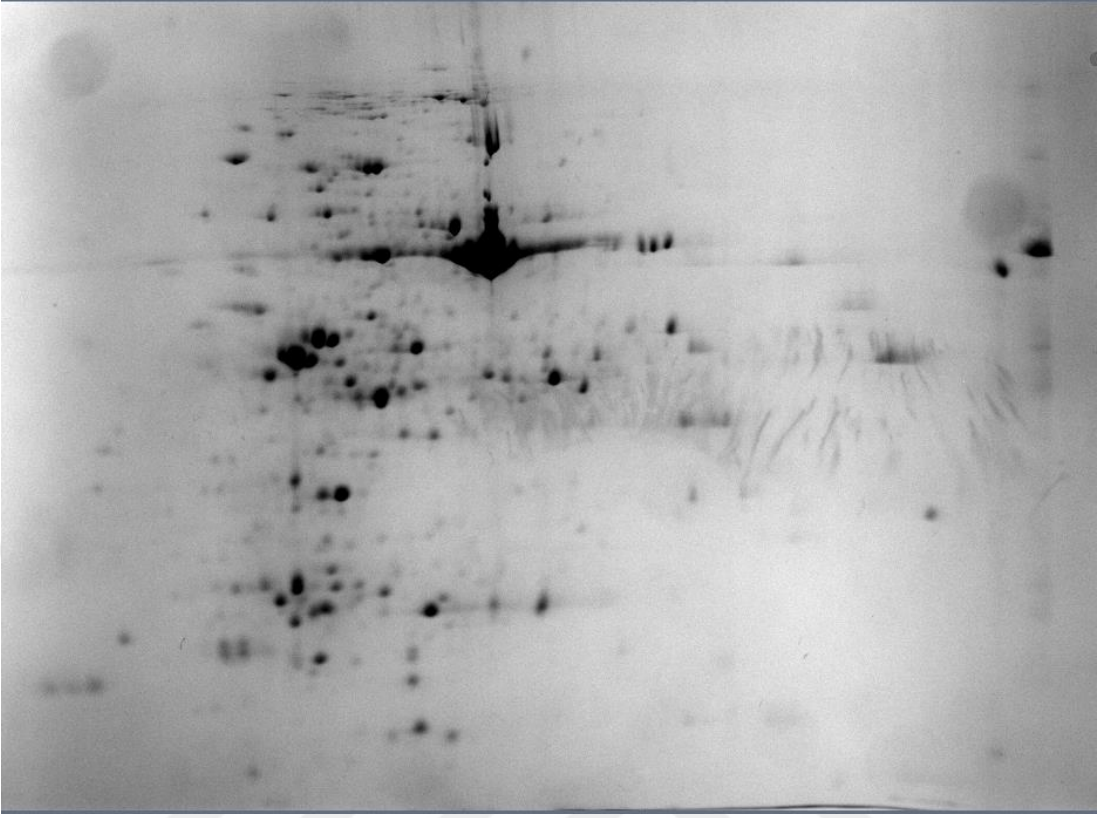
Şekil 4.42: 150 mM NaCl uygulanmış Osmancık-97 bitkilerinin iki boyutlu protein profili.



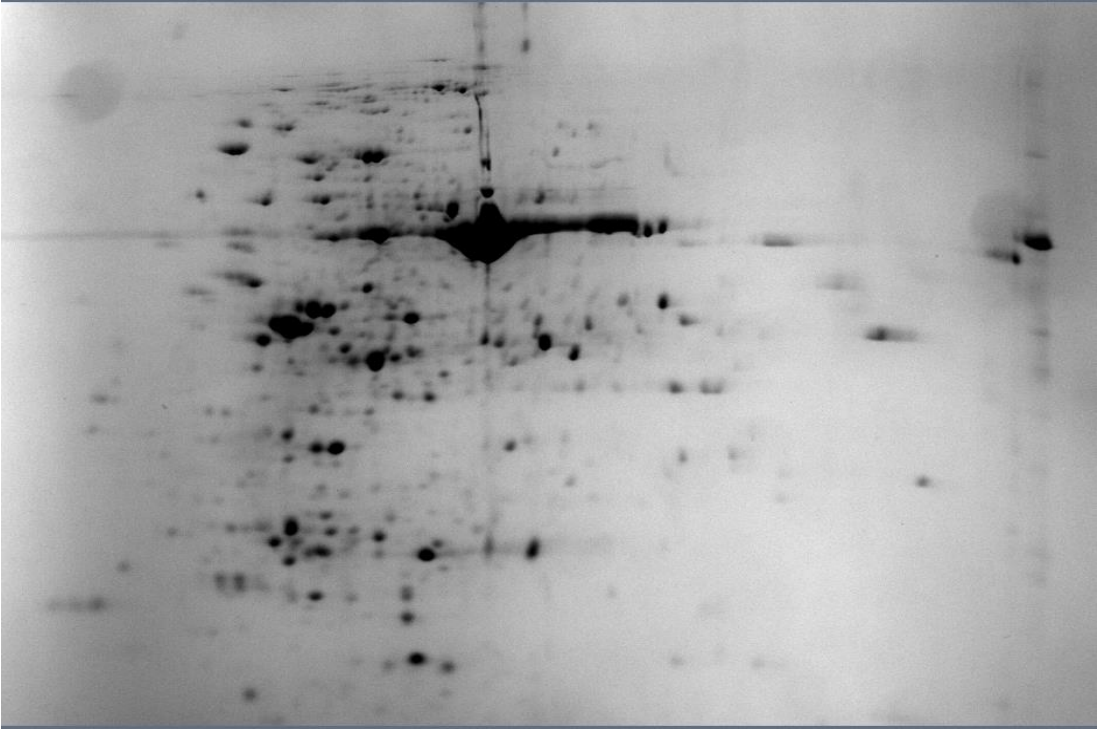
Şekil 4.43: YO-250-2 çeltik mutantına ait kontrol bitkilerinin iki boyutlu protein profili.



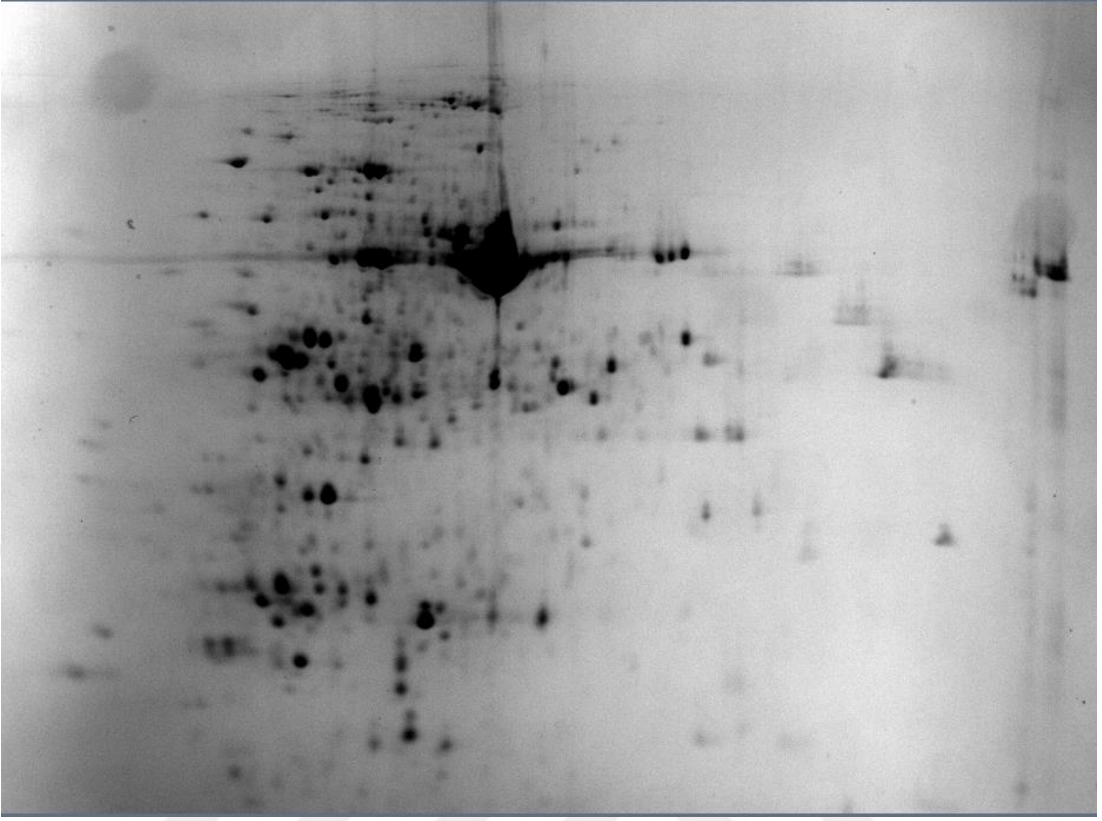
Şekil 4.44: 150 mM NaCl uygulanmış YO-250-2 çeltik mutantına ait bitkilerin iki boyutlu protein profili.



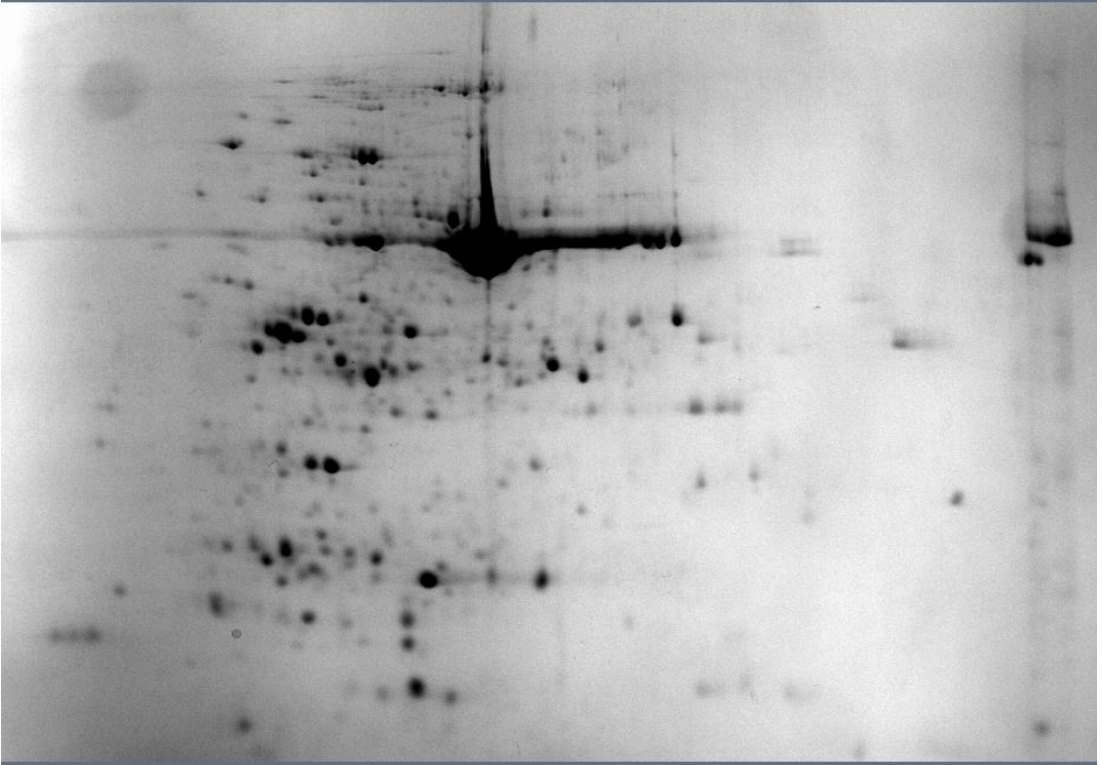
Şekil 4.45: YO-300-5 çeltik mutantına ait kontrol bitkilerinin iki boyutlu protein profili.



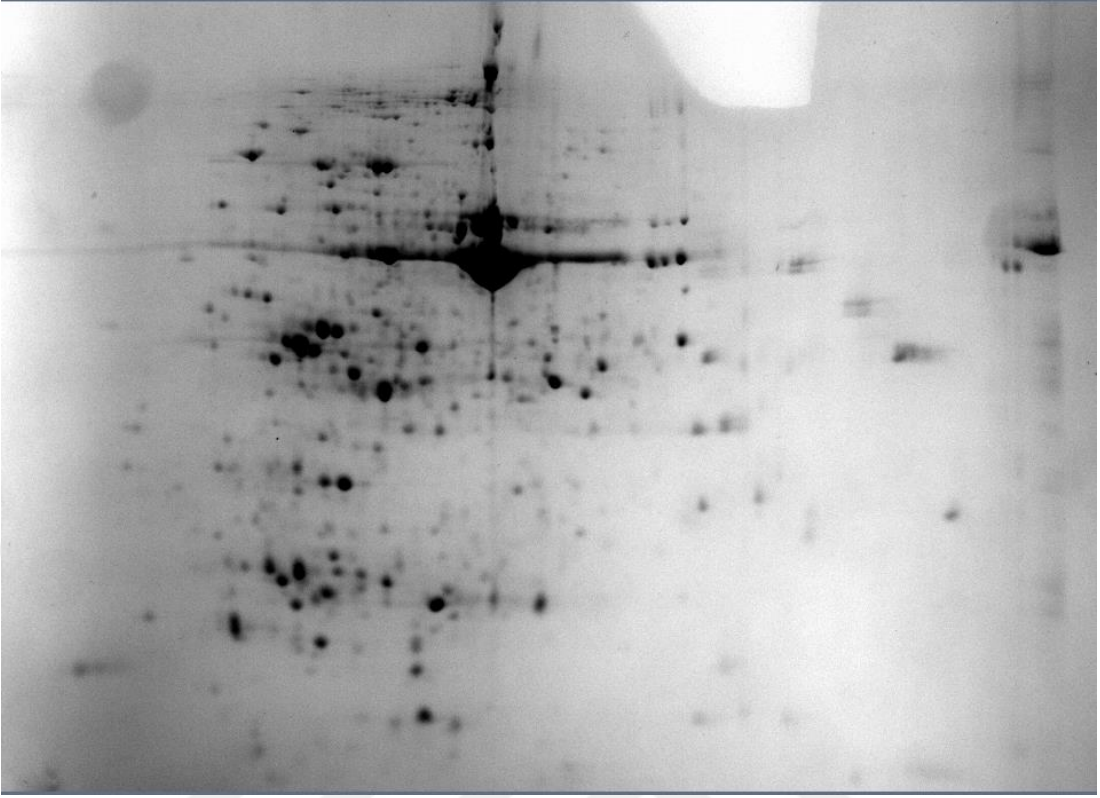
Şekil 4.46: 150 mM NaCl uygulanmış YO-300-5 çeltik mutantına ait bitkilerin iki boyutlu protein profili.



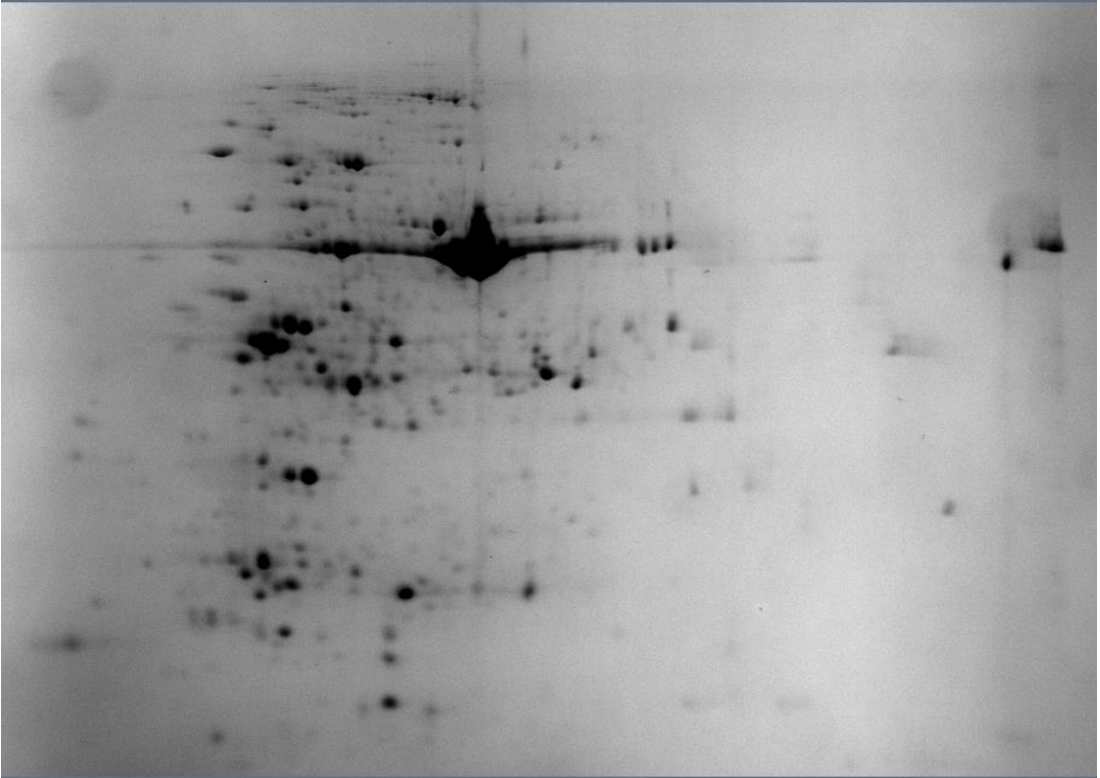
Şekil 4.47: EO-400-2 çeltik mutantına ait kontrol bitkilerinin iki boyutlu protein profili.



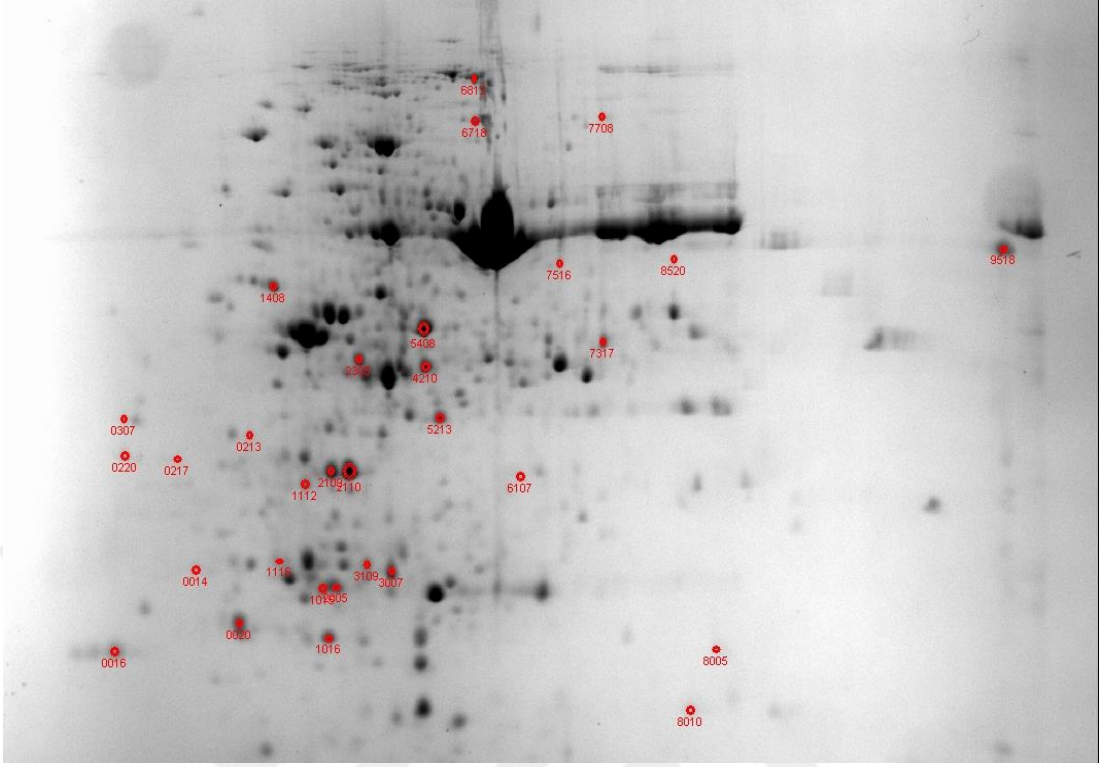
Şekil 4.48: 150 mM NaCl uygulanmış EO-400-2 çeltik mutantına ait bitkilerin iki boyutlu protein profili.



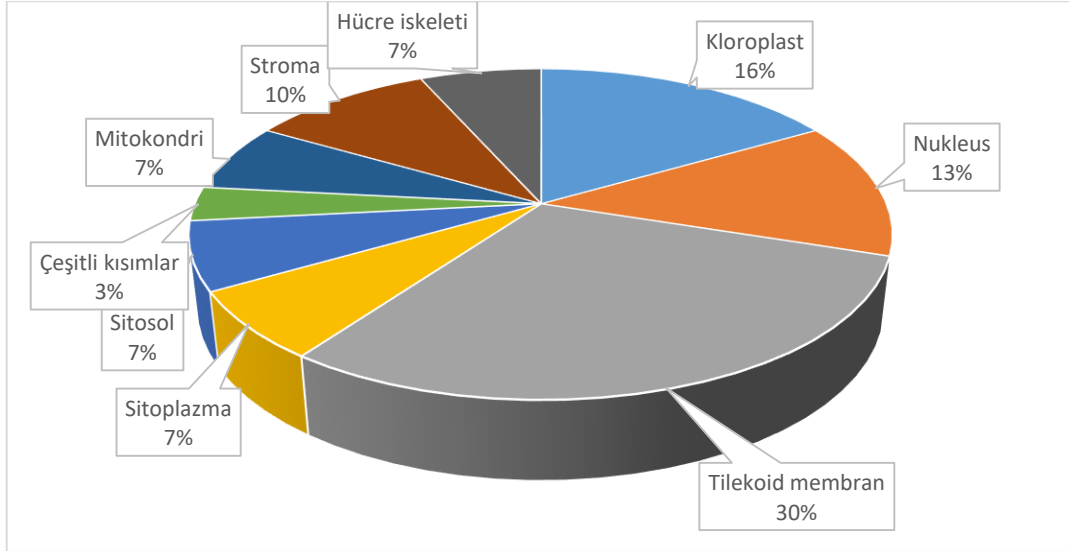
Şekil 4.49: YO-400-5 çeltik mutantına ait kontrol bitkilerinin iki boyutlu protein profili.



Şekil 4.50: 150 mM NaCl uygulanmış YO-400-5 çeltik mutantına ait bitkilerin iki boyutlu protein profili.

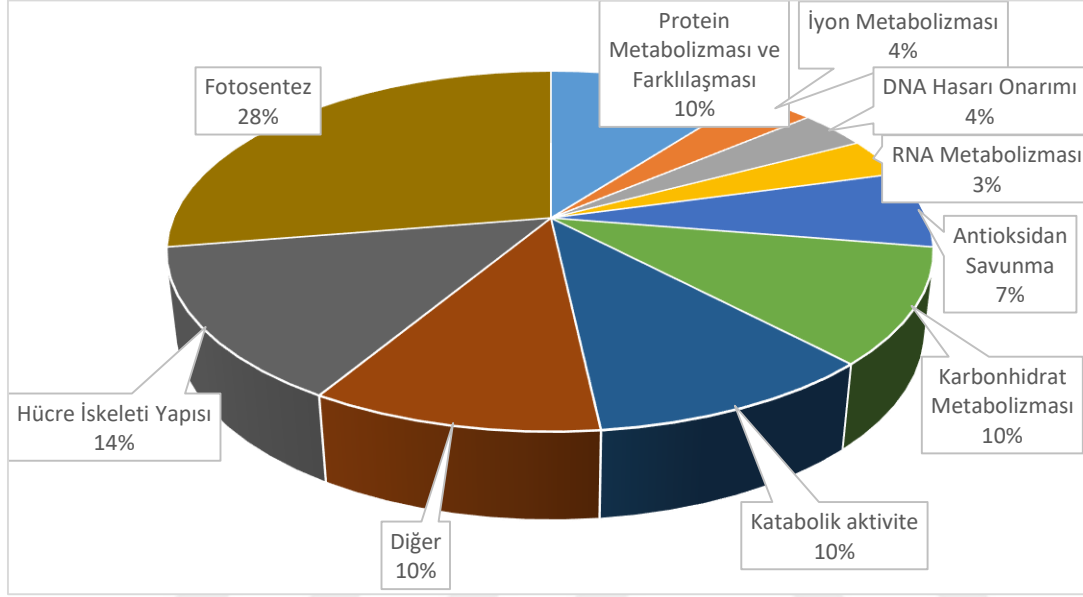


Şekil 4.51: Osmancık-97 ve bu çeşitten kökenlenen mutanlarda 150 mM NaCl uygulaması sonucunda ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı değişimler tespit edilen 30 protein spotu ve SSP numaraları.



Şekil 4.52: Dizilenen proteinlerin hücre içerisinde lokalizasyonlarına göre sınıflandırılması.

Proteinler hücredeki fonksiyonlarına göre değerlendirildiğinde, dizilenen spotların % 28 oranında fotosentez, % 14 hücre iskeleti yapısı, % 10 protein metabolizması ve farklılaşması, % 10 katabolik aktivite, % 10 karbonhidrat metabolizması, % 7 antioksidan savunma, % 4 iyon metabolizması, % 4 DNA hasarı onarımı, % 3 RNA metabolizması ve % 10 diğer fonksiyonlardan ile ilişkili oldukları tespit edilmiştir (Şekil 4.53).

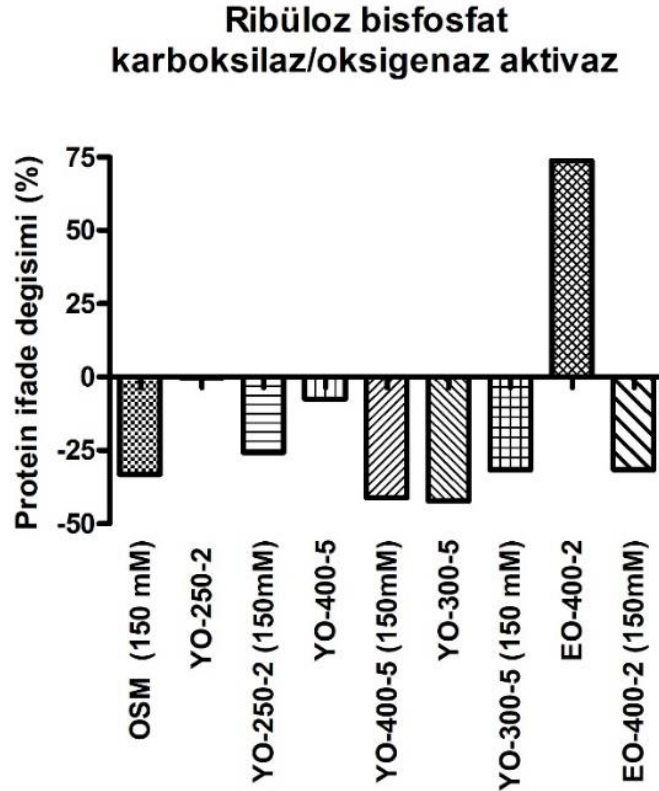


Şekil 4.53: Dizilenen proteinlerin fonksiyonlarına göre sınıflandırılması.

Elde edilen proteomik sonuçlar incelendiğinde, literatürde çeltik ve çalışılan diğer pek çok bitkide tuzluluk ve diğer abiyotik streslere toleranslılık bakımından avantajlar sağladığı gösterilen ribüloz bisfosfat karboksilaz/oksigenaz aktivaz (Rubisco aktivaz), trioz fosfat izomeraz, 2-Cys peroksiredoksin, oksijen-evolving enhancer protein 1, ferritin-1, ferredoksin-NADP redüktaz, gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz, tubby-benzeri F-box protein 11, peptidil-prolil cis-trans izomeraz (CYP20-2) proteinlerinin ifade seviyelerinin mutant bitkilerde de değişiklikler gösterdikleri belirlenmiştir. Tez çalışması kapsamında kontrol bitkileri ve mutant bitkileri arasında ifade farklılıkları olduğu gözlenen 30 farklı spottan doğrudan abiyotik stres ve özellikle tuz stres toleransı ile ilişkili oldukları belirlenen 9 adet proteinin detaylı ifade analizleri de karşılaştırmalı olarak yapılmıştır.

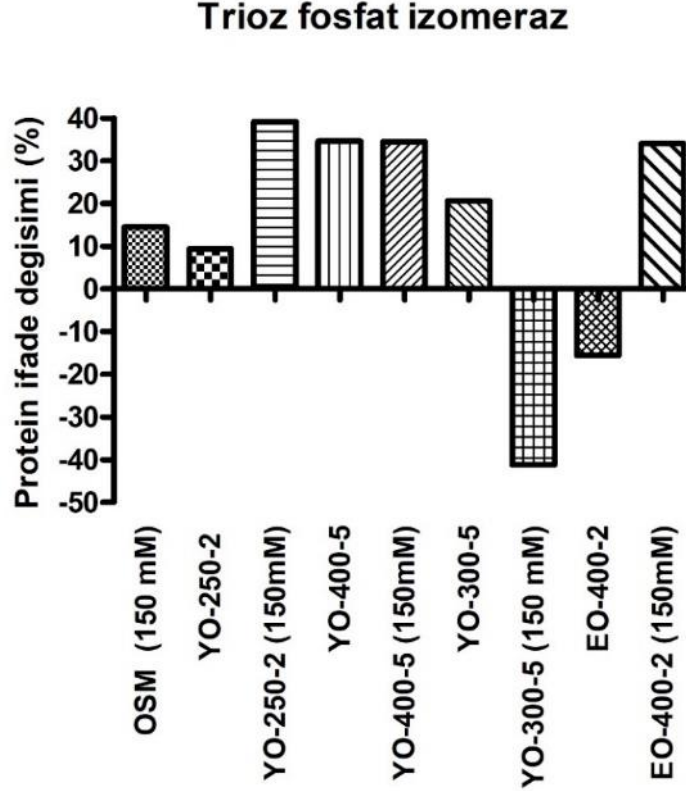
150 mM NaCl'e toleranslı oldukları belirlenen mutantların her bir protein ifade verileri, mutantların kökenlendikleri Osmancık-97 kontrol çeşidinin tuz uygulanmamış bitkilerine ait veriler 100 kabul edilerek hesaplanmıştır. Mutant bitkilerin tuz uygulanmamış ve tuz uygulanmış örneklerindeki protein ifade değişimleri hem kendi aralarında, hem de Osmancık-97 çeşidinin tuz uygulanmış bitkileri ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

Yapmış olduğumuz çalışmada tuz stresi uygulanmamış mutant bitkilere ait ribuloz bisfosfat karboksilaz/oksigenaz aktivaz protein ifadeleri Osmancık-97 çeltik çeşidinin tuz stresi uygulanmamış kontrolleri ile karşılaştırıldığında, sadece 250-2 mutantının ifade seviyelerinde bir değişiklik gözlenmemiştir. Buna karşılık 400-5 ve 300-5 mutantlarının ifade seviyelerinde azalma saptanmıştır. 400-2 mutantının ifade seviyesinde ise %73,73'lük bir artış tespit edilmiştir. 150 mM NaCl stresi uygulandığında tüm Osmancık-97 ve mutantların tamamında protein ifade seviyelerinde azalma meydana gelmiştir (Şekil 4.54).



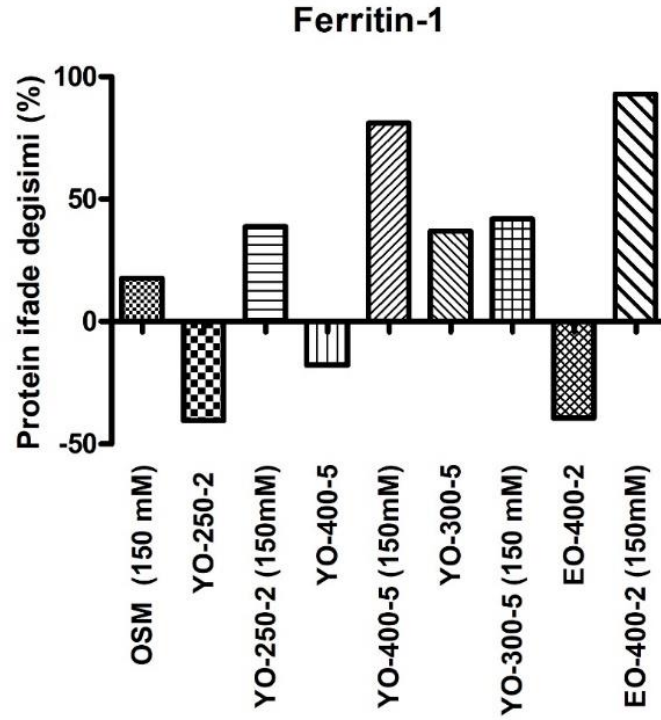
Şekil 4.54: Tuz stresi uygulanmamış Osmancık-97 çeltik çeşidine göre değerlendirilen ribuloz bisfosfat karboksilaz/oksigenaz aktivaz protein ifade değişimleri (%).

Trioz fosfat izomerazın 250-2, 400-5 ve 300-5 mutantlarının tuz uygulanmamış kontrol bitkilerinde ifadesinin arttığı 400-2 mutantında ise azaldığı gösterilmiştir (Şekil 4.55). Tuz stresi uygulamasının ardından YO-250-2 ve YO-400-5 mutantlarının protein ifadeleri sırası ile %39,16 ve 34,38 artmıştır. Mutant 400-2’de tuz uygulaması öncesinde bu proteinin ifadesi % 15,6 azalmışken tuz stresinin sonucunda ifade seviyesi % 34,02 artmıştır.



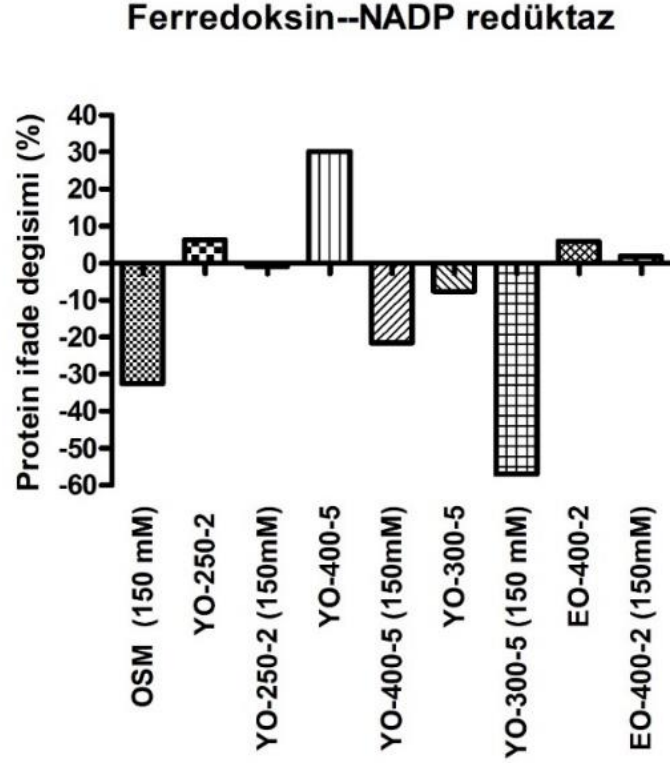
Şekil 4.55: Tuz stresi uygulanmamış Osmancık-97 çeltik çeşidine göre değerlendirilen trioz fosfat izomeraz protein ifade değişimleri (%).

Ferritin-1 proteini seviyelerinin normal fizyolojik durumda Osmancık-97'ye göre düşük olduğu, mutantlar arasında sadece 300-5 mutantının ferritin-1 ifade seviyesinin Osmancık-97'den %36,85 yüksek olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.56). 150 mM NaCl uygulamasının ardından tüm mutantların ferritin-1 ifade seviyeleri Osmancık-97'nin üzerine çıkmış olup 250-2, 400-5, 300-5 ve 400-2 artış düzeyleri sırası ile 38,65, 81,08, 41,93 ve 92,96 olarak kaydedilmiştir.



Şekil 4.56: Tuz stresi uygulanmamış Osmancık-97 çeltik çeşidine göre değerlendirilen ferritin-1 protein ifade değişimleri (%).

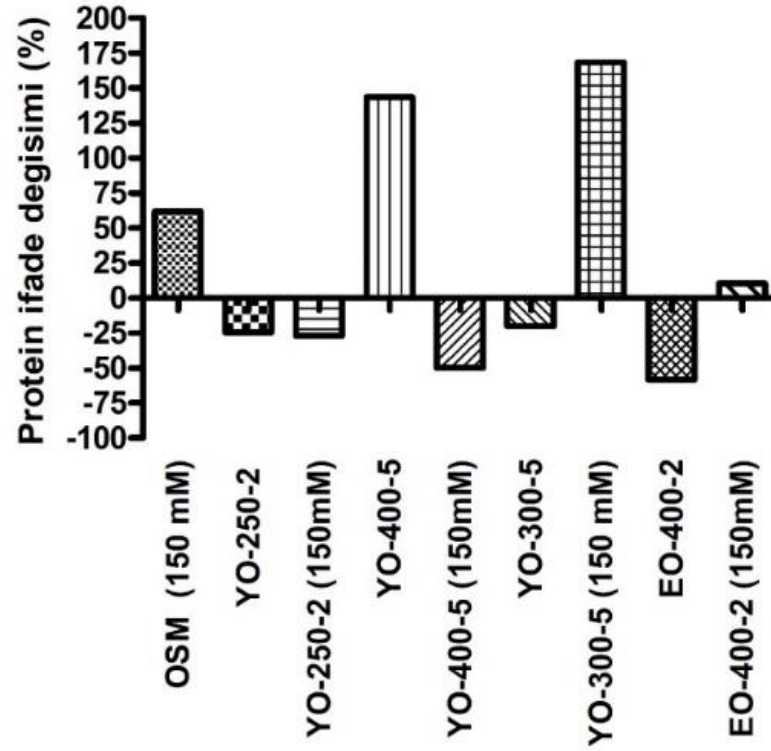
Ferredoksin—NADP redüktazın kontrol ve tuz stresi uygulaması sonucunda Osmancık-97 ve mutantlardaki cevapları Şekil 4.57’de verilmiştir. Tuz stresine maruz bırakılmayan 250-2 ve 400-2 mutantları Osmancık-97 çeşidine göre genellikle FNR ifade seviyelerini arttırmış olsalar da en belirgin artışı %30,21 ile 400-5 mutanı sergilemiştir. 150 mM NaCl uygulamasının ardından Osmancık-97’ye oranla FNR ifade düzeyini arttıran tek mutant 400-2 olmuştur.



Şekil 4.57: Tuz stresi uygulanmamış Osmancık-97 çeltik çeşidine göre değerlendirilen ferredoksin NADP(H) oksidoredüktaz protein ifade değişimleri (%).

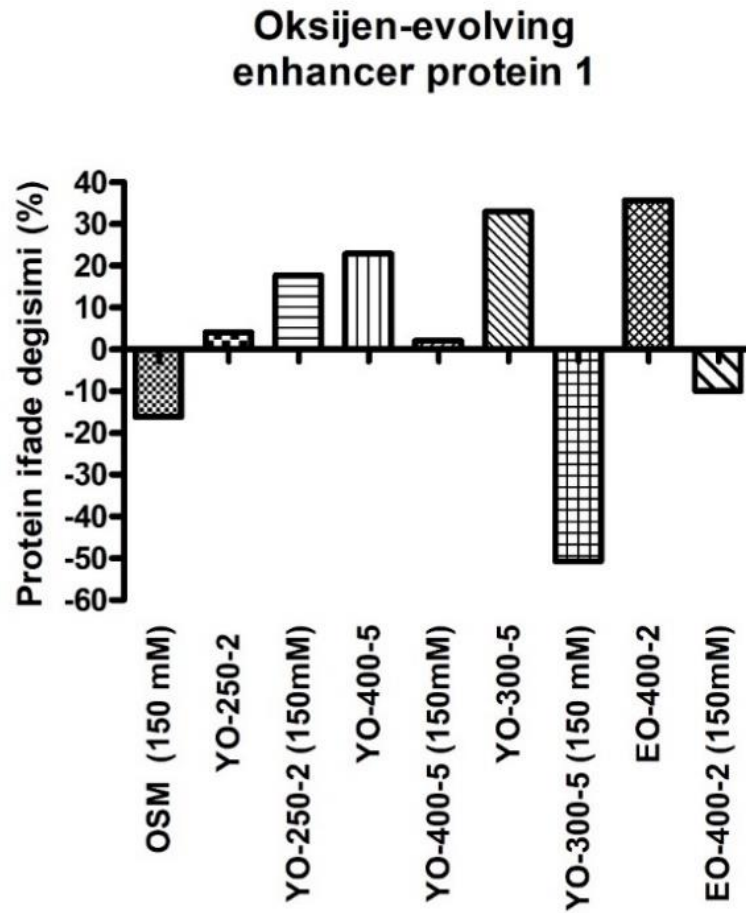
2-cys peroksiredoksin BAS1'in kontrol ve tuz stresi uygulaması sonucunda Osmancık-97 ve mutantlardaki cevapları Şekil 4.58'de verilmiştir. Tuz stresi uygulanmamış mutant bitkiler arasında sadece 400-5 mutanıtı %143,7 artış ile Osmancık-97 negatif kontrol örneğinden daha yüksek 2-cys peroksiredoksin ifadesi sergilemiştir. Bitkilere 150 mM NaCl stresi uygulandığında ise, tüm mutantlarda proteinin ifadesi Osmancık-97 çeşidine göre azalma gösterirken, 300-5 mutanıtı %168,47 ifade artışı ile dikkat çekmiştir.

2-Cys peroksiredoksin BAS1



Şekil 4.58: Tuz stresi uygulanmamış Osmancık-97 çeltik çeşidine göre değerlendirilen 2-cys peroksiredoksin BAS1 protein ifadesi değişimleri (%).

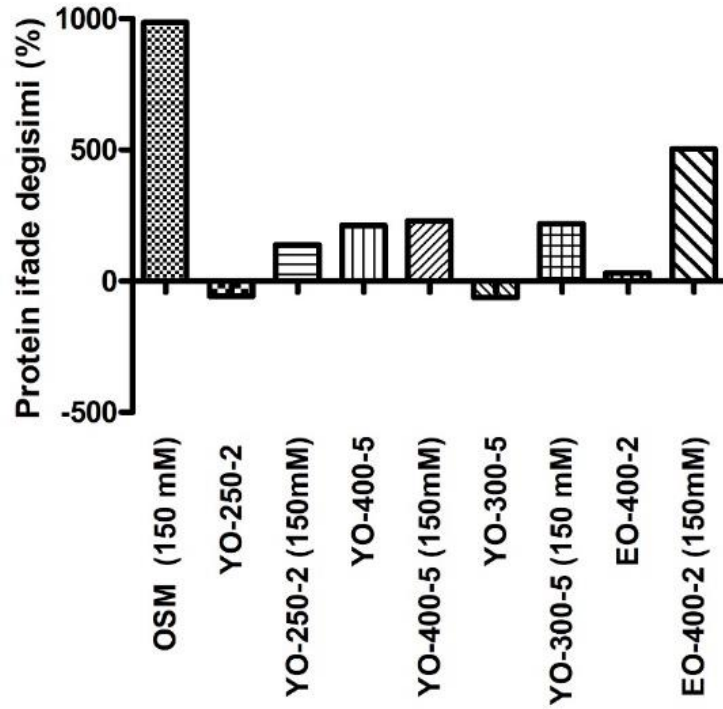
Oksijen-evolving enhancer protein 1'in kontrol ve tuz stresi uygulaması sonucunda Osmancık-97 ve mutantlardaki cevapları Şekil 4.59'da verilmiştir Osmancık-97 çeltik çeşidinden kökenlenen ve 150 mM NaCl stresine toleranslı olduğu tespit edilmiş 250-2, 400-5, 300-5 ve 400-2 mutantları tuz uygulanmamış kontrollerinde Oksijen-evolving enhancer protein 1 ifadesi bakımından Osmancık-97 kontrollerine göre sırasıyla %4,12, %22,88, %33 ve %35,68 oranlarında artış göstermiştir. 150 mM tuz uygulamasının ardından 250-2 mutandında ve 400-5 mutandında artış sürerken 300-5 ve 400-2'de ifade düşüşleri tespit edilmiştir.



Şekil 4.59: Tuz stresi uygulanmamış Osmancık-97 çeltik çeşidine göre değerlendirilen oksijen-evolving enhancer protein 1 ifade değişimleri (%).

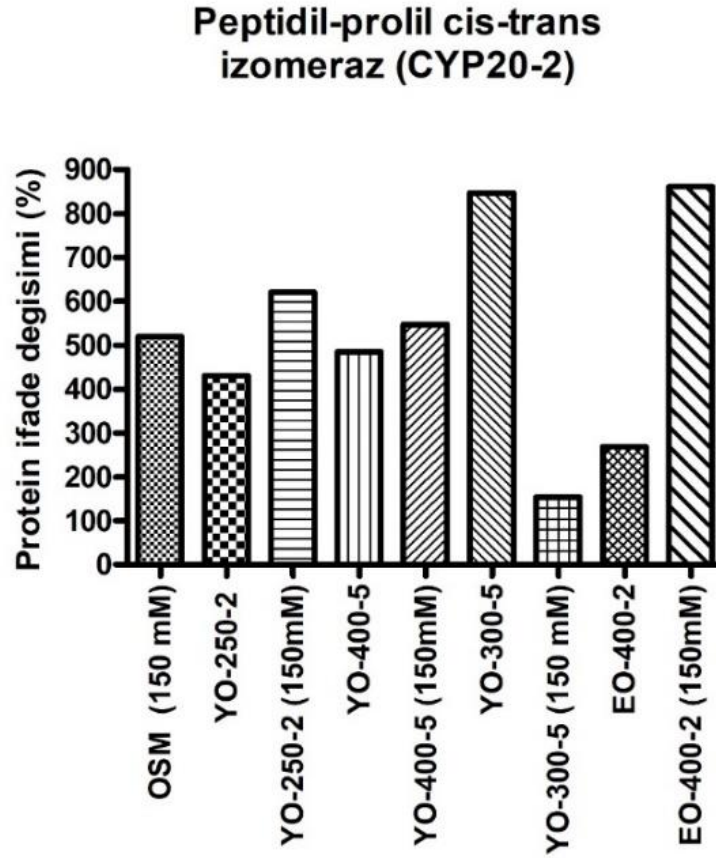
Tubby-benzeri F-box protein 11'in kontrol ve tuz stresi uygulaması sonucunda Osmancık-97 ve mutantlardaki cevapları Şekil 4.60'te verilmiştir. Osmancık-97 çeltik çeşidinin ve çeşitten elde edilen mutantların tuz stresi uygulanmamış kontrol bitkilerinde tubby-benzeri F-box protein 11 ifade seviyeleri incelendiğinde 400-5 mutanı ve 400-2 mutanında Osmancık-97'ye göre artış olduğu, 150 mM tuz stresi altında ise Osmancık-97 negatif kontrolüne göre tüm mutantlarda artış olmasına rağmen bu artışların tuz uygulanmış Osmancık-97 ifade seviyesinin altında kaldığı belirlenmiştir.

Tubby-benzeri F-box protein 11



Şekil 4.60: Tuz stresi uygulanmamış Osmancık-97 çeltik çeşidine göre değerlendirilen tubby-benzeri F-box protein 11 ifade değişimleri (%).

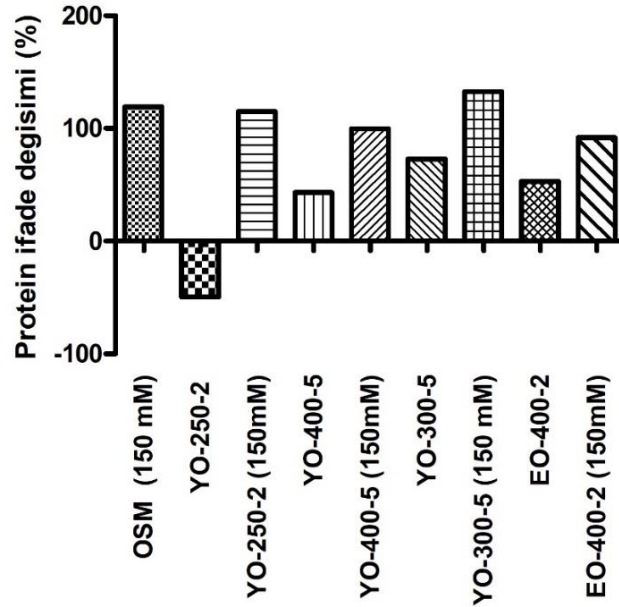
Peptidil-prolil cis-trans izomeraz'ın kontrol ve tuz stresi uygulaması sonucunda Osmancık-97 ve mutantlardaki cevapları Şekil 4.61'de verilmiştir. CYP20-2 ifadeleri tüm mutantlarda özellikle tuz uygulanmamış Osmancık-97 kontrolüne göre artmıştır. Tuz stresi uygulanmamış mutantlar arasında en belirgin artış % 846,9 artış ile 300-5 mutantında tespit edilmiştir. Tuz uygulamasını takiben 300-5'in CYP20-2 ifade seviyesindeki artış % 154,14 seviyesine gerilerken, en belirgin artışı % 861,64 ile 400-2 mutanı göstermiştir.



Şekil 4.61: Tuz stresi uygulanmamış Osmancık-97 çeltik çeşidine göre değerlendirilen peptidil-prolil cis-trans izomeraz (CYP20-2) ifade değişimleri (%).

Gliseraldehit-3-fosfat-dehidrogenaz'ın kontrol ve tuz stresi uygulaması sonucunda Osmancık-97 ve mutantlardaki cevapları Şekil 4.62'de verilmiştir. Tuz stresi uygulanmamış 400-5, 300-5 ve 400-2 mutantları gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz ifadesi bakımından Osmancık-97 negatif kontrollerine göre sırasıyla % 43,1, % 72,88 ve % 53,1 artış gösterirken, mutantlar arasında sadece 250-2'de % 49,56 azalış tespit edilmiştir. 150 mM NaCl uygulamasının ardından tüm mutantlar ifade seviyelerini Osmancık-97'ye göre arttırırken, en belirgin artış 300-5 mutantında % 132,68 oran ile tespit edilmiştir.

Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz



Şekil 4.62: Tuz stresi uygulanmamış Osmancık-97 çeltik çeşidine göre değerlendirilen gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz protein ifade değişimleri (%).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Yapılan bu tez çalışmasında, dünyada insanların günlük kalori ihtiyaçlarının karşılanmasında büyük öneme sahip çeltik bitkisinin Osmancık-97 ve Mevlütbey çeşitlerine ait tuzluluğa toleranslı mutantların elde edilmesi amaçlanmıştır. Seçilen bu çeltik çeşitlerinde ön denemeler ile belirlenen dozlarda gama radyasyonu uygulanarak mutasyonlar teşvik edilmiştir. Gama radyasyonu ile ışınlanarak elde edilen popülasyonda tuzluluğa toleranslı olan mutantlar in vivo ve in vitro yöntemlerle belirlenmiştir. Seçilen mutantlar ile kökenlendikleri çeşit arasındaki biyokimyasal, proteomik ve genomik farklılıklar tespit edilmiştir.

Mutasyon ıslahı yöntemi ile gama radyasyonu kullanılarak bitkilerin dane kalitesi, verimlilik, yatmaya karşı mukavemet, pestisit ve hastalık direnci, biyomolekül (niasin, tanin, antosiyanidin, katechin gibi) miktarı, kuraklık toleransı gibi önemli tarımsal özelliklerinde artış sağlanmıştır (IAEA, 2017). Farklı genotiplere sahip bitkilerin radyasyona farklı cevaplar vermesinden dolayı, yapılan bu çalışmaların tamamında farklı gama radyasyonu dozları kullanılmıştır. Mutasyon ıslahı çalışmalarında temel hedef en az zararlanma ile en yüksek mutasyon frekansını yakalamaktır. Radyasyonun türü, uygulanacağı doz ve uygulama şekli kullanılacak bitki türü ve çeşidine göre belirlenmelidir. Bu nedenle araştırmada kullanılacak radyasyonun etkin dozlarını belirlemek ve meydana getirdiği kantitatif zararları saptamak için fide boyunu yüzde otuz ve yüzde elli azaltan (GR₃₀ ve GR₅₀) dozlarının hesaplanması büyük önem taşımaktadır (Alikamanoğlu, 1999; Atak ve diğ., 2004; Yazıcı ve diğ. 2016). Bu tez kapsamında her iki çeltik çeşidine ait kontrol grupları ve 100, 200, 300, 400, 500, 600 ve 700 Gy dozla ışınlanan tohumların çimlenme yüzdeleri ile yetiştirilen fidelerin ortalama bitki boyları, bitki yaş ağırlıkları ve kök uzunlukları tespit edilmiştir. Fidelerin ortalama bitki boyları esas alınarak GR₅₀ dozları belirlenmiştir.

Osmancık-97 ve Mevlütbey çeşitlerinin çimlenme yüzdeleri radyasyonun artan dozuna bağlı olarak azalmıştır ve bu azalma istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur. Uygulanan radyasyon dozları arasında sadece en yüksek değer olan 700 Gy’de çimlenen bitki elde edilememiştir. 100 Gy’lik dozla ışınlanan tohumların çimlenme yüzdesi kontrole göre Osmancık-97 çeşidinde % 96 iken Mevlütbey çeşidinde % 88 bulunmuştur. 300 Gy’de Osmancık-97 çeşidinde çimlenme yüzdesi % 80 iken Mevlütbey çeşidinde bu oran % 74’tür. Radyasyonun düşük dozlarda çimlenmeyi teşvik ettiği ve yüksek dozlarda doza bağlı olarak çimlenmede azalma meydana

getirdiği bilinmektedir. Çimlenme yüzdelere göre iki çeşit arasında radyasyona karşı verilen cevabın farklı olması, çeşitler arasındaki radyasyon hassasiyet farklılığından kaynaklanmaktadır.

Jiya ve diğ. (2018) FARO-44 ve FARO-60 çeltik (*Oryza sativa* L.) çeşitlerine yatmaya karşı mukavemet kazandırmak için yapmış oldukları mutasyon ıslahı çalışmasında çeltik tohumlarını Cs-137 gama kaynağı ile 0, 50, 100, 150 ve 200 Gy dozlarda ışınlamışlardır. Radyasyon uygulanan tüm bitkilerde artan doza bağlı olarak bitki çimlenme oranlarının azaldığını tespit etmişlerdir. Bu konuda yapılan bir çok araştırmada bitkilerde (bezelye, keten, rezene, arpa) radyasyonun artan dozlarının çimlenme yüzdesini azalttığı araştırmacılar tarafından gösterilmiştir (Kara ve diğ., 2016; Verma ve diğ., 2017; Arıraman ve diğ., 2018; PD ve Dudhe, 2018).

Yüksek dozlarda radyasyonun çimlenme yüzdesini azaltmasına karşılık düşük dozlarda bu etki farklılık göstermektedir. Franco ve diğ. (2017) soya fasulyesi (*Glycine max* L. Merr.) ile yaptıkları çalışmada radyasyonun düşük dozlarda teşvik edici bir etki yaptığını rapor etmişlerdir. Soya tohumlarına Co-60 kaynağı ile 12,5, 25 ve 50 Gy gama radyasyonu uyguladıkları çalışmalarında, düşük dozda gama radyasyonunun bitki çimlenmesi, gelişimi ve verimliliği üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Uyguladıkları 50 Gy radyasyon dozunun bitki çimlenmesini ve hasat edilen tohum sayısını teşvik ettiğini bildirmişlerdir.

Khan ve diğ. (2018) bezelye (*Pisum sativum* L.) ile yapmış oldukları çalışmada gama radyasyonunun çimlenme yüzdesi ve süresi, bitki çiçeklenme ve çiçek olgunlaşma süresi, meyve oluşumu ve olgunlaşma süresi üzerine etkilerini araştırmışlardır. Bezelye tohumlarını Co-60 kaynağı ile 0, 60, 70, 80, 90 ve 100 Gy gama radyasyonu uygulamışlardır. Çalışma sonucunda çimlenme yüzdelinde bir değişim gözlemlenmemiş olup, gama radyasyonun çiçeklenme ve meyve oluşum sürelerini geciktirdiğini tespit etmişlerdir.

Her iki çeltik çeşidi için radyasyonun artan dozlarına bağlı olarak ortalama fide boyu ve kök uzunluğu istatistiksel olarak anlamlı bir azalma göstermiştir. Fide boylarına göre hesaplanan GR₃₀ ve GR₅₀ dozları her iki çeşitte farklılık göstermiştir. Osmancık-97 çeşidi için bu dozlar sırası ile 400 ve 480 Gy olarak, Mevlütbey için ise, sırası ile 260 ve 450 Gy olarak belirlenmiştir. Gama radyasyonunun meydana getirdiği zararlanmalar hücre içerisinde etkileşime girdiği atom veya moleküller ile doğrudan ilgilidir. Özellikle su molekülü ile

etkileşimi sonucu oluşan reaktif oksijen türevleri, hücre zarının bileşenlerine zarar verebilir ve radyasyonun dozuna bağlı olarak bitkinin biyokimyasal süreçlerini etkileyebilir. Biyokimyasal reaksiyonları olumsuz etkilenen bitkilerde hücre döngüsü yavaşlatabilmekte, mitotik bölünme gecikerek bitki gelişimi azalabilmektedir. (Alikamanoğlu, 1999; Popovska ve diğ., 2017; Abdulhafiz ve Zakaria, 2018; Ali ve diğ. 2018; Hong ve diğ., 2018b).

Arıraman ve diğ. (2018) CO-7 güvercin bezelye (*Cajanus cajan* L. Millsp) çeşidine ait 300'er tohumu 150, 200 ve 250 Gy gama radyasyonunu uygulayarak, yaşayan fide sayısı, 30 günlük fide boyu, çiçeklenme gün sayısı, olgunlaşma süresi, bakla sayısı, polen fertilitesi ve 1000 dane ağırlığı parametrelerini değerlendirmişlerdir. Çalışmalarının sonucunda inceledikleri tüm parametrelerde kontrol bitkilerine göre azalma tespit etmişlerdir. Elde ettikleri sonuçları yüksek gama radyasyonunun büyümeyi inhibe edici etkileri ile açıklamışlardır.

PD ve Dudhe (2018) keten (*Linum usitatissimum* L.) tohumlarını Co-60 kaynağı ile 0, 10, 20, 40, 60, 80 ve 100 Gy gama radyasyonuna maruz bırakarak bitkilerin büyüme parametrelerini ve oluşan morfolojik varyasyonları incelemişlerdir. Büyüme parametrelerinin değerlendirilmesinde fide gelişimi, fide boyu ve ağırlığı, internod uzunluğu ve yaprak yüzey alanı değerlerini kullanmışlardır. Çalışma sonucunda çimlenme yüzdesinin, bitki boyunun ve kök uzunluğunun artan radyasyon dozuna bağlı olarak azaldığını internod uzunluğunun ise arttığını rapor etmişlerdir.

Verma ve diğ. (2017) rezene (*Foeniculum vulgare* Mill.) bitkisi üzerine gama radyasyonunun etkilerini araştırdıkları çalışmalarında bitki tohumlarına Co-60 kaynağı kullanarak 150, 175, 200, 225 ve 250 Gy gama radyasyonu uygulamışlardır. Radyasyonun etkilerini hayatta kalan fide sayısı, yaprak sayısı, kök uzunluğu, bitki taze ağırlığı parametreleri üzerinden değerlendirmişlerdir. Gözlemledikleri tüm parametrelerde artan radyasyon dozuna bağlı olarak azalma tespit ettiklerini bildirmişlerdir.

Radyasyonun Tokak-157/37 arpa (*Hordeum vulgare*) ve Karahan-99 buğday (*Triticum aestivum*) çeşidi üzerindeki etkilerini Kara ve diğ. (2016) fide ve kök oluşumu verileri üzerinden değerlendirmişlerdir. Çalışmalarında bitkilere Co-60 kaynağı ile 0, 50, 100, 150, 200, 300, 400, 500 ve 600 Gy gama radyasyonu uygulamışlardır. Çalışmaları sonucunda her iki bitki türünde de kök uzunluğu haricindeki tüm parametrelerin artan radyasyon dozuna bağlı olarak azaldığını rapor etmişlerdir.

Çalışmamızda hedeflenen tuzluluğa toleranslı mutantların seleksiyonunda kullanılmak üzere ilk olarak Osmancık-97 ve Mevlütbey çeltik çeşitlerinin tuzluluğa karşı yanıtları belirlenmiştir. Çeltik bitkilerinin tuza karşı yanıtları; ortalama bitki boyu, yaş ağırlığı, lipid peroksidasyon, prolin birikimi, fotosentetik pigment konsantrasyonları, peroksidaz, superoksit dismutaz, katalaz enzim aktiviteleri değerlerine göre saptanmıştır.

Çalışmamızda, iki haftalık Osmancık-97 ve Mevlütbey çeltik fidelerine 0, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 ve 240 mM NaCl bir hafta süre ile uygulandığında tüm uygulama gruplarında ortalama bitki boyu ve ağırlıkları artan tuz konsantrasyonlarına paralel olarak azalmıştır. Osmancık-97 ve Mevlütbey çeltik çeşitlerinde ortalama bitki boyları, kontrol % 100 kabul edildiğinde, 150 mM NaCl konsantrasyonunda sırasıyla % 62,3 ve % 69,28 ve ortalama bitki yaş ağırlıklarını % 72,73 ve % 75 oranlarına azalmıştır. İstatistiksel olarak kontrole göre anlamlı bir azalmanın görüldüğü 150 mM tuz konsantrasyonunun tuza toleranslı mutant seleksiyonlarında kullanılmasına karar verilmiştir. Tuzluluğun bitkilerde bitki boyu ve ağırlığı, yaprak sayısı ve yüzey alanı, üzerine olumsuz etkileri olduğu pek çok çalışma ile gösterilmiştir (Acosta-Motos ve diğ., 2017; Bacha ve diğ., 2017; Giuffrida ve diğ., 2017; Laghmouchi ve diğ., 2017; Negrao ve diğ., 2017; Belmehdi ve diğ. 2018).

Rahneshan ve diğ. (2018) iki şamfıstığı (*Pistacia vera* L.) çeşidi ile yapmış oldukları çalışmada üç haftalık fidelere 0, 50 (düşük), 100 (orta) ve 150 (yüksek) mM NaCl konsantrasyonlarını 15 gün süre ile uygulamışlardır. Tuzluluğun bitkilerin büyüme parametreleri üzerine etkisi ortalama bitki ve kök uzunluğu ile ortalama kuru ağırlık üzerinden değerlendirilmiştir. Orta ve yüksek konsantrasyonlar olarak uyguladıkları 100 ve 150 mM NaCl konsantrasyonlarında ortalama bitki boylarının ve kuru ağırlıklarının her iki çeşitte de konsantrasyon artışına bağlı olarak azaldığını rapor etmişlerdir. Ayrıca yaprak sayısı ve yüzey alanında azalma ile nekrotik bölgelerin oluştuğunu da gözlemlediklerini bildirmişlerdir.

Bakla bitkisi (*Vicia faba* L.) ile yapmış olduğu çalışmada Qados (2011), 6 haftalık bitkilere üç günde bir verilmek üzere 0, 60, 120 ve 240 mM NaCl'yi bitkiler 90 günlük olana kadar uygulamıştır. Büyüme parametreleri olarak bitki boyu, bitki yaş ve kuru ağırlığı, yaprak sayısı ve yüzey alanını, biyomoleküler etkisini ise, osmotik potansiyel, klorofil miktarı ve protein miktarı üzerinden değerlendirmiştir. Çalışma sonucunda tuz stresinin düşük konsantrasyonlarda ortalama bitki boyunu arttırdığını, yüksek konsantrasyonlarda ise, belirgin azalmalar olduğunu bildirmiştir. Çalışmasında yaprak sayısı ve yüzey alanı, düşük

konsantrasyonlarda kontrole göre değişim göstermezken, yüksek konsantrasyonlarda azalma sergilemiştir.

Altı farklı eltik çeşidinin tuz toleransının araştırıldığı çalışmada Mekongga, Banyuasin, Madura, Ciherang, Inpara-3 ve Inpari 13 eltik çeşitlerine 0, 50, 100, 150 ve 200 mM konsantrasyonlarında NaCl uygulanmıştır (Hariadi ve diğ., 2015). Saksılarda yetiştirdikleri 21 günlük bitkilere dört hafta boyunca uyguladıkları tuz stresinin ortalama bitki boyu ve yaprak yüzeyi üzerine etkilerini haftalık olarak tespit etmişlerdir. alışmalarının sonucunda 6 eltik çeşidinin tamamında artan tuz konsantrasyonuna ve süreye bağlı olarak ortalama bitki boylarının azaldığını rapor etmişlerdir.

Rahman ve diğ. (2016) farklı aromatik eltik çeşitlerinde tuz stresinin büyüme parametreleri üzerine etkilerini değerlendirmişlerdir. alışmalarında BRRI dhan34, BRRI dhan38, Binadhan-9, Binadhan-13, Kalijira ve Rajbhogh eltik çeşitlerini kullanmışlardır. 0, 25, 50, 75 ve 100 mM NaCl'nin büyüme parametreleri üzerine etkileri 30, 45, 60, 75 ve 90 günlük gelişim dönemlerinde incelenmiştir. Çalışma sonucunda 45 ve 90 gün aralığında ortalama bitki boylarının azalan bir profil sergilediğı ve en düşük ortalama bitki boyunun 100 mM NaCl konsantrasyonunda saptandığı bildirilmiştir.

Ologondudu ve diğ. (2014) toprak elektrik iletkenliğini 0, 5, 10, 15 dS.m⁻¹ değerlerine ulaştıracak tuzluluk seviyeleri uyguladıkları NERICA 1, NERICA 5, NERICA 12, NERICA 19, IR29, IR20, IWA 11 ve Pokkali eltik çeşitlerinin büyüme parametrelerini (ortalama sürgün ve kök uzunluğu, ortalama sürgün ve kök kuru ağırlığı) araştırmışlardır. alışmalarının sonucunda incelemiş oldukları tüm eltik çeşitlerinde, bütün büyüme parametrelerinin artan tuz konsantrasyonuna paralel olarak azaldığını saptamışlardır.

Bitki biyoteknolojisi alanında, çeşitli abiyotik ve biyotik streslerin bitkiler üzerinde meydana getirdiğı fizyolojik etkiler lipid peroksidasyon, prolin birikimi, fotosentetik pigment konsantrasyonu, total protein konsantrasyonu tayini ve çeşitli antioksidan enzimlerin aktivitelerinin belirlenmesi gibi biyokimyasal analizler ile değerlendirilmektedir (Demiral ve Türkan, 2004; Ardıç ve diğ. 2009; Şen ve Alikamanoğlu, 2012; Murshed ve diğ., 2013; Hossain ve diğ., 2014; Sekman ve diğ., 2014; Mostofa ve diğ., 2015; Chunthaburee ve diğ., 2016; Ramesh ve diğ., 2017).

Abiyotik ve biyotik stres faktörleri oksidatif strese sebep olarak, bitkilerde hücre mebranlarının yapısında yer alan doymamış yağları oksitleyerek lipid peroksidasyonuna sebep olurlar. Lipid peroksidasyonu, hücre zarının bütünlüğünün zarar görmesine, membran proteinlerinin yıkımına ve hücre iyon taşınımının azalmasına sebep olur. Stresin uzun süre devam etmesi veya şiddetinin yüksek olması durumunda hücre ölümünü tetikleyebilir (Awasthi ve diğ., 2017). Hücre zarında yer alan lipidlerin oksitlenmesinin yan ürünü olan malondialdehitin stres altındaki bitkilerde arttığını bildiren pek çok çalışma yapılmıştır (Savicka ve Skute, 2010; Du ve diğ., 2010; Ma ve diğ., 2012; Zhang ve diğ., 2014; Saha ve diğ., 2016).

Çalışmamızda ilk olarak Osmancık-97 ve Mevlütbey çeltik çeşitlerinin 0, 30, 90, 150 ve 210 mM NaCl stresi altında iken lipid peroksidasyon ürünü olan MDA miktarları saptanmıştır. Her iki çeltik çeşidinde de artan tuz konsantrasyonuna bağlı olarak 90 mM ve daha yüksek tuz konsantrasyonlarında MDA birikimi istatistiksel olarak önemli artış göstermiştir. Her iki çeltik çeşidinde de en yüksek MDA değerleri 210 mM NaCl uygulanmış deney gruplarında tespit edilmiştir. Osmancık-97 çeltik çeşidinde MDA oranları tüm tuz konsantrasyonlarında Mevlütbey çeşidine oranla daha düşük bulunmuştur.

Bitkiler yaşamları boyunca maruz kaldıkları biyotik ve abiyotik streslere karşı enzimatik ve enzimatik olmayan savunma mekanizmaları geliştirmiştir. Düşük molekül ağırlıklı, hücre içerisinde çözünürlüğü yüksek, yüksek konsantrasyonlarda ise, toksik etki göstermeyen organik moleküller olan osmoprotektanlar, enzimatik olmayan savunma mekanizmalarının önemli bileşenleridir. Prolin, sukroz, polioller, trehaloz, glisin betain, alinin betain, prolin betain başlıca osmoprotektanlar arasındadır (Verbruggen ve Hermans, 2008; Mattioli ve diğ., 2009; Hayat ve diğ., 2012).

Prolinin birçok bitki çeşidinde kuraklık (Per ve diğ., 2017), tuzluluk (Nxele ve diğ., 2017), düşük sıcaklık (Soda ve diğ., 2015), ağır metal stresi (Emamverdian ve diğ., 2015), UV radyasyon (Reddy ve diğ., 2017) gibi abiyotik çevresel stres faktörlerine karşı yanıt olarak bitki içerisinde birikim gösterdiği bildirilmiştir. Prolin birikimi hücresel yapıların bütünlüğünü korumada etkilidir. Serbest radikallerin yok edilmesine yardımcı olarak stres altında hücresel redoks potansiyelinin sağlanmasına katkı sağlamaktadır (Hayat ve diğ., 2012).

Araştırmada Osmancık-97 ve Mevlütbey çeltik çeşitlerinin 0, 30, 90, 120, 150 ve 210 mM NaCl konsantrasyonlarına verdiği biyokimyasal cevapların belirlenmesinde prolin birikimi

değerlendirilmiştir. Her iki çeltik çeşidinde de 30 mM NaCl uygulamasının ardından istatistiksel olarak anlamlı artış gözlenmezken, bu konsantrasyonun üzerinde incelenen tüm konsantrasyonlarda istatistiksel olarak anlamlı artışlar tespit edilmiştir.

Tuzluluk iyon homeostazisinde bozulmalara sebebiyet vererek fizyolojik olarak bitkilerin su almasını engeller. Bu durum fizyolojik pek çok süreci etkileyerek büyüme ve gelişimi yavaşlatır. Etkilenen fizyolojik süreçlerin başında fotosentez mekanizması gelmektedir.

Yapılan çalışmalar tuz stresi altında, fotosentetik mekanizmanın foton enerjisini yakalayan fonksiyonel birimleri olan klorofil pigmentlerinin konsantrasyonunun önemli ölçüde azaldığını göstermektedir (Sayyad-amin ve diğ., 2016; Jamil ve diğ., 2012; Kong-ngern ve diğ., 2012; Amirjani, 2011). Fotosentez bitkilerde en önemli metabolik enerji kaynağıdır. Tuzluluk klorofil yıkımını sağlayan klorofilaz enzim aktivitesini arttırsa da, klorofil yıkım miktarı bitkinin tuzluluğa olan toleransına göre değişkenlik göstermektedir. Bu sebeple fotosentetik pigment konsantrasyonu abiyotik stres toleransında biyokimyasal indikatör olarak kullanılmaktadır (Gong ve diğ., 2018).

Gong ve diğ. (2018) halofit bir bitki olan *Kalidium foliatum* bitkisi ile yapmış oldukları çalışmada 4 aylık bitkilere 10 gün boyunca 0, 100, 250, 400, 500 mM NaCl, Na₂SO₄ ve NaCl+Na₂SO₄ kombinasyonunu uygulamışlardır. Fotosentetik pigment konsantrasyonlarını değerlendirdiklerinde klorofil b, total klorofil ve karotenoid pigment konsantrasyonlarının tuz uygulamalarından sonra arttığını, sadece klorofil a pigmentinin azaldığını rapor etmişlerdir.

Jamil ve diğ. (2012) tuzluluğun Shaheen Basmati, Basmati-385 ve NIAB-IR 9 çeltik çeşitlerinin fizyolojik ve biyokimyasal karakterleri üzerine etkilerini araştırdıkları çalışmalarında 15 günlük fidelere 0, 50, 100 ve 150 mM NaCl uygulamışlardır. Her üç çeltik çeşidine ait sonuçlarda klorofil a ve klorofil b konsantrasyonlarının uygulanan tüm NaCl dozlarında azaldığını saptamışlardır.

Tarom Azmoon çeltik çeşidine 14 gün boyunca 200 mM NaCl uygulayan Amirjani (2011), bitki gelişimi, rölatif su miktarı, fotosentetik pigment konsantrasyonu ve fotosentez etkinliği, şeker miktarı, enzim aktiviteleri bakımından çeltikleri değerlendirmiştir. Çalışma sonucunda klorofil b'nin % 41 oranında, klorofil a'nın ise % 33 oranında azaldığını bildirmiştir. Total klorofil pigment konsantrasyonu olarak değerlendirildiğinde azalma % 35 seviyesinde bulunmuştur. Karotenoid pigment konsantrasyonu tuz uygulamasının ardından % 39 azalmıştır.

Çalışmamızda ise Osmancık-97 ve Mevlütbey çeltik çeşitlerinin ele alınan NaCl konsantrasyonlarına verdiği biyokimyasal cevapların belirlenmesinde fotosentetik pigment konsantrasyonları değerlendirilmiştir. Her iki çeltik çeşidinde de artan NaCl konsantrasyonuna bağlı olarak istatistiksel olarak anlamlı azalmalar gözlemlenmiştir.

Tuz stresi farklı bitki türlerinde ve türlerin çeşitleri arasında total protein konsantrasyonu üzerinde değişen etkiler sergilemektedir. Birçok araştırmacı tuz stresinin bitkilerde protein sentez hızını azalttığını, protein hidrolizi yapan enzimlerin aktivitelerinin arttığını, amino asit miktarlarının azaldığını, amino asit ve protein sentezi ile ilişkili enzimlerin denatüre olduğunu bildirmektedir (Kong-Ngern ve diğ., 2005; Amirjani, 2010). Buna karşılık tuz stresi altında bitkilerin total protein konsantrasyonlarının çalışılan dokuya ve bitkinin tuz tolerans düzeyine bağlı olduğunu, tuz stresi ile ilişkili proteinlerin ve bu proteinlerin rol aldığı metabolik yollardaki enzimlerin anlatımının artabileceği de rapor edilmiştir (Dubey, 1999; Sharma ve Dubey, 2016).

Araştırmaya konu olan Osmancık-97 ve Mevlütbey çeltik çeşitlerinin 0, 30, 90, 150 ve 210 mM NaCl stresi altında total protein konsantrasyonları saptanmıştır. Her iki çeltik çeşidi de artan tuz konsantrasyonuna bağlı olarak total protein konsantrasyonlarında istatistiksel olarak önemli artış göstermiştir. Her iki çeltik çeşidinde de en yüksek protein konsantrasyonu değerleri 210 mM NaCl uygulanmış deney gruplarında tespit edilmiştir. Osmancık-97 çeltik çeşidinde protein konsantrasyon oranları tüm tuz konsantrasyonlarında Mevlütbey çeşidine oranla daha yüksek bulunmuştur.

Lutts ve diğ. (1996) farklı tuz toleransına sahip Aiwu (orta düzeyde toleranslı), Nona Bokra (toleranslı) ve IKP (hassas) çeltik çeşitleri ile yapmış oldukları çalışmada, 25 günlük bitkilere 0, 30 ve 50 mM NaCl stresini 28 gün boyunca uygulamışlardır. Çalışmalarında genç ve yaşlı yapraklara ait protein konsantrasyonlarını haftalık olarak tespit etmişlerdir. Tuz stresi uygulanmamış genç ve yaşlı yapraklar arasında protein konsantrasyonu bakımından istatistiksel bir fark tespit etmemişlerdir. Tuza karşı hassas olan IKP çeşidinde; tuz stresi uygulanan tüm sürelerde protein konsantrasyonu azalmış ve bu azalış genç yapraklarda yaşlı yapraklara göre daha fazla olmuştur. Tuza orta düzeyde toleranslı Aiwu çeşidinde istatistiksel bir fark görülmezken, tuza toleranslı Nona Bokra çeşidinde tuz stresinin ilk yedi gününde protein konsantrasyonları artmış ve 14. günde kontrol seviyesinin altına düşmüştür. Tuz stresinin ilk

yedi gününde protein konsantrasyonundaki artış genç yapraklarda yaşlı yapraklara göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

Benzer şekilde Kumar ve diğ. (2009) 0, 50, 100, 150, 200, 250 ve 300 mM NaCl konsantrasyonlarını 14 günlük Panvel-3 (toleranslı), Kalarata (orta düzeyde toleranslı) ve Karjat-3 (hassas) çeltik çeşitlerine uygulamışlardır. Çalışmalarının sonucunda tuza karşı hassas Karjat-3 çeşidinde protein konsantrasyonu yapraklarda tüm tuz uygulamalarında azalırken, köklerde 150 mM'a kadar artış göstermiştir. Tuza orta düzeyde toleranslı Kalarata ve toleranslı Panvel-3 çeşitlerinde ise, köklerdeki protein konsantrasyonları uygulanan tüm tuz konsantrasyonlarında azalırken, yapraklarda 150 mM NaCl konsantrasyonuna kadar artışlar göstermiştir. Yaptıkları proteomik belirlemelere göre, tuz stresi altında tuza toleranslı çeltik çeşitlerinde osmotik etkiye karşı cevap veren proteinlerin anlatımının belirli tuz konsantrasyonlarına kadar arttığını, tuza hassas çeşitlerde ise, bu durumun görülmediğini rapor etmişlerdir.

Serbest radikaller ve reaktif oksijen türevleri biyolojik redoks reaksiyonlarının kaçınılmaz yan ürünleridir. Reaktif oksijen türevlerinin miktarındaki artış ise stres altındaki bitkinin en yaygın göstermiş olduğu belirtileridir. Bitkiler ve diğer tüm canlılar evrimsel süreçte reaktif oksijen türevleri ile baş edebilmek için çeşitli antioksidan enzimler geliştirmişlerdir. Antioksidan enzim kapasitesinin yüksek olması bu reaktif oksijen türevlerini kısıtlayarak metabolizmada oksidatif zararlanmayı önlemede son derece önemlidir. Son yıllarda antioksidan enzimleri kodlayan genlerin anlatımının gen transferleriyle sağlandığı ve/veya arttırıldığı transgenik çeşitlerde tuzluluk gibi abiyotik stres etmenlerine karşı tolerans geliştiği birçok çalışmada rapor edilmektedir (Arora ve diğ., 2002; Badavi ve diğ., 2004; Wang ve diğ., 2004; Lu ve diğ., 2007; Motohashi ve diğ., 2007; Melchiorre ve diğ., 2009; Guan ve diğ., 2012).

Peroksidaz demir atomu içeren glikoprotein yapıda bir enzimdir. Lignin ve etilen biyosentezi, patojenlere ve yaralanmaya karşı savunma, oksin metabolizmasını düzenleme ve antioksidan savunma gibi görevleri bilinmektedir (Kim ve diğ., 1999). Peroksidaz, H_2O_2 gibi reaktif oksijen türevlerinin dehidrogenasyon reaksiyonlarını katalizleyerek hücreleri oksidatif zararlanmadan korur (Vianello ve diğ., 1997). Antioksidan enzim aktiviteleri sürekli olarak yüksek değerlerde olan bitki çeşitlerinin tuzluluğa karşı tolerans gösterdikleri bildirilmiştir. (Hernandez ve diğ., 1999; Sairam ve Srivastava, 2002; Meloni ve diğ., 2003).

Çalışmamızda tuz stresi Osmancık-97 ve Mevlütbey çeltik çeşitlerinde uygulanan tüm konsantrasyonlarda kontrole göre peroksidaz enzim aktivitelerinde artışa sebep olmuştur. En yüksek peroksidaz aktivitesi her iki çeltik çeşidinde de 150 mM tuz konsantrasyonunda saptanmış olup, bu artışlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

Süperoksit dismutaz enzimi Cu, Zn, Mn veya Fe gibi elementleri kofaktör olarak kullanan bir metalloproteindir. $\bullet\text{O}_2^-$ moleküllerinin H_2O_2 ve O_2 dönüşümünü katalizleyerek reaktif oksijen türevlerine karşı ilk savunma rolünü üstlenir. Oksijen metabolizmasına sahip tüm hücrelerde kloroplast, mitokondri, nukleus, peroksizom, apoplast gibi çok çeşitli organellerde ve sitoplazmada bulunur (Alscher ve diğ., 2002; Fink ve Scandalios, 2002). SOD ve izoformlarının tuz stresi altında hem tuz toleranslı hem de tuza hassas çeltik çeşitlerinde artabileceği ifade edilmiştir (Mishra ve diğ., 2013). Bununla birlikte, tuz stresi altında, tuzluluğa toleranslı çeltik çeşitlerinin yapraklarında ve köklerinde SOD aktivitesinin arttığı, hassas çeşitlerde ise azaldığı da bildirilmiştir (Dionisio-Sese ve Tobita, 1998; Hernandez ve diğ., 2000; Shalata ve diğ., 2001). Sairam ve diğ. (2005) tuza toleranslı buğday (*Triticum aestivum*) hatları Kharchia ve KRL19 da tuz stresi altında SOD aktivitesinin arttığını, tuzluluğa hassas hatlar olan HD2687 ve HD2009 da azaldığını rapor etmişlerdir. Bu durum SOD aktivitesinin bitki türü, stres süresi, stresin uygulanış şekli, analizde kullanılan bitki dokusu gibi farklı parametrelerden etkilenebileceğini göstermektedir.

Osmancık-97 ve Mevlütbey çeltik çeşitlerine uygulanan tüm NaCl konsantrasyonlarında, tuz stresinin artışına bağlı olarak kontrole göre SOD aktivitesinde istatistiksel açıdan anlamlı artışlar saptanmıştır. 210 mM NaCl uygulanan Osmancık-97 çeltik çeşidine ait bitkilerde SOD aktivitesi, tuz stresi uygulanmamış bitkilere göre 9,04 kat artarken, Mevlütbey çeltik çeşidinde aynı konsantrasyonda SOD aktivitesi 7,38 kat artmıştır.

Katalaz enzimi tek hücreli prokaryotlardan çok hücreli ökaryotlara kadar tüm canlılarda bulunan, hidrojen peroksiti su ve oksijene parçalayan bir enzimdir. Hem oksijen metabolizması sonucu oluşan, hem de oksidatif stres altında süperoksit dismutaz tarafından yan ürün olarak oluşturulan hidrojen peroksidi parçalar (Sharma ve Ahmad, 2014). CAT enzimi bu yolla lipid peroksidasyonunu önleyerek hücre membran zararlanmasını ve klorofil yıkımını azaltır (Smirnoff, 1993; Foyer ve diğ., 1994).

Uyguladığımız tuz stresi, Osmancık-97 çeşidinde 150 mM NaCl konsantrasyonuna kadar katalaz enzim aktivitesinde artışa sebep olmuştur. 150 mM NaCl uygulanmış bitkilerde katalaz aktivitesi, kontrol bitkilerine göre 3,42 kat artmıştır. 210 mM tuz konsantrasyonunda ise CAT aktivitesi azalarak kontrol ile aynı düzeye inmiştir. Mevlütbey çeşidinin katalaz enzim aktiviteleri tüm tuz uygulamalarında Osmancık-97 çeşidine göre daha düşüktür. Mevlütbey çeşidinde 150 mM tuz uygulamasının katalaz enzim aktivitesi, kontrol bitkilerine göre 4,72 kat artmıştır.

Sahu ve diğ. (2010) Indica çeltik çeşidi olan Ratna ile yapmış oldukları çalışmada 10 günlük çeltik fidelerine 4 gün süre ile 300 mM NaCl uygulamışlardır. Çalışma sonucunda katalaz aktivitesinin tuz uygulanan örneklerde % 55 oranında azaldığını rapor etmişlerdir. Çalışmalarında, CAT enzim aktivitesinde tespit etmiş oldukları düşüşe rağmen, protein seviyelerinin aynı kalması ve ölçülen H₂O₂ seviyelerinin artmamasını tuz stresi altında çeltik bitkisinin H₂O₂ yok edilmesinde etkili olan POX, APX, NADPH oksidaz gibi diğer antioksidan enzim aktivitelerindeki artış ile olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Tuz stresi altındaki çeltik bitkilerinde NADPH oksidaz enzim aktivitesinin kontrol bitkilerine göre 1,5 kat arttığını belirtmişlerdir.

Yamane ve diğ. (2010) 3 haftalık çeltik fidelerine hidrofonik ortamda 0, 24, 48 ve 72 saat sürelerde 200 mM NaCl'ye maruz bırakmış ve katalaz enziminden sorumlu *catA*, *catB* ve *catC* genlerinin anlatımlarını incelemişlerdir. Stres uygulanmış bitkilerin yapraklarında uygulanan sürelerin hiçbirinde *catA* gen anlatımı tespit etmemişlerdir. *catB* gen anlatımının kontrol bitkilerinde 24, 48 ve 72. saatlerde azaldığını, ancak tuz uygulanan yapraklarında tüm saatlerde anlatımın artış gösterdiğini bildirmişlerdir. *catC* anlatımının ise 48. saate kadar artış gösterdiğini, 72. saatte ise, kontrol seviyesinin üzerinde anlatım olmasına rağmen 48. saate göre bir azalmanın meydana geldiğini belirtmişlerdir.. Bu sonuçlar çerçevesinde *catB* ve *catC*'nin tuz toleransında etkili olduğunu, ancak *catC*'nin tuz uygulaması ile birlikte apikal dokularda anlatımının azaldığını ifade etmişlerdir. *catB* ve *catC* transkript birikiminin tuz stresi altında iken, bazal dokularda yüksek ve apikal dokularda düşük olmasının bu iki genin anlatımının ancak dokunun gelişim evresi ile bağlantılı olabileceği ile açıklanabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Çeltik bitkisinde tuza toleranslı mutantların seleksiyonu hem in vivo, hem de in vitro koşullarda yapılmıştır. Çalışmamızda tuza toleranslı çeltik mutantlarını seçmek için in vivo koşullarda 150

mM'lık NaCl konsantrasyonu kullanılmıştır. Seçilen mutantların tuza tolerans düzeyleri in vitro koşullarda ise, kallus kültürleri ile doğrulanmıştır.

In vitro ortamlarda kallus kültürlerinin kurulmasında, kullanılacak yüzey sterilizasyonu yöntemi, eksplant türü ve eksplantların ekileceği besi yerlerinin içerikleri kullanılacak bitki türü ve çeşidine uygun olarak optimize edilmesi, çalışmaların başarısını arttırmakta önemli rol oynamaktadır. Bu nedenle, farklı çeltik çeşitleri ile çalışan birçok araştırmacı yüzey sterilizasyonu amacı ile farklı süre ve konsantrasyonlarda ticari çamaşır suyu (NaOCl) ve civa klorür (HgCl₂) çözeltilerini kullanarak başarı elde ettiklerini bildirmiştir (İlahi ve diğ., 2005; Ramesh ve diğ., 2009; Wani ve diğ., 2011; Shobhana ve diğ., 2018; Shukla ve Ojha, 2018).

Çalışmamızda farklı süre ve konsantrasyonlarda uygulanan ticari çamaşır suyu uygulamalarının ardından en başarılı sonuçlar % 40 ticari çamaşır suyunun 30 dakika süre ile uygulanması ile elde edilmiştir. Osmancık-97 ve Mevlütbey çeltik çeşitlerine ait kallus kültürlerinin kurulmasında eksplant olarak tohumda yer alan embriyolar ve çimlenen tohumlardan elde edilen sürgünler denenmiştir. Farklı eksplantlardan kallus oluşumunun teşviki için değişen konsantrasyonlarda 2,4-D, kinetin, prolin içeren MS besi yerleri kullanılmıştır. Denemelerde en başarılı sonuçlar, embriyo eksplantlarının 0,5 mg/L kinetin, 560 mg/L prolin ve 2 mg/L 2,4-D ile desteklenmiş MS besi yerine ekilmesi ile elde edilmiştir.

Wani ve diğ. (2011) çeltik tohumlarının embriyoları ile kurdukları kallus kültürlerinde prolin miktarlarını sabit tutarak farklı konsantrasyonlarda 2,4-D ve kinetin ile destekledikleri MS besi yerlerini karşılaştırmışlardır. En başarılı kallus oluşumunu % 44,4'lük oran ile 2,5 mg/L 2,4-D ve 0,5 mg/L kinetin ile desteklenen MS besi yerinde sağladıklarını bildirmişlerdir.

Shukla ve Ojha (2018) çeltikten embriyonik kallus gelişimi için farklı konsantrasyonlarda 2,4-D, kinetin, NAA, BAP ile destekledikleri MS besi yerlerini karşılaştırmışlardır. Kullandıkları Swarna *Sub1* çeşidinde en yüksek embriyonik kallus oluşum oranını % 80 ile 1,5 mg/L 2,4-D ve 0,5 mg/L BAP kullandıkları besi yerlerinde tespit etmişlerdir. Ayrıca, 2,4-D ve kinetin içerikleri farklılık gösteren 15 besi yerini de incelemişlerdir. Araştırılan besi yerleri arasında en yüksek embriyonik kallus oluşumunu 1,5 mg/L 2,4-D ve 0,5 mg/L kinetin ilave edilen MS besi yerinde ve % 66,67 oran ile elde etmişlerdir.

Dört farklı çeltik çeşidi ile Binte Mostafiz ve Wagiran (2018) tarafından yapılan çalışmada, farklı konsantrasyonlarda 2,4-D ve NAA ile desteklenen MS, N6 ve LS besi yerleri

karşılaştırılmıştır. Çalışmalarında en başarılı kallus oluşum oranını 3 mg/L 2,4-D ile destekledikleri MS besi yerinde elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Khattak ve diğ. (2017) çeltik bitkisinde somatik embrijogenez ve bitki rejenerasyonu elde etme çalışmalarında farklı konsantrasyonlarda IAA, NAA, BA, 2,4-D, kinetin ile destekledikleri MS, Gamborg's B5, LS besi yerlerini kallus teşviki için denemişlerdir. MS besi yerinde en yüksek kallus oluşumunun 10 μ M 2,4-D ve 2 μ M kinetin ilavesi ile olduğunu rapor etmişlerdir. Besi yeri bileşenlerini sabit tutup sadece MS inorganiklerini Gamborg's B5 ve LS inorganikleri ile değiştirdiklerinde, kallus yaş ağırlığı bakımından en yüksek değerleri sırası ile MS, Gamborg's B5 ve LS inorganikleri ile elde ettiklerini bildirmişlerdir.

M₃ generasyonunda in vivo koşullarda seçilen Osmancık-97 çeşidine ait 43 ve Mevlütbey çeşidine ait 43 olmak üzere 86 tuza toleranslı mutant bitki seçilmiştir. M₄ generasyonunda ise in vitro koşullarda tuz seleksiyonu yapılmıştır. Tuz stresi uygulanmamış kontrollere göre tuz stresi altındaki kallus kültürlerinden elde edilen ve tuza en yüksek toleransı gösteren Osmancık-97'den geliştirilen 4 mutant (250-2, 300-5, 400-2 ve 400-5) seçilmiştir. Bu mutantlar, 150 mM NaCl içeren besi yeri ortamında NaCl içermeyen kontrollerine kıyasla % 100'den daha fazla yaş ağırlığa sahip kallus oluşturan mutantlardır. Bu mutantların biyokimyasal, genomik ve proteomik karakterizasyonları yapılarak tuza toleranslılıkları gösterilmiştir.

Seçilen dört mutantın biyokimyasal özelliklerini ortaya koymak amacı ile yapılan analizler, mutantların tuza toleranslı olduğunu göstermiştir. Osmancık-97 ve bu çeşitten gama radyasyonu ile elde ettiğimiz 150 mM NaCl toleranslı mutantların lipid peroksidasyon oranları belirlenmiştir. Tuz stresi uygulanmış Osmancık-97 ile tuz stresi uygulanmış mutantlar arasında istatistiksel bakımdan anlamlı farklılıklar gözlemlenmiştir. Ancak tuz stresi uygulanmış 300-5, 400-2 ve 400-5 mutantları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmemiştir. Benzer şekilde tuz stresi uygulanmamış Osmancık-97 ve tuz stresi uygulanmamış dört mutant arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmemiştir. Mutantlar arasında en düşük lipid peroksidasyon değeri 250-2 mutantındadır. Hernandez ve Almansa (2002) lipid peroksidasyonun tuzluluk ile meydana getirilen oksidatif stres sonucu arttığını ve bu parametrenin hücresel düzeyde tuz stresi indikatörü olarak kullanılabileceğini rapor etmiştir. Araştırmamızda stres uygulanan mutantların lipid peroksidasyon seviyelerinin stres uygulanmış Osmancık-97'ye kıyasla daha düşük olması, in vivo ve in vitro ortamlarda 150 mM

NaCl toleransı gösteren bu mutantların toleranslılığı ile Hernanzdez ve Almansa (2002)'nin çalışması biyokimyasal olarak paralellik göstermektedir.

Hazman ve diğ. (2015) yabancı tip Nihonmasari çeltik çeşidi ve tuza karşı olan hassasiyeti bu çeşitten daha düşük iki mutant (cpm2 ve hebiba) ile yapmış oldukları çalışmada 285 mM gibi yüksek konsantrasyonda ki NaCl'ye kısa süre (24 saat) ve daha düşük konsantrasyonda (100 mM) ise uzun süre (72 saat) tuz stresi uygulamışlardır. Her iki uygulama yönteminde de tuz hassasiyeti yabancı tip çeltiğe göre, daha düşük tuz hassasiyetine sahip olan cpm2 ve hebiba mutantlarının lipid peroksidasyon değerlerinin yabancı Nihonmasari çeşidine göre düşük olduğunu bildirmişlerdir. Bu bitkilerin yapraklarında kıvrılma, solma ve nekrotik bölge meydana gelme oranlarında daha düşük olduğunu ifade etmişlerdir.

Çalışmamızda, Osmancık-97 çeşidi ile 150 mM NaCl toleranslı olduğu tespit edilmiş olan dört mutantın prolin birikim oranları incelenmiştir. Tuz stresi uygulanmamış mutantların prolin birikimleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmezken, tüm mutantların prolin miktarları; tuz stresi uygulanmamış Osmancık-97 çeşidine göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde artmıştır. Ayrıca tuz stresi uygulamasının ardından, mutant bitkilerdeki prolin birikimi tuz stresi uygulanmış Osmancık-97 çeşidine göre istatistiksel olarak anlamlı artış göstermiştir.

Chutipaijit ve diğ. (2011) yüksek prolin ve antosiyanin seviyelerinin indica çeltik çeşidi tuz toleransı açısından etkilerini araştırdıkları çalışmalarında in vitro koşullarda 100 mM NaCl stresini 4 gün boyunca uygulamışlardır. Çalışmalarının sonucunda antosiyanin ve prolin birikimi bakımından yüksek değerler gösteren toleranslı çeltiklerde lipid peroksidasyon seviyelerinin tuzluluğa hassas çeşitlerden daha düşük olduğunu rapor etmişlerdir.

Poustini ve diğ. (2007) tuz hassasiyetleri farklı olan 30 buğday çeşidi ile yapmış oldukları çalışmada 5 g.L⁻¹ ($\cong$ 86 mM) NaCl uyguladıkları deney gruplarının tamamında prolin birikimi bakımından artış saptamışlardır. Bu artış en toleranslı çeşit ile en hassas çeşit arasında 27,4 kat değişiklik gösterirken, ortalama artış ise, 5,2 kat olarak tespit edilmiştir.

Tunus'a özgü 17 domates çeşidine hidrofonik yetiştirme koşullarında birinci gün 50 mM, ikinci gün 100 mM ve üçüncü gün 150 mM olmak üzere NaCl stresi uygulanmıştır (Gharsallah ve diğ., 2016). Uygulama 12 gün devam etmiş ve bitkilerin tuz toleranslarını belirlemek üzere

prolin miktarları incelenmiştir. Tuzluluğa toleranslı San miguel çeşidinde prolin konsantrasyonunun erken gelişim evresinde, uygulamanın 6. saatinde en yüksek değerine ulaştığı ve gelişimin geç evrelerinde birikimin artmaya devam ettiği bildirilmiştir.

Joseph ve diğ. (2015b) yedi farklı çeltik çeşidi ile yapmış oldukları çalışmada 45 günlük bitkilere 10 mM NaCl konsantrasyonundan başlayarak 40 gün içerisinde 200 mM NaCl konsantrasyonuna kadar arttırarak stres uygulamışlardır. Tüm deney gruplarında artan NaCl konsantrasyonuna bağlı olarak prolin birikiminin arttığını saptamışlardır.

Çin’de yetişen yabancı tip ve kültür soya fasulyesi çeşitlerini karşılaştırdıkları çalışmada Wu ve diğ. (2014), Hoagland besin solusyonu ile 5 gün boyunca yetiştirdikleri bitkilere daha sonraki yedi gün boyunca 0, 50, 100, 200 ve 300 mM NaCl uygulamışlardır. Abiyotik stres altında prolin birikiminin bitkide ki su potansiyelinin dengelenmesinde görev aldığını ve proteinlerin yapısına bağlanarak protein yapısının korunmasını sağlayan şaperonlar olarak görev yaptıklarını bildirmişlerdir. Yaptıkları bu çalışmada 100 mM NaCl konsantrasyonunun üzerindeki tüm NaCl konsantrasyonlarında prolin birikiminde artış tespit etmişlerdir.

Mutant bitkilerin tamamında fotosentetik pigment konsantrasyonları Osmancık-97 çeşidinden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur. Tuz uygulamasının ardından mutant bitkilerde kendi kontrollerine göre azalma görülse de, tuz stresi uygulanan tüm mutantların fotosentetik pigment konsantrasyonları stres uygulanmamış Osmancık-97 çeşidinden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur. Özellikle mutant 300-5 ve 400-2 fotosentetik pigmentler açısından Osmancık-97’den istatistiksel olarak anlamlı oldukça yüksek değerler göstermiştir.

Chutipaijit ve diğ. (2011) ile Khan ve Abdullah (2003), tuzluluğa toleranslı çeltik çeşitlerinde fotosentetik pigmentlerin tuzluluğa hassas çeltik çeşitlerine göre daha iyi korunduğunu bildirmişlerdir. Bu durum in vivo ve in vitro olarak 150 mM NaCl toleranslı bulunan çeltik mutanlarımızın tuz toleransını biyokimyasal olarak desteklemektedir.

Osmancık-97 çeşidinden gama radyasyonu ile elde edilen ve tuz stresi uygulanmayan 250-2, 300-5, 400-2 ve 400-5 mutantlarında Osmancık-97 çeşidinden daha yüksek peroksidaz enzim aktivitesi değerleri saptanmıştır. Tuz uygulamasının ardından Osmancık-97 çeşidinin enzim aktivitesi 1,96 kat yükselirken, mutantların aktivite değerleri sırasıyla 3,03, 3,30, 3,23 ve 2,94

kat artmıştır. Tuz stresi altındaki 300-5 ve 400-2 mutantlarında SOD enzim aktivite değerleri diğer mutantlara göre istatistiksel açıdan daha yüksektir.

Tuzluluğa toleranslı Pokkali ve tuzluluğa hassas MI 48, Annapoorna, Jyothi çeltik çeşitleri ile yapmış olduğu çalışmada Swapna (2003), çimlenme, fide, çiçeklenme dönemlerindeki bitkilere ve embriyonik kallus dokularına 100 mM NaCl'yi 48 saat süre ile uygulamıştır. Çalışmanın sonucunda tuzluluğa toleranslı Pokkali çeşidinde, peroksidaz ve süperoksit dismutaz enzim aktivitelerinin bitkilerin tüm gelişim dönemlerinde hassas olan çeşitlerine göre yüksek olduğunu bildirmiştir.

Aghaei ve diğ. (2009b) tuzluluğa hassas Concord ve toleranslı Kennebec patates çeşitlerine 30, 60, 90 ve 120 mM NaCl'yi 4 hafta boyunca uygulamışlardır. Analiz etmiş oldukları tüm antioksidan enzim seviyelerinin tuzluluğa toleranslı Kennebec çeşidinde, hassas olan Concord çeşidine göre daha yüksek olduğunu rapor etmişlerdir.

Meloni ve diğ. (2003) ise, Guazuncho ve Pora pamuk çeşitlerine 50, 100 ve 200 mM NaCl uygulandığında tuza daha toleranslı olan Pora çeşidinde peroksidaz ve diğer antioksidan enzim aktivitelerinin Guazuncho çeşidine göre daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca, oksidatif zararlanmaya paralel olarak, lipid peroksidasyonunun Guazuncho çeşidinde daha yüksek bulunduğunu bildirmişlerdir.

Osmancık-97 çeltik çeşidi ve dört tuza toleranslı mutanta ait süperoksit dismutaz enzim aktivitesi tuzlu ve tuzsuz ortamda belirlenmiştir. Tuz stresi uygulanmamış bitkiler arasından 300-5, 400-2 ve 400-5 mutantları Osmancık-97 çeşidine göre SOD aktivitesi bakımından daha yüksek olup, bulunan farklar istatistiksel olarak anlamlıdır. Tuz stresi altındaki tüm mutantlar, Osmancık-97 çeşidine göre daha yüksek SOD enzim aktivitesi göstermiştir. Saptanan bu değerler istatistiksel olarak anlamlı olup, 300-5 ve 400-2 en yüksek SOD aktivitesine sahiptir.

Osmancık-97 çeşidinden geliştirilen mutantların tuz uygulanmamış kontrolleri ile Osmancık-97 çeşidi kontrolleri arasında katalaz enzim aktivitesi ele alındığında mutantların daha yüksek aktivite gösterdiği ve bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir. 150 mM NaCl stresi uygulanan dört mutantın katalaz enzim aktivitesi, tuz stresi uygulanmamış kontrollerine göre ve stres uygulanmış Osmancık-97 çeşidine göre istatistiksel olarak önemli artışlar göstermiştir. Mutantlar arasında en yüksek katalaz aktiviteleri 250-2, 300-5 ve 400-2 mutantlarından elde edilmiştir.

Demiral ve Türkan (2004) tuzluluğa toleranslı Pokkali ve hassas IR28 çeltik çeşitleri ile yapmış oldukları çalışmada, dışarıdan glisinbetain takviyesinin tuz stresinin meydana getirebileceği zararlanmalara karşı etkilerini araştırmışlardır. 28 günlük fidelere 7 gün boyunca 120 mM NaCl uygulamışlardır. CAT enzim aktivitesinin tuz uygulamasından önce hassas olan IR28 çeşidinde daha yüksek olduğunu, ancak 120 mM NaCl uygulamasından sonra toleranslı olan Pokkali çeşidinde CAT enzim aktivitesi kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artarken IR28 çeşidinde azaldığını rapor etmişlerdir.

Willekens ve diğ. (1997) tarafından CAT anlatımı yapmayan mutant bitkilerin yabancı tip bitkilere göre tuzluluk, ozon, H₂O₂ gibi abiyotik stres etmenlerinin meydana getirdiği oksidatif strese daha duyarlı olduklarını bildirilmiştir.

Genom içerisinde yer alan 2 – 5 nukleotidlik tekrarlı DNA motiflerini hedef alan ISSR tekniği her iki ucu mikrosatellit diziler ile biten DNA segmentlerini tanımlamaktadır. Tekrarlı mikrosatellit dizilerin tamamlayıcısı olan primerler kullanılarak yapılan PZR uygulamaları ile genetik varyasyon belirlenmesi çalışmalarında yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. Son yıllarda, popülasyonlar arasında bireylerin yakınlığının karakterizasyonu, DNA parmakizi, gen işaretleme, klonal varyasyonun belirlenmesi, çeşit tanımlanması, filogenetik analizler, genomik instabilitenin belirlenmesi ve hibridizasyonun değerlendirilmesi gibi çalışmalarda ISSR markörlerinin yaygın olarak kullanıldığını görmek mümkündür (Ng ve Tan, 2015; Yang ve diğ., 2015).

Radyasyonun, mutasyonlara sebep olduğu bilinmektedir. Gen kopya sayısında değişiklikler, nokta mutasyonlar, insersiyonlar, delesyonlar, tek nukleotid değişimleri gibi farklı şekillerde oluşabilen bu mutasyonlar yeni allellerin oluşmasına yol açabilmektedir. Genomdaki bu değişiklikler gama ışınlarının, DNA molekülü ile doğrudan teması sonucu oluşabileceği gibi, hücrenin büyük çoğunluğunu oluşturan su molekülleri ile etkileşmesi sonucu su moleküllerinde meydana gelen reaktif oksijen türevlerinin zararlı etkileri ile dolaylı yoldan da meydana gelebilmektedir. (Lagoda; 2007; Jain ve diğ., 2013; Azman ve diğ, 2014; Bado ve diğ, 2015; Oladosu ve diğ., 2016; Raina ve diğ; 2016).

Çalışmamızda seçilen dört mutantın ve geliştirildikleri Osmancık-97 çeşidinin genomik farklılıklarını ortaya koymak amacıyla ISSR yöntemi kullanılarak polimorfizm oranları belirlenmiştir. Toplam 12 farklı ISSR primeri kullanılarak yapılan PZR'ları sonucunda 114

bant fragmanı elde edilmiş ve bu bantların 17 tanesi (%14,9) polimorfik bulunmuştur. En fazla bant veren primer, 16 bant ile UBC825 olurken, en az bant, altışar bant ile UBC808 ve UBC864 primerlerinde elde edilmiştir. En fazla polimorfik bant fragmanı 4 bant (% 50) ile UBC824'te elde edilmiş olup, UBC812 ve UBC864 primerlerinde tüm bantların monomorfik olduğu saptanmıştır. DNA fragmanlarının boyutları 300 – 10000 baz uzunlukları arasında belirlenmiştir. Bant profillerine göre oluşturulan UPGMA dendogramı sonucunda Osmancık-97 ve dört mutant arasındaki genetik ilişki Jaccard benzerlik katsayısına göre 0,3 ve 0,94 arasında bulunmuştur. Dendograma bakıldığında Osmancık-97 ve mutantların tuz uygulanmış ve uygulanmamış örnekleri iki kümeye ayrılmıştır. Birinci küme iki alt küme oluşmuştur. Bu kümenin birinci alt kümesinde Osmancık-97 (NaCl+ ve NaCl-), ikinci alt kümesinde ise, 250-2 (NaCl + ve NaCl-), 300-5 (NaCl+ ve NaCl-) ve 400-2 (NaCl-) mutantları yer almıştır. İkinci kümede ise 400-2 (NaCl+) ve 400-5 (NaCl+ ve NaCl-) mutantları yer almıştır. Dendogram sonuçları mutantların (NaCl+ ve NaCl-) Osmancık-97 çeşidinin ayrı alt gruplarında yer aldıklarını göstermiştir.

Şen ve Alikamanoğlu (2012) in vitro mutasyon yöntemi ile 0, 10, 25, 35, 50 ve 75 Gy gama radyasyonu uygulayarak elde ettikleri kuraklığa toleranslı şeker pancarı (*Beta vulgaris* L.) mutantlarında meydana gelen genomik değişiklikleri ISSR markörleri ile değerlendirmişlerdir. Çalışmalarında 17 ve 18 bazdan oluşan 20 farklı ISSR primeri kullanmışlardır. 91 tanesi polimorfik olmak üzere 106 tane amplifiye olmuş bant elde etmişlerdir. Amplifiye olan bantların ortalama polimorfizm oranını % 85.85 olarak belirlemişler ve oluşan amplikon boyutlarını 300 - 2200 baz aralığında tespit etmişlerdir.

Buğday mutantlarında kuraklık toleransını genetik ve biyokimyasal markörlerle değerlendiren çalışmalarında Şen ve diğ. (2017), genetik farklılıkları araştırmak için 10 ISSR, 4 IRAP ve 10 REMAP primeri kullanmışlardır. 24 primerden 122 bant elde ettiklerini ve bu bantların 82 tanesinin (% 67,21) polimorfik olduğunu bildirmişlerdir. Kullanılan primerlerden UBC826, UBC835 ve UBC857'de ortalamanın üzerinde bant elde ettiklerini rapor etmişlerdir. Çalışma sonuçlarına göre oluşturulan dendogramda, kontrol ve mutantlar genetik farklılık bakımından 3 ayrı alt kümede toplanmıştır.

Oladosu ve diğ. (2015), iyon ışınları ile 0, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120,160 ve 200 Gy dozlarda ışınladıkları, Malezya genelinde % 90 oranında ekime sahip MR219 çeltik çeşidi tohumlarında etkin dozu 60 Gy olarak tespit etmişlerdir. Bu dozda yaptıkları ışınlamalar ile elde ettikleri 31

çeltik mutantı ve MR219 çeşidi arasındaki genetik farklılıkları ISSR polimorfizm tekniği ile belirlemişlerdir. Çalışma sonucunda 443 polimorfik bant ve % 85,1 total polimorfizm tespit etmişlerdir. Genotipler arasında Jaccard genetik benzerlik katsayıları 0,17 ve 0,63 aralığında bulunmuştur.

İki boyutlu protein jel elektroforezi çok geniş ölçekte proteinleri ayırma ve tanımlama olanağı sağlaması nedeniyle proteomikte kullanılan en güçlü analiz yöntemlerindendir (Weiss ve Görg, 2008). İzoelektrik noktalarına göre ayrımı yapılan proteinlerin SDS-PAGE jellerde molekül ağırlıklarına göre ayrılması ve kütle spektroskopisi ile tanımlanması günümüz proteomik çalışmalarının temelini oluşturur (Rabilloud ve Lelong, 2011). 2DE çalışmalarında temel amaç en yüksek sayıda polipeptidi en yüksek çözünürlükte ayırarak, çalışmanın deney grupları ile kontrolleri arasındaki en ufak protein anlatım farklılıklarını belirleyebilmektir (Méchin ve diğ., 2007).

Proteinlerin yüksek çözünürlükte ve en yüksek oranda ayrılabilmesi izolasyon yöntemi ile doğrudan ilişkilidir. Protein olmayan bileşenlerin uzaklaştırılması ve protein degradasyonunun önlenmesi temel hedeflerdir. Son yıllarda 2DE teknolojisinde bu amaçla pekçok yeni yöntem geliştirilse de, yöntemlerin büyük çoğunluğu trikloroasetik asit/aseton çöktürülmesi ve fenol ekstraksiyonu temeline dayanmaktadır (Shaw ve Riederer, 2003; Méchin ve diğ., 2007). Çalışmamızda tüm proteomik çalışmalardaki protein izolasyonları TCA/aseton yöntemine göre yapılmış olup, daha ileri saflaştırmaları Bio-Rad ReadyPrep™ 2-D CleanUp (saflaştırma) Kiti kullanılarak yapılmıştır.

Çalışma kapsamında kontrol bitkileri ve mutant bitkileri arasında ifade farklılıkları olduğu gözlenen 30 farklı spot arasından, doğrudan abiyotik stres ve özellikle tuz stresi toleransı ile ilişkili oldukları belirlenen 9 adet proteinin detaylı ifade analizleri karşılaştırmalı olarak yapılmıştır. Elde edilen proteomik sonuçlara göre ribüloz bisfosfat karboksilaz/oksigenaz aktivaz (Rubisco aktivaz), trioz fosfat izomeraz (TPI), 2-Cys peroksiredoksin, oksijen-evolving enhancer protein 1 (OE33), ferritin-1, ferredoksin--NADP redüktaz (FNR), gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz (GPD), tubby-benzeri F-box protein 11, peptidil-prolil cis-trans izomeraz (CYP20-2) proteinlerinin ifade seviyelerinin mutant bitkilerde değişiklikler gösterdikleri belirlenmiştir. Aynı zamanda bu proteinlerin, çeltik ile birlikte pek çok bitkide tuzluluk ve diğer abiyotik streslere toleranslılık bakımından avantajlar sağladığı da gösterilmiştir (Baier ve Dietz, 1997; Broin ve Rey, 2003; Rabbani ve diğ. 2003; Sakamoto ve diğ., 2003; Jang ve diğ., 2006;

Kang ve diğ., 2010; Jankagram ve diğ., 2011; Guo ve ark., 2012; Sharna ve diğ., 2012; Trivedi ve diğ., 2012; Abdalla, 2013; Bose ve diğ., 2013; Kosova ve diğ., 2013b; Sangha ve diğ., 2013; Bao ve diğ., 2014; Hong ve diğ., 2015; Nouri ve diğ., 2015; Yousuf ve diğ., 2016; Wang ve diğ., 2015; Hoque ve diğ., 2016; Kumar ve diğ., 2016; Saleethong ve diğ., 2016; Passamani ve diğ., 2017; Zang ve diğ., 2017; Xiong ve diğ., 2017).

Metilglioksal (MG) birçok enzimatik ve enzimatik olmayan metabolik yolağın kaçınılmaz toksik bir yan ürünüdür. Bitkilerde MG oluşumu spontan olarak trioz şekerlerinin (dihidroksiaseton fosfat ve gliseraldehit 3-fosfat) parçalanması sonucu meydana gelir. Normal fizyolojik koşullarda bazal seviyelerde bulunan MG, biyotik streslerin çoğunda abiyotik streslerin tamamında birikim gösterir. MG birikimi doğrudan reaktif oksijen türevlerinin oluşumunu sağlayarak ve glikasyon son ürünlerinin oluşumuna sebep olarak dolaylı yoldan bitkide toksisite yaratır. Artan MG seviyeleri bitkilerde büyüme ve gelişimin inhibisyonuna sebep olmaktadır. Bitkiler MG seviyelerini azaltmak için glutatyonu kofaktör olarak kullanarak MG'yi D-laktata dönüştürürler. MG seviyelerinin ve glutatyon homeostatisinin düzenlenmesi bitkilerde birçok stres faktörüne karşı tolerans ile yakından ilişkilidir. TPI farklı stres faktörlerine maruz kalan bitkilerde trioz şekerlerini glikoliz ile kullanarak MG seviyelerinin artmasını önler. Aynı zamanda bitkinin enerji kapasitesini arttırarak savunmaya destek sağlar (Kaur ve diğ. 2015).

Lee ve diğ. (2011) trioz fosfat izomerazın glikoliz ile ATP üretiminde gerekli olduğunu ve sitosolik TPI'nın çeltik bitkilerinde tuzluluk ve/veya kuraklık ile birlikte tetiklendiğini rapor etmişlerdir. Ayrıca sitosolik TPI'nın yanı sıra farklı TPI izozimlerinin kloroplastlarda lokalize olduğunu, TPI öncüllerinin tuzluluk stresine hassasiyet gösteren Dalseongaengmi-44 çeltik varyetesinde aşırı anlatım yaptırılmasının tuz stresi altında bitkilerin enerji üretimini arttırdığını ve tuz stresi tarafından meydana getirilen zararların azaltılmasında yardımcı olduğunu bildirmişlerdir.

Tuzluluk stresine karşı hassas olan IR64 çeltik çeşidini kullanan Sharma ve diğ. (2012) yaptıkları çalışmada, 200 mM tuz stresi altında trioz fosfat izomeraz seviyelerinde artış tespit etmemişlerdir. Aynı çalışmada proteinden sorumlu OscTPI geni aşırı eksprese ettirdiklerinde, tuzluluktan dolayı artan MG stresine cevap olarak 6. ve 24. saatler arasında 2 kat TPI artışı sağlandığını rapor etmişlerdir.

Saleethong ve diğ. (2016) TPI proteininin çeltik bitkisinde tuz stresine yanıtta sorumlu olduğunu, tuzluluğa toleranslı Pokkali çeşidinde tuz stresine bağlı olarak artış gösterdiğini, ve bu proteinin yüksek yoğunluklarda bulunmasının tuzluluğa hassas olan KDML-105 çeşidine göre; Pokkali çeşidine tuzluluk tolerans avantajı sağladığını rapor etmişlerdir.

Wang ve diğ. (2015) sukkulent tek yıllık halofit bir bitki olan *Halogeton glomeratus* ile çalışmışlardır. 100 mM NaCl bulunan ortamda en ideal gelişim gösteren bu bitki ile yaptıkları çalışmada 500 mM'a kadar farklı konsantrasyonlarda NaCl'ü 21 gün süre ile uygulamışlardır. Bitkinin tuzluluk koşulları altında TPI seviyesi ve glikolizi arttırdığını ve bu proteinin hücrelerde ATP üretimini arttırarak bitkinin tuz stresine karşı toleransını arttırmasına neden olduğunu saptamışlardır.

TPI proteinlerinin tuz stresi altında post-translasyonel modifikasyonlar ile nitrozillendiğini ve katalitik aktivite kazandığını belirtilmiştir (Kosova ve diğ., 2013b). Proteinlerin geçirdiği bu modifikasyonların metabolitler ve fonksiyonları bakımından tuzluluğa hassasiyet ve toleranslılık arasındaki ayırımı belirleyebileceği ileri sürülmüştür.

Hoque ve diğ. (2016) TPI'nın plastid izoformlarını bulundurmayan *pdtpi* ıspanak mutantlarında fotosentez sırasında kloroplastlarda MG birikimi sonucu toksisite oluşturduğunu ve hücre içi reaktif oksijen türevlerine karşı hassasiyet meydana geldiğini rapor etmişlerdir.

Çalışmamızda TPI ifadesinin 250-2, 400-5 ve 300-5 mutantlarının tuz uygulanmamış kontrol bitkilerinde arttığı, 400-2 mutantında ise azaldığı gösterilmiştir. Tuz stresi uygulamasının ardından 250-2 ve 400-5 mutantlarının protein ifadeleri sırası ile % 39,16 ve 34,38 artmıştır. Tuz uygulaması öncesinde protein seviyesi %15,6 azalma gösteren 400-2 mutantı stres uygulamasının ardından ifade seviyesini % 34,02 arttırmıştır. Mutantlar arasında tuz stresi uygulanmamış kontrolüne göre en büyük farklılığı 400-2 mutantı sergilemiştir.

Demir (Fe) hem hayvanlar hem de bitkiler için önemli bir mikroelementtir. Hayvanlarda hemoglobin, sitokromlar, flavoproteinler, laktoferrin, ferritin gibi proteinlerin yapısında bulunan demir, bitkilerde elektron transport zincirinde sitokromlarda, respirasyonda ve önemli birçok metabolik yolda görev almaktadır. Demir eksikliği bitkilerde kök morfolojisinde değişiklik, genç yapraklarda klorozis, verimlilikte azalma gibi olumsuzluklar meydana getirirken fazlalık durumunda da oksidatif strese neden olmaktadır. Yararlı özelliklerinin yanında serbest demir Fenton reaksiyonlarına katılarak hidroksil radikallerinin oluşumuna katkı

sağlar. Serbest demir aşırı düzeylere ulaştığında ise, reaktif oksijen türevleri kökenli geri dönüşü olmayan hücre içi zararlanmalar ortaya çıkmaktadır. (Goss ve Hanke, 2014).

Rabbani ve diğ. (2003) çeltik bitkisinde soğuk stresi ile tetiklenen 36, kuraklık ile tetiklenen 62, yüksek tuzluluk ile tetiklenen 57 ve ABA ile tetiklenen 43 genin ürünlerini inceledikleri çalışmalarında; ferritin proteininin bu streslere toleransta, hücrelerarası serbest demirin stres sırasında Fenton reaksiyonları ile oluşturabileceği çeşitli hidroksil radikallerini önlemesi sebebiyle önemli rol oynadığını bildirmişlerdir.

Glikofit bitkilerin tuz stresi gibi olumsuz çevresel koşullar altında ferritin proteini ile, serbest demirin hidrojen peroksit ile oluşturabileceği zararlı hidroksil radikallerinden korunduğu Bose ve diğ. (2014) tarafından ortaya konmuştur. Ayrıca, tuz stresi altında hidrojen peroksitin birikim gösterdiği bilinen tüm organellerde ferritin birikimi meydana geldiğini de bildirmişlerdir.

Kosova ve diğ. (2013b) tuz stresi altındaki çeltik, Arabidopsis, domates gibi çeşitli bitkilerde tuzluluk yanıtı ve tolerans kazanımında Fe-bağlayıcı ferritin proteininin arttığını bildirmişlerdir.

Zang ve diğ. (2017) buğday bitkisinde ferritin geni TaFER-5B'nin aşırı eksprese edilmesinin sıcaklık stresi ve diğer abiyotik streslerde ROS oluşumunu engellemesi sebebi ile, toleransla bağlantılı olduğunu ifade etmişlerdir.

Çalışmamızda ferritin-1 proteini seviyelerinin normal fizyolojik durumda mutantlarda, Osmancık-97'ye göre düşük olduğu, mutantlar arasında sadece 300-5 mutantının ferritin-1 ifade seviyesinin Osmancık-97'den %36,85 yüksek olduğu tespit edilmiştir. 150 mM NaCl uygulamasının ardından tüm mutantların ferritin-1 ifade seviyeleri Osmancık-97'nin üzerine çıkmış olup 250-2, 400-5, 300-5 ve 400-2 artış düzeyleri sırası ile % 38,65, 81,08, 41,93 ve 92,96 olarak kaydedilmiştir. 150 mM NaCl toleranslı tüm mutantlarda tuz uygulamasının ardından ferritin-1 protein anlatımının artması, mutantlarda ROS'e karşı savunmada bu proteinin rol aldığını ortaya koymaktadır.

Karbon fiksasyonu gerçekleşen Calvin-Benson döngüsünde 1,3-difosfoliseratın gliseraldehit 3-P'ye NADPH-bağımlı indirgenmesi reaksiyonlarında fotosentez sırasında üretilmiş elektronlara ihtiyaç duyulmaktadır. Karbon fiksasyonunda kullanılacak NADP⁺ dan NADPH

indirgenmesini reaksiyonları ferredoksin NADP(H) oksidoredüktaz (FNR) enzimi tarafından kataliz edilir (Goss ve Hanke, 2014; Yang ve diğ. 2016).

Nouri ve diğ. (2015) orta düzeyde tuzluluk stresine maruz kalan mısır bitkilerinde 4 saat içerisinde aşırı düzeyde artan sodyum iyonlarının kloroplastlarda birikmeye başladığını ve bu birikimin ferredoksin NADP(H)+ oksidoredüktaz başta olmak üzere ATP sintaz ve klorofil a/b bağlayıcı protein gibi fotosistem II polipeptidlerinin seviyelerinde artışa sebep olduğunu bildirmişlerdir. Yapraklarda su potansiyelinin sabit tutulması için tuzluluğa tolerans mekanizmalarında ferredoksin NADP(H)+ oksidoredüktaz gibi fotosentetik mekanizma proteinlerinin aşırı artan sodyum konsantrasyonlarının zararlı etkilerinden korunmasında önemli olabileceğini rapor etmişlerdir.

Brassica juncea bitkisi ile yaptıkları çalışmada Yousuf ve diğ. (2016) tuzluluk stresi koşullarında ferredoksin NADP(H)+ redüktaz proteinlerinin glutatyon redüktaz ile indirgenmiş glutatyon meydana getirdiğini, bu indirgenme sonucu oluşan glutatyon ve thioeredoksinin oksidatif strese karşı antioksidan olarak görev aldığını bildirmişlerdir.

Sangha ve diğ. (2013) çeltik mutantları ile yaptıkları 2-D proteomik çalışmasında biyotik *Nilaparvata lugens* stresi altında düzenlenmesinde farklılık tespit ettikleri proteinlerin başında fotosentetik mekanizma ile ilişkili ferredoksin NADP(H)+ redüktaz, Rubisco aktivaz, oxygen evolving enhancer protein 3 (OEE3) geldiğini ifade etmişlerdir.

Yapmış olduğumuz çalışmada, tuz stresine maruz bırakılmayan 250-2 ve 400-2 mutantları Osmancık-97 çeşidine göre FNR ifade seviyelerini arttırmış olsalar da en belirgin artışı %30,21 ile 400-5 mutantı sergilemiştir. 150 mM NaCl uygulamasının ardından Osmancık-97'ye oranla FNR ifade düzeyini arttıran tek mutant 400-2 olmuştur. Ayrıca 400-2 mutantı fotosentetik pigment konsantrasyonları bakımından da diğer mutantlara göre üstün özellikler sergilemiştir.

Peroksiredoksinler (Prdx) tiol bazlı peroksidazlardır. İndirgen olarak tiol içeren proteinleri kullanarak katalitik sistein bölgeleri ile çeşitli peroksitleri detoksifiye ederler. Yapılarındaki korunmuş sisteinden dolayı yapısal olarak 1-Cys peroksiredoksin ve 2-Cys peroksiredoksinler olarak 2 farklı gruba ayrılırlar. Katalitik fonksiyonlarını gerçekleştirirken yüksek oranda korunmuş sistein bölgelerini kullanarak hidrojen peroksiti indirgeyerek proteinlerde disülfit bağlarının oluşumuna neden olurlar. Oluşan disülfid bağları thioeredoksin, glutaredoksin veya siklofilin gibi indirgeyici ajanların yardımı ile yok edilir. Bitkilerde peroksiredoksinler 1-Cys

Prx, 2-Cys Prx, tip II Prx, Prx Q ve glutatyon Prx olmak üzere 5 gruba ayrılırlar ve sitosol, kloroplast ve mitokondride lokalize olurlar. 2-Cys peroksiredoksinlerin Arabidopsis'te baskılanmasının fotosentetik mekanizmada ve gelişim süreçlerinin metabolik yollarında ciddi zararlanmalara sebep olduğu gösterilmiştir. Ayrıca 2-Cys peroksiredoksinlerin soğuk ve kuraklık gibi streslere maruz kalındığında tamamen inaktive oldukları bilinmektedir. İnaktif formdaki yapıları çeşitli çevresel stres faktörlerine karşı şaperon fonksiyonu sergileyerek yapısal değişikliğe uğramış olmasına rağmen etkisini sürdürmektedir (Dos Santos ve Rey, 2006; Kim ve diğ., 2009).

Jang ve diğ. (2006) 2-Cys peroksiredoksinlerin yapısal ve fonksiyonel düzenlenmesinin bitkilerde oksidatif strese karşı savunma sinyal mekanizması oluşturduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca Sakamoto ve diğ. (2003) mayalarda, 2-Cys peroksiredoksinlerin reaktif nitrojen türevlerine karşı savunmada görevleri olduğunu rapor etmiştir.

Fotooksidatif stresin plastid kökenli thiorredoksinleri baskılanması sonucu tilakoid zarlarında 2-Cys peroksiredoksin BAS1'in aşırı oksidizasyonuna sebep olduğu ve bitkide stres göstergesi olan lipid peroksidasyonunu arttırdığı saptanmıştır (Broin ve Rey, 2003).

Transgenik Arabidopsis bitkisi ile çalışan Baier ve Dietz (1997) kloroplastta bulunan 2-Cys peroksiredoksinin fotosentez sırasında oluşacak reaktif oksijen türevlerine karşı koruma sağladığını bildirmişlerdir.

Çalışmamızda tuz stresi uygulanmamış mutant bitkiler arasında sadece 400-5 mutantı % 143,7 artış ile Osmancık-97 negatif kontrol örneğinden daha yüksek 2-cys peroksiredoksin ifadesi sergilemiştir. Bitkilere 150 mM NaCl stresi uygulandığında ise, tüm mutantlarda proteinin ifadesi Osmancık-97 çeşidine göre azalma gösterirken, 300-5 mutantı % 168,47 ifade artışı ile dikkat çekmiştir. 2-cys peroksiredoksin proteininin anlatımının lipid peroksidasyon ile olan negatif yönlü bağlantısı, tüm mutantlarda 150 mM NaCl uygulamasından sonra Osmancık-97 çeşidine göre lipid peroksidasyonunun düşük çıkması sonucunu desteklemektedir.

Oksijen-evolving enhancer protein 1 (OE33) fotosistem II'de lümene bakan bölgelerde lokalize olan mangan sabitleyici bir proteindir. Protein fotosentetik aktivite gösteren siyanobakterilerden, yeşil algere ve yüksek bitkilere kadar korunmuş durumdadır. Suyun oksidasyonu sırasında mangan kümelenmesini organize ettiği, fotooksidatif stres ve sıcaklık

stresinde oksijen radikallerine karşı koruyucu rolü olduğu düşünülmektedir (Heide ve diğ. 2004).

Xiong ve diğ. (2017) tuz stresine karşı hassasiyet gösteren alfalfa bitkisinde kök ve sürgünlerden elde edilen protein profillerini incelediklerinde oksijen evolving enhancer protein 1 seviyelerinin tuz stresi ile azaldığını tespit etmişlerdir. Tuz stresinin CO₂ fiksasyonunu azalttığını, böylelikle Calvin döngüsü ile enerji eldesinin azaldığını, meydana gelen stresin reaktif oksijen türevlerinin artışına sebep olması sonucu oxygen evolving enhancer protein 1 gibi ışık tarafından tetiklenen suyun oksidasyonunda görev alan proteinlerin seviyelerinde azalma meydana geldiğini bildirmişlerdir.

Arpa yapraklarında tuz stresinin meydana getirdiği proteomik değişiklikleri gösteren Abdalla (2013) çalışmasında, oksijen-evolving enhancer proteinin tuz stresi ve osmotik stres altındaki çeltik bitkilerinde ve tuz stresi altındaki arpa bitkilerinde artan ifade profili gösterdiğini belirtmiştir.

Çalışmamızda Osmancık-97 çeltik çeşidinden kökenlenen ve 150 mM NaCl stresine toleranslı olduğu tespit edilen 250-2, 400-5, 300-5 ve 400-2 mutantları tuz uygulanmamış kontrollerinde OE33 ifadesi bakımından Osmancık-97 kontrollerine göre sırasıyla % 4,12, % 22,88, % 33 ve % 35,68 oranlarında artış göstermiştir. 150 mM tuz uygulamasının ardından 250-2 mutantında ve 400-5 mutandında artış devam ederken 300-5 ve 400-2’de ifade düşüşleri tespit edilmiştir. Çeşitli bitki türlerinde farklı stres koşullarına karşı farklı anlatım profilleri sergileyen bu protein, mutant bitkiler arasında tuz stresi altındaki 250-2 mutantında dikkat çekici düzeydedir.

Tubby-benzeri proteinler ilk olarak obez farelerde tespit edilmiş olup sonradan bitkilerden Arabidopsis’te 694, çeltikte 687 tubby-benzeri protein tespit edilmiştir. Farelerde nöral gelişimde çeşitli fonksiyonları belirlenen tubby-benzeri proteinler, bitkilerde tubby benzeri F-box ailesi olarak adlandırılmakta ve bitkilerdeki en büyük gen ailelerinden birini oluşturmaktadır. Bitkilerde bu kadar büyük sayı ve çeşitlilikte bulunmaları; embriyogenez, çiçek gelişimi, bitki büyüme ve gelişimi, abiyotik stres, hormon yanıtı ve senesens gibi süreçlerde aldığı görevler ile açıklanmaktadır (Gupta ve diğ. 2015). Reitz ve diğ. (2012) bitkilerde tubby-benzeri proteinlerin kuraklık stresi ve ABA sinyal yolağında görevler aldıklarını rapor etmiştir.

Tubby-benzeri proteinlerin ABA yolağı ile bitki çimlenmesi üzerinde etkileri olduğu Bao ve diğ. (2014) tarafından bildirilmiştir. Ayrıca, tubby benzeri protein anlatımı yapmayan Arabidopsis bitkilerinde ABA'ya duyarsız fenotiplerin geliştiğı, aşırı anlatım yapan mutantlarda ise, ABA'ya karşı aşırı hassasiyet geliştiğini ortaya koymuşlardır.

Hong ve diğ. (2015) tubby-benzeri proteinler ile SKP1-benzeri proteinler arasındaki ilişkiyi araştırdıkları çalışmalarında TULP1, TULP2, TULP3 ve TULP4'ün buğday bitkisinin gelişimi sırasında tuzluluk ve abiyotik streslere karşı sinyal iletiminde görev aldığını, TULP1, TULP3 ve TULP4'ün tuz stresine cevap olarak arttığını, TULP2'nin ise, azaldığını rapor etmişlerdir. Xu ve diğ. (2016) *Malus domestica* bitkisi ile yaptıkları çalışmada tubby-benzeri protein ailesinin genom-boyunca tanımlamasını ve ekspresyon analizini yapmışlar ve bu proteinlerin nukleusta transkripsiyon aktivasyonunda, transkripsiyonel düzenlemede görevler aldıklarını bildirmişlerdir.

Osmancık-97 çeltik çeşidinin ve çeşitten elde edilen mutantların tuz stresi uygulanmamış kontrol bitkilerinde tubby-benzeri F-box protein 11 ifade seviyeleri incelendiğinde 400-5 mutanti ve 400-2 mutantında Osmancık-97'ye göre artış olduğu, 150 mM tuz stresi altında ise Osmancık-97 negatif kontrolüne göre tüm mutantlarda artış olmasına rağmen bu artışların tuz uygulanmış Osmancık-97 ifade seviyesinin altında kaldığı belirlenmiştir. Bitkilerde önemli bir fitohormon olan ABA'nın abiyotik stres koşullarında üstlendiğı roller kuraklık, tuzluluk, ağır metal, radyasyon gibi etmenlere karşı araştırılmıştır (Vishwakarma ve diğ., 2017). Mutant bitkilerde tubby-benzeri protein anlatımlarının Osmancık-97 çeşidinden farklılık göstermesi, gama radyasyonu kullanılarak geliştirilen mutantların Osmancık-97 çeşidinden farklı olarak ABA-bağımsız stres yanıt mekanizmalarını devreye sokabileceğini ifade etmektedir.

Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz (GPD), glikoliz ve glukoneogenez yolaklarında görev alan önemli bir enzimdir. Artan GPD aktivitesi, glikoliz ve ATP oluşumuna yol açacak gliserolden karbon kopartılması sürecini hızlandırarak osmotik stres toleransında önemli moleküller olan osmolitlerin üretilmesine ve gerekli enerjinin sağlanmasına yardımcı olur. Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz geni aktarılmış patates bitkilerinde tuz stresine karşı tolerans sağlandığı tespit edilmiştir. Benzer şekilde *Mesembryanthemum crystallinum* bitkisinde transkripsiyonel olarak artan GDP methionin sentaz ve GDP oluşumunu sağlayarak tuz stresine karşı toleransı arttırmıştır (Jiang ve ark. 2014).

Guo ve diğ. (2012) Arabidopsis ile yaptıkları çalışmada sitosolik gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz artışının strese yanıt olarak hidrojen peroksit seviyelerini azalttığını rapor etmişlerdir.

Passamani ve diğ. (2017) şekerkamışı sürgünleri ile kurulan tuzluluğa maruz kalmış doku kültürlerinde, tuza toleranslı RB855536 çeşidi ve daha hassas CB38-22 çeşidini proteomik açıdan değerlendirmiş ve GDP ifadesinin tuzluluğa daha toleranslı olan RB855536 çeşidinde daha yüksek olduğunu ortaya koymuştur.

Çalışmamızda tuz stresi uygulanmamış 400-5, 300-5 ve 400-2 mutantları gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz ifadesi bakımından Osmancık-97 negatif kontrollerine göre, sırasıyla % 43,1, % 72,88 ve % 53,1 artış gösterirken, mutantlar arasında sadece 250-2'de % 49,56 azalma tespit edilmiştir. 150 mM NaCl uygulamasının ardından tüm mutantlar ifade seviyelerini Osmancık-97'ye göre arttırırken, en belirgin artış 300-5 mutantında % 132,68 oran ile tespit edilmiştir. Osmotik stres toleransında önemli moleküller olan osmolitlerin üretilmesine ve gerekli enerjinin sağlanmasına yardımcı olan GDP anlatımının mutant bitkilerde yüksek olması, in vitro ve in vivo koşullarda 150 mM NaCl konsantrasyonuna karşı elde edilen toleransı desteklemektedir.

Siklofilinler (CYP), immünosupresör ilaç sikloporin A için reseptör olarak tanımlanırlar. CYP'ler bu sebeple immünofilinler (IMM) olarakta adlandırılırlar. IMM'ler peptidil prolil izomeraz ailesine dahil, protein katlanmasında görevli, hemen hemen tüm canlılarda çeşitli dokularda bulunan katalitik proteinlerdir. Cyp20-2'nin Arabidopsis'te osmotik stres ve ışık stresine toleransta, çeltikte ise abiyotik stres yanıtı olarak düzenleyici rolleri olduğu gösterilmiştir (Kim ve diğ. 2012).

Trivedi ve diğ. (2012) çeltik, Arabidopsis ve maya siklofilinlerini karşılaştırdıkları çalışmalarında hücre bölünmesi, transkripsiyonel düzenlenme, hücre sinyali, RNA kırılması ve stres toleransında görev aldıklarını bildirmişlerdir.

Yaptığımız çalışmada CYP20-2 (peptidil-prolil cis-trans izomeraz) ifadeleri tüm mutantlarda özellikle tuz uygulanmamış Osmancık-97 kontrolüne göre artmıştır. Tuz stresi uygulanmamış mutantlar arasında en belirgin artış 8,5 kat ile 300-5 mutantında tespit edilmiştir. Tuz uygulamasını takiben 300-5'in CYP20-2 ifade seviyesindeki artış 1,5 kat seviyesine gerilerken, en belirgin artışı 8,6 kat ile 400-2 mutantı göstermiştir.

Ribuloz bisfosfat karboksilaz/oksijenaz aktivaz (Rubisco aktivaz), ATP hidrolizi yaparak RUBISCO'nun aktif bölgesindeki sıkı bağlı inhibitörleri serbest bırakarak bitkilerde maksimum oranda fotosentetik aktivitenin devamlılığını sağlamada görevlidir. RUBISCO, 5-karbonlu şeker ribuloz 1,5-bisfosfat moleküllerinin karboksilasyonunu katalizleyerek inorganik karbonu biyosfere salan bir moleküldür. İşlevi, aktif bölgesine bağlanan ribuloz-P2 ve karboksiarabinitol 1-P gibi inhibitörlerin düzenlemesi ile kontrol edilmektedir. İnhibitörler ışığa bağımlı fosfatazlar ile degrade olurlar. Rubisco aktivitesi gündüzleri oluşan pentodiulose-P2 ve ksiluloz-P2 gibi inhibitörlerinin birikimi sonucu baskılanabilir. İnhibitörlerin baskılamasını kırmak için bitkiler ATP enerjisi gerektiren Rubisco aktivaz enzimine ihtiyaç duymaktadırlar (Keown ve ark. 2013).

Kumar ve diğ. (2016) buğday bitkisinde Rubisco aktivaz anlatımının sürekli hale getirilmesinin ve birikiminin sağlanmasının sıcaklık stresine tolerans açısından bitkiye büyük avantajlar sağladığını belirtmişlerdir.

Jankangram ve diğ. (2011) tuzluluğa toleranslı Pokkali ve tuzluluğa hassas KDML 105 çeltik çeşitlerini 2-D proteomik analizi ile karşılaştırdıklarında; Pokkali çeşidinde Rubisco aktivaz miktarlarında artış ve bunu takip eden yüksek Rubisco aktivitesi tespit etmişlerdir. Hassas olan KDML 105 çeşidinde ise, Rubisco aktivaz seviyelerindeki ciddi azalmanın Rubisco aktivitesinin azalmasına sebep olduğunu belirtmişlerdir. Rubisco aktivaz aktivitesinin gen anlatımı düzeyinin azalmadığını, ancak post-translasyonel aşamada tuz stresi altında Rubisco aktivazın korunamadığını rapor etmişlerdir.

Farklı tuz toleranslılığına sahip iki çeltik çeşidi (Dalseongaengmi-44 ve Dongjin) ile çalışan Lee ve diğ. (2011), tuz uygulanmış bitkilerin yapraklarından yapmış oldukları proteomik çalışmalarda Rubisco aktivaz anlatımının arttığını tespit etmişler ve bu artışın stres altında fotosentez sürecinde elektron akışını düzenlediğini ve fotosentezin fotoinhibisyonunun engellendiğini bildirmişlerdir.

Kang ve ark. (2010) Rubisco aktivaz aktivitesini çeltik bitkisinde düşük-yüksek sıcaklık, kuraklık, metal iyon stresi, tuzluluk, mikrobiyal saldırı gibi, abiyotik ve biyotik çevresel etmenlere tolerans açısından avantajlarını göstermiştir.

Tahıllar arasında tuzluluk stresine en toleranslı bitkiler arasında yer alan arpada Walia ve diğ. (2007), jasmonik asit tarafından düzenlenen Rubisco aktivazın gen anlatımındaki artışların tuzluluğa toleransta bitkiye ciddi avantajlar sağladığını tespit etmişlerdir.

Kurek ve diğ. (2007) Arabidopsis bitkisinde Rubisco aktivazın termostabilitesinin arttırılması ile sıcaklık stresi altında fotosentezin ve büyüme parametrelerinin geliştirilebileceğini bildirmişlerdir.

Yapmış olduğumuz çalışmada mutant bitkilere ait kontrol gruplarının ribuloz bisfosfat karboksilaz/oksigenaz aktivaz protein ifadeleri Osmancık-97 çeltik çeşidinin tuz stresi uygulanmamış kontrolleri ile karşılaştırıldığında, 250-2 mutantının ifade seviyelerinde bir değişiklik gözlenmezken, 400-5 ve 300-5 mutantlarının ifade seviyelerinde azalma (sırası ile % 7,45 ve 42,19), 400-2 mutantının ifade seviyesinde ise, % 73,73 artış tespit edilmiştir. 150 mM NaCl stresi uygulandığında Osmancık-97 ve mutantların tamamında protein ifade seviyelerinde azalma meydana gelmiştir.

Yürütülen proteomik çalışmaların sonucunda elde edilen bulgular ve biyokimyasal analiz sonuçları her mutant için birlikte değerlendirilmiştir. Mutantların tuzluluğa toleransını kontrol eden sistemlerinde farklılıklar bulunmuştur.

400-2 mutantının normal fizyolojik koşullardaki fotosentetik pigment konsantrasyonları Osmancık-97 çeşidine göre, istatistiksel bakımdan anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Ayrıca fotosentez ile ilgili Rubisco aktivaz, FNR ve OE33 proteinleri ile enerji metabolizmasıyla düzenleyici görevleri olan GPD, CYP-20-1 ve Tubby-benzeri F-box protein 11 ifade seviyelerinin de artmış olduğu saptanmıştır. CAT ve SOD enzim aktiviteleri Osmancık-97 çeşidine göre, istatistiksel açıdan anlamlı olarak artmıştır.

400-2 mutantına 150 mM NaCl uygulamasının ardından fotosentetik pigment konsantrasyonundaki yüksek değerler devam etmiştir. Ayrıca fotosentez ile ilişkili FNR proteini kendi kontrolüne göre azalsa da, Osmancık-97 çeşidine göre yüksek bulunmuştur. Stres altında karbon fiksasyonunda kullanılacak NADP⁺'dan NADPH indirgenmesini katalizleyen FNR'nin yüksek bulunması fotosentetik aktivitenin devamlılığının sağlandığını göstermektedir. Palatnik ve diğ., (2003) FNR proteinin susturulmuş tütün bitkilerinde oksidatif strese bağlı fotosentetik pigment (klorofil ve karotenoid) yıkımı ve membran hasarlarının arttığını, fotosentetik aktivitenin azaldığını rapor etmiştir. Bitkide stres altında ROS miktarının

azaltılmasında görev yapan TPI, ferritin-1 ve PRDX proteinlerinin yüksek bulunması ve bununla birlikte POX, SOD ve CAT enzim aktivitelerinin artmış olması, Osmancık-97 ile kıyaslandığında, mutant ile elde edilen tuz toleransına katkı sağladığı görülmektedir. Ayrıca enerji metabolizması ve stres altında düzenleyici görevleri olan GPD, CYP-20-1 ve Tubby-benzeri F-box protein 11 ifade seviyeleri de mutantta istatistiksel açıdan yüksek bulunmuştur. Bunun sonucu olarak, ROS türevlerinin lipid molekülleri üzerinde meydana getirdiği zararlanmanın yan ürünü olan MDA miktarı mutantta Osmancık-97 çeşidine kıyasla azalmıştır.

300-5 mutantının normal fizyolojik koşullardaki fotosentetik pigment konsantrasyonları Osmancık-97 çeşidine göre, istatistiksel bakımdan anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Ayrıca fotosentez ile ilgili OE33 proteini ve enerji metabolizması ile düzenleyici görevleri olan GPD, CYP-20-1 ifade seviyeleri de artmıştır. Aynı zamanda ROS seviyelerini düzenleyen TPI ve ferritin-1 proteinleri ile antioksidan CAT ve SOD enzim aktiviteleri Osmancık-97 çeşidine göre istatistiksel açıdan anlamlı olarak artmıştır.

300-5 mutantında 150 mM NaCl uygulamasının ardından fotosentetik pigment konsantrasyonundaki yüksek değerler devam etmiştir. Bitkide stres altında ROS miktarının azaltılmasında görev yapan ferritin-1 ve PRDX proteinlerinin yüksek bulunmuş ve bununla birlikte POX, SOD ve CAT enzim aktiviteleri artmıştır. ROS türevlerinin lipid molekülleri üzerinde meydana getirdiği zararlanmanın yan ürünü olan MDA miktarı mutantta, Osmancık-97 çeşidine kıyasla azalmıştır. Ayrıca enerji metabolizması ve stres altında düzenleyici görevleri olan GPD, CYP-20-1 ve Tubby-benzeri F-box protein 11 ifade seviyeleri de mutantta istatistiksel açıdan yüksek bulunmuştur.

400-5 mutantının normal fizyolojik koşullardaki fotosentetik pigment konsantrasyonları Osmancık-97 çeşidine göre istatistiksel bakımdan anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Ayrıca fotosentez ile ilgili FNR ve OE33 proteini, enerji metabolizması ile düzenleyici görevleri olan GPD, CYP-20-1 ve tubby-benzeri F-box protein 11 ifade seviyeleri de artış göstermiştir. Aynı zamanda ROS seviyelerini düzenleyen TPI ve PRDX proteinleri ile antioksidan CAT ve SOD enzim aktiviteleri Osmancık-97 çeşidine göre istatistiksel açıdan anlamlı olarak artmıştır.

400-5 mutantında 150 mM NaCl uygulamasının ardından fotosentetik pigment konsantrasyonundaki yüksek değerler devam etmiş ve ayrıca fotosentez ile ilgili OE33 protein ifadesi de artmıştır. Bitkide stres altında ROS miktarının azaltılmasında görev yapan ferritin-1

ve TPI proteinleri yüksek bulunmuş ve bununla birlikte; POX, SOD ve CAT enzim aktiviteleri artmıştır. ROS türevlerinin lipid molekülleri üzerinde meydana getirdiği zararlanmanın yan ürünü olan MDA miktarı mutantta, Osmancık-97 çeşidine kıyasla azalmıştır. Ayrıca enerji metabolizması ve stres altında düzenleyici görevleri olan GPD, CYP-20-1 ve Tubby-benzeri F-box protein 11 ifade seviyeleri de mutantta istatistiksel açıdan yüksektir.

250-2 mutantının normal fizyolojik koşullardaki fotosentetik pigment konsantrasyonları Osmancık-97 çeşidine göre istatistiksel bakımdan anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Ayrıca fotosentez ile ilgili FNR ve OE33 proteini ve düzenleyici görevleri olan CYP-20-1 ifade seviyeleri de artmıştır. Aynı zamanda ROS seviyelerini düzenleyen TPI proteini ile antioksidan CAT enzim aktivitesi Osmancık-97 çeşidine göre istatistiksel açıdan anlamlı olarak artmıştır.

250-2 mutantında 150 mM NaCl uygulamasının ardından fotosentetik pigment konsantrasyonundaki yüksek değerler devam etmiştir. Ayrıca fotosentez ile ilgili OE33 protein ifadesi de artmıştır. Bitkide stres altında ROS miktarının azaltılmasında görev yapan ferritin-1 ve TPI proteinleri yüksek bulunmuş ve bununla birlikte POX, SOD ve CAT enzim aktiviteleri artmıştır. ROS türevlerinin lipid molekülleri üzerinde meydana getirdiği zararlanmanın yan ürünü olan MDA miktarı mutantta Osmancık-97 çeşidine kıyasla azalmıştır. Ayrıca enerji metabolizması ve stres altında düzenleyici görevleri olan GPD, CYP-20-1 ve Tubby-benzeri F-box protein 11 ifade seviyeleri de mutantta istatistiksel açıdan yüksek bulunmuştur.

Dört mutantta da tuz stresi altında ferritin-1, GPD, tubby-benzeri F-box 11 ve Cyp20-2 protein ifade seviyeleri artış göstermiştir. MG seviyelerinin artmasını önleyen TPI ifade seviyesi 300-5 mutantı hariç, tüm mutantlarda artarken, ROS'ne karşı katalitik fonksiyonu olan PRDX, 400-2 ve 300-5 mutantlarında artmıştır. Fotosentez ile ilişkili proteinlerden OE33 ifade seviyesi 250-2 ve 400-5 mutantlarında artarken, FNR sadece 400-2 mutantında ifadesini arttırmıştır. Rubisco aktivaz protein ifade seviyesi tuz stresi altındaki mutantların hiçbirinde artış göstermemiştir.

Yapılan genomik analizde mutantların tuz stresi altında birbirlerine olan genetik uzaklıkları göz önüne alındığında 250-2 ve 300-5 mutantları aynı alt grupta yer almıştır. 400-2 ve 400-5 bu mutantlardan ayrılmıştır.

Mutantlarda yapılan 2D elektroforezi sonucunda fotosentez, hücre iskeleti yapısı, protein metabolizması ve farklılaşması, katabolik aktivite, karbonhidrat metabolizması, antioksidan

savunma, iyon metabolizması, DNA hasarı onarımı, RNA metabolizması ve diğer fonksiyonlar ile ilişkili proteinler tespit edilmiştir. Bu proteinlerden; seçilen tuz stresine tolerans ile ilgili olduğu bilinen dokuz protein, mutantlarda araştırılmıştır. Çeltik mutantlarının tuz stresi altında verdiği cevaplardaki farklılıklarda, FNR, OE33, TPI ve PRDX proteinlerinin de rol aldığı görülmektedir.

Sonuç olarak, ülkemizde ilk kez radyasyon ile tuza toleranslı çeltik mutantlarının geliştirilebildiği bu tez kapsamında gösterilmiştir. Yapılan çalışma sonucunda tuza toleranslı dört farklı çeltik mutanı elde edilmiştir. Günümüzde tarım alanlarının verimliliğini etkileyen abiyotik streslerden olan tuzluluğun giderek arttığı dikkate alındığında, yüksek tuz seviyelerinin meydana getirdiği stresin mekanizmalarını genomik ve proteomik düzeyde anlamak tuzluluğa toleranslı yeni çeşitler geliştirilmesindeki başarı ihtimalini arttıracaktır. Bu sebeple elde edilen tuza toleranslı çeltik mutantları genomik ve proteomik açıdan incelenmiş ve tuza karşı olan toleransları ile birbirlerinden farklılıkları gösterilmiştir. Bu dört mutantın farklı çevre, iklim ve coğrafik koşullarda daha yüksek ürün potansiyeline sahip çeşitlerin geliştirilmesinde önemli bir rolü olacaktır. Ayrıca araştırmada kullanılan çeltik çeşitleri ülkemizde geliştirilen yerli çeşitler olması nedeni ile yapılan bu mutasyon çalışması ülkemiz ekonomisi açısından ayrı bir öneme sahiptir.

KAYNAKLAR

- Abbasi, F.M. ve Komatsu, S., 2004, A proteomic approach to analyze salt-responsive proteins in rice leaf sheath, *Proteomics*, 4(7): p. 2072-2081.
- Abdalla, K., 2013, Proteomics approach for identifying salt stress related proteins in barley leaves, *Egyptian Journal of Genetics and Cytology*, 42(1).
- Abdel-Mawgood, A.L., 2012, DNA based techniques for studying genetic diversity, *Genetic Diversity in Microorganisms*, 95-122.
- Abdulhafiz, F., Kayat, F., ve Zakaria S., 2018, Effect of gamma irradiation on the morphological and physiological variation from In vitro individual shoot of banana cv. Tanduk (Musa spp.), *Journal of Plant Biotechnology*, 45(2): 140-145.
- Acosta-Motos, J. R., Ortuño, M.F., Bernal-Vicente, A., Diaz-Vivancos, P., Sanchez-Blanco, M. J. ve Hernandez, J. A., 2017, Plant responses to salt stress: adaptive mechanisms, *Agronomy*, 7(1): 18.
- Aebi, H., 1984, Catalase in vitro, *Methods in Enzymology*, 105: p. 121-6.
- Aghaei, K., Ehsanpour, A.A., Shah, A.H., Komatsu, S., 2009, Proteome analysis of soybean hypocotyl and root under salt stress. *Amino acids*, 36(1): p. 91-98.
- Aghaei, K., Ehsanpour, A.A. ve Komatsu, S., 2009, Potato responds to salt stress by increased activity of antioxidant enzymes, *Journal of Integrative Plant Biology*, 51(12): 1095-1103.
- Aghaei, K., Ehsanpour, A.A. ve Komatsu, S., 2008, Proteome analysis of potato under salt stress, *Journal of Proteome Research*, 7(11): p. 4858-4868.
- Al-Amin, Islam, M., M., Begum, S., Alam, M., Moniruzzaman, M. ve Patwary, M., 2013. Evaluation of rice germplasm under salt stress at the seedling stage through SSR markers, *International Journal of Agricultural Research, Innovation and Technology*, 3(1): 52-59.
- Ali, H., Muhammad, Z., Ullah, R., Majeed A. ve Inayat N., 2018, Germination, Growth and Yield Performance of Flax (*Linum usitatissimum* L.) Under Gamma Irradiation Stress, *Cercetari Agronomice in Moldova*, 51(2): 17-26.
- Alikamanoğlu, S., 1999, *İn vitro Tekniklerle Haploid Şeker Pancarı (Beta vulgaris L.) Bitkisinin Eldesi ve Somatik Mutasyonların Oluşturulmasında Gama Radyasyonunun Kullanılması*, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi.
- Al-Khayri, J. M., Jain, S.M ve Johnson, D.V., 2015, *Advances in plant breeding strategies: Breeding, biotechnology and molecular tools*, Springer.
- Alscher, R.G., Erturk, N. ve Heath, L.S., 2002, Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants, *Journal of Experimental Botany*, 53(372): 1331-1341.

- Al-Turki, T. ve Basahi, M.A., 2015, Assessment of ISSR based molecular genetic diversity of Hassawi rice in Saudi Arabia, *Saudi Journal of Biological Sciences*, 22(5): 591-599.
- Amirjani, M.R., 2011, Effect of salinity stress on growth, sugar content, pigments and enzyme activity of rice, *International Journal of Botany*, 7(1): 73-81.
- Amirjani, M.R., 2010, Effect of NaCl on some physiological parameters of rice, *Eur J Biol Sci*, 3(1): p. 6-16.
- Ardic, M., Sekmen, A.H., Tokur, S., Ozdemir F. ve Turkan, I., 2009, Antioxidant responses of chickpea plants subjected to boron toxicity, *Plant Biology*, 11(3): 328-338.
- Ariraman, M., Dhanavel,D., Seetharaman, N., Murugan, S. ve Ramkumar, R., 2018, Gamma Radiation influence on Growth, Biochemical and Yield Characters of *Cajanus cajan* (L.) Millsp, *Journal of Plant Stress Physiology*, 4:38-40.
- Arnon, D.I., 1949, Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*, *Plant Physiology*, 24(1): p. 1-15.
- Arora, A., Sairam, R. ve Srivastava, G., 2002, Oxidative stress and antioxidative system in plants, *Current science*, 1227-1238.
- Asch, F. ve Wopereis, M.C., 2001, Responses of field-grown irrigated rice cultivars to varying levels of floodwater salinity in a semi-arid environment, *Field Crops Research*, 70(2): 127-137.
- Askari, H., Edqvist, J., Hajheidari, M., Kafi, M. ve Salekdeh, H., 2006, Effects of salinity levels on proteome of *Suaeda aegyptiaca* leaves, *Proteomics*, 6(8): p. 2542-2554.
- Aslamsup, R., Bostansup, N., Mariasup, M. ve Safdar, W., 2011, A critical review on halophytes: salt tolerant plants, *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(33): 7108-7118.
- Atak, C., Alikamanoglu, S., Acik, L. ve Canbolat, Y., 2004, Induced of plastid mutations in soybean plant (*Glycine max* L. Merrill) with gamma radiation and determination with RAPD, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 556(1): p. 35-44.
- Awasthi, J.P., Saha, B., Regon, P., Sahoo, S., Chowra, U., Pradhan, A., Roy, A. ve Panda, S.K., 2017, Morpho-physiological analysis of tolerance to aluminum toxicity in rice varieties of North East India, *Plos One*, 12(4): e0176357.
- Awika, J.M., 2011, Major cereal grains production and use around the world. *Advances in cereal science: implications to food processing and health promotion*, ACS Publications: 1-13.
- Azman, A., Mhiri, C., Grandbastien, M. ve Tam, S., 2014, Transposable elements and the detection of somaclonal variation in plant tissue culture: a review, *Malaysian Applied Biology*, 43(1): 1-12.

- Bacha, H., Tekaya, M., Drine, S., Guasmi, F., Touil, L., Enneb, H., Triki, T., Cheour, F. and Ferchichi, A., 2017, Impact of salt stress on morpho-physiological and biochemical parameters of *Solanum lycopersicum* cv. Microtom leaves, *South African Journal of Botany*, 108: 364-369.
- Badawi, G.H., Yamauchi, Y., Shimada, E., Sasaki, R., Kawano, N., Tanaka, K. ve Tanaka, K., 2004, Enhanced tolerance to salt stress and water deficit by overexpressing superoxide dismutase in tobacco (*Nicotiana tabacum*) chloroplasts, *Plant Science*, 166(4): 919-928.
- Bado, S., Forster, B.P., Nielen, S., Ali, A.M., Lagoda, P.J.L., Till B.J. ve Laimer, M., 2015, Plant Mutation Breeding: Current Progress and Future Assessment, *Plant Breeding Reviews*: (39)23-88.
- Baier, M. ve Dietz, K.J., 1997, The plant 2-Cys peroxiredoxin BAS1 is a nuclear-encoded chloroplast protein: its expressional regulation, phylogenetic origin, and implications for its specific physiological function in plants, *The Plant Journal*, 12(1): 179-190.
- Bandehagh, A., Salekdeh, G.H., Toorchi M., Mohammadi, A. ve Komatsu, S., 2011, Comparative proteomic analysis of canola leaves under salinity stress. *Proteomics*, 11(10): p. 1965-1975.
- Bao, Y., Song, W.M., Jin, Y.L., Jiang, C.M., Yang, Y., Li, B., Huang, W.J., Liu, H. ve Zhang H.X., 2014, Characterization of Arabidopsis Tubby-like proteins and redundant function of AtTLP3 and AtTLP9 in plant response to ABA and osmotic stress, *Plant Molecular Biology*, 86(4-5): 471-483.
- Barkla, B.J., Vera-Estrella, R., Hernandez-Coronado, M. ve Pantoja, O., 2009, Quantitative proteomics of the tonoplast reveals a role for glycolytic enzymes in salt tolerance, *The Plant Cell*, 21(12): p. 4044-4058.
- Bashir, K., Nagasaka, S., Itai, R.N., Kobayashi, T., Takahashi, M., Nakanishi, H., Mori, S. ve Nishizawa, N.K., 2007, Expression and enzyme activity of glutathione reductase is upregulated by Fe-deficiency in graminaceous plants, *Plant Molecular Biology*, 65(3): 277-284.
- Bates, L.S., Waldren, R.P. ve Teare, I.D., 1973, Rapid determination of free proline for water-stress studies, *Plant and Soil*, 39(1): p. 205-207.
- Baulcombe, D., Crute, I., Davies, B., Dunwell, J., Gale, M., Jones, J., Pretty, J., Sutherland, W. ve Toulmin, C., 2009, Reaping the benefits: science and the sustainable intensification of global agriculture, *The Royal Society*.
- Beauchamp, C. ve Fridovich, I., 1971, Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels, *Analytical Biochemistry*, 44(1): p. 276-87.
- Belmehdi, O., El Harsal, A., Benmoussi, M., Laghmouchi, Y., Senhaji, N.S. ve Abrini, J., 2018, Effect of light, temperature, salt stress and pH on seed germination of medicinal plant *Origanum elongatum* (Bonnet) Emb. & Maire, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*.

- Binte Mostafiz, S. ve Wagiran, A., 2018, Efficient Callus Induction and Regeneration in Selected Indica Rice, *Agronomy*, 8(5): 77.
- Bose, J., Rodrigo-Moreno, A. ve Shabala, S., 2014, ROS homeostasis in halophytes in the context of salinity stress tolerance, *Journal of Experimental Botany*, 65(5): 1241-1257.
- Bradford, M.M., 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem*, 72: p. 248-54.
- Broin, M. ve Rey, P., 2003, Potato plants lacking the CDSP32 plastidic thioredoxin exhibit overoxidation of the BAS1 2-cysteine peroxiredoxin and increased lipid peroxidation in thylakoids under photooxidative stress, *Plant physiology*, 132(3): 1335-1343.
- Campbell, M.T., Bandillo, N., Al Shiblawi, F.R.A., Sharma, S., Liu, K., Du, Q., Schmitz, A.J., Zhang, C., Véry, A.A. ve Lorenz, A.J., 2017, Allelic variants of OsHKT1; 1 underlie the divergence between indica and japonica subspecies of rice (*Oryza sativa*) for root sodium content, *PLoS Genetics*, 13(6): e1006823.
- Cardon, G.E., Davis, J., Bauder, T. ve Waskom, R., 2003, Managing saline soils, *Colorado State University Cooperative Extension*.
- Caruso, G., Cavalier, C., Guarino, C., Gubbiotti, R., Foglia, P. Ve Lagana, A., 2008, Identification of changes in *Triticum durum* L. leaf proteome in response to salt stress by two-dimensional electrophoresis and MALDI-TOF mass spectrometry, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391(1): p. 381-390.
- Chattopadhyay, A., Subba, P., Pandey, A., Bhushan, D., Kumar, R., Datta, A., Chakraborty, S., ve Chakraborty, N., 2011, Analysis of the grasspea proteome and identification of stress-responsive proteins upon exposure to high salinity, low temperature, and abscisic acid treatment, *Phytochemistry*, 72(10): p. 1293-1307.
- Chen, X., Wang, Y., Li, J., Jiang, A., Cheng, Y. ve Zhang, W., 2009a, Mitochondrial proteome during salt stress-induced programmed cell death in rice, *Plant Physiology and Biochemistry*, 47(5): 407-415.
- Chen, S., N. Gollop ve B. Heuer, 2009b, Proteomic analysis of salt-stressed tomato (*Solanum lycopersicum*) seedlings: effect of genotype and exogenous application of glycinebetaine, *Journal of Experimental Botany*, 60(7): p. 2005-2019.
- Cheng, Y., Qi, Y., Zhu, Q., Chen, X., Wang, N., Zhao, X., Chen, H., Cui, X., Xu, L. ve Zhang, W., 2009, New changes in the plasma-membrane-associated proteome of rice roots under salt stress, *Proteomics*, 9(11): p. 3100-3114.
- Chitteti, B.R. ve Peng, Z., 2007, Proteome and phosphoproteome differential expression under salinity stress in rice (*Oryza sativa*) roots, *Journal of Proteome Research*, 6(5): p. 1718-1727.
- Chowdhury, M., Moseki, B. ve Bowling, D., 1995, A method for screening rice plants for salt tolerance, *Plant and soil*, 171(2): 317-322.

- Chunthaburee, S., Dongsansuk, A., Sanitchon, J., Pattanagul, W. ve Theerakulpisut, P., 2016, Physiological and biochemical parameters for evaluation and clustering of rice cultivars differing in salt tolerance at seedling stage, *Saudi Journal of Biological Sciences*, 23(4): 467-477.
- Chutipaijit, S., Cha-um, S. ve Sompornpailin, K., 2011, High contents of proline and anthocyanin increase protective response to salinity in '*Oryza sativa*' L. spp. 'indica', *Australian Journal of Crop Science*, 5(10): p. 1191.
- Crosbie, T.M., Eathington, S.R., Johnson Sr, G.R., Edwards, M., Reiter, R., Stark, S., Mohanty, R.G., Oyervides, M., Buehler, R.E. ve Walker, A.K., 2006, Plant breeding: past, present, and future, *Plant breeding: the Arnel R. Hallauer international symposium*, Wiley Online Library.
- Çelik, Ö., 2010, *Gama Radyasyonu İle Tuza Toleranslı Tütün (Nicotiana tabacum L.) Mutantlarının Eldesi ve Seleksiyonu*, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi.
- Çelik, Ö., Meriç, S., Ayan, A. ve Atak, C., 2019, Epigenetic analysis of WRKY transcription factor genes in salt stressed rice (*Oryza sativa* L.) plants, *Environmental and Experimental Botany*, 159: p. 121-131.
- Dahiya, A. ve Saini, R., 2016, Diversity of Rice: In Aspects of Nutritional, Medicinal and Water Saving Agriculture, *Journal of Agriculture and Veterinary Science*, 9(9)II: 1-4.
- Dassanayake, M., Oh, D., Haas, J.S., Hernandez, A., Hong, H., Ali, S., Yun, D., Bressan, R.A., Zhu, J., Bohnert, H.J., ve Cheeseman, J.M., 2011, The genome of the extremophile crucifer *Thellungiella parvula*, *Nature genetics*, 43(9): p. 913.
- Demiral, T. ve Turkan, I., 2004, Does exogenous glycinebetaine affect antioxidative system of rice seedlings under NaCl treatment?, *J Plant Physiol*, 161(10): 1089-1100.
- Devraj, K., Geguchadze, R., Klinger, M.E., Freeman, W.M., Mokashi, A., Hawkins, R.A. ve Simpson, I.A., 2009, Improved membrane protein solubilization and clean-up for optimum two-dimensional electrophoresis utilizing GLUT-1 as a classic integral membrane protein, *Journal of neuroscience methods*, 184(1): p. 119-123.
- Dhawan, O. ve Lavania, U., 1996, Enhancing the productivity of secondary metabolites via induced polyploidy: a review, *Euphytica*, 87(2): p. 81-89.
- Dionisio-Sese, M.L. ve Tobita, S., 1998, Antioxidant responses of rice seedlings to salinity stress, *Plant Science*, 135(1): 1-9.
- Dobermann, A., Nelson, R., Beever, D., Bergvinson, D., Crowley, E., Denning, G., Giller, K., d'Arros Hughes, J., Jahn, M. ve Lynam J., 2013, Solutions for sustainable agriculture and food systems, *United Nations Sustainable Development Solutions Network*, Paris, France.
- Dooki, A.D., Mayer-Posner, F., Askari, H., Zaiee, A. ve Salekdeh, G.H., 2006, Proteomic responses of rice young panicles to salinity, *Proteomics*, 6(24): p. 6498-6507.

- Dos Santos, C. V. ve Rey, P., 2006, Plant thioredoxins are key actors in the oxidative stress response, *Trends in Plant Science*, 11(7): 329-334.
- Du, B., Nian, H., Zhang, Z. ve Yang, C., 2010, Effects of aluminum on superoxide dismutase and peroxidase activities, and lipid peroxidation in the roots and calluses of soybeans differing in aluminum tolerance, *Acta Physiologiae Plantarum*, 32(5): 883-890.
- Dubey, R., 1999, Protein synthesis by plants under stressful conditions, *Handbook of plant and crop stress*, 2: p. 365-397.
- Dubey, R. ve Singh, A., 1999, Salinity induces accumulation of soluble sugars and alters the activity of sugar metabolising enzymes in rice plants, *Biologia Plantarum*, 42(2): 233-239.
- Emamverdian, A., Ding, Y., Mokhberdoran, F. ve Xie, Y., 2015, Heavy metal stress and some mechanisms of plant defense response, *The Scientific World Journal*, 2015: 18.
- Faiyue, B., Al-Azzawi, M.J. ve Flowers, T.J., 2012, A new screening technique for salinity resistance in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings using bypass flow, *Plant, Cell & Environment*, 35(6): 1099-1108.
- FAO, 2015, World food and agriculture, *Food and Agriculture Organization of the United Nations*, Rome.
- FAO, 2016, The State of Food Insecurity in the World 2015. Meeting the 2015 international hunger targets: taking stock of uneven progress." *Food and Agriculture Organization Publications*, Rome.
- FAO, 2017, Crops and Livestock Products, Son Erişim: 19.08.2017, Link: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/TP>.
- Fatehi, F., Hossainzadeh, A., Alizadeh, H., Brimavandi, T. ve Struik, P.C., 2012, The proteome response of salt-resistant and salt-sensitive barley genotypes to long-term salinity stress, *Molecular Biology Reports*, 39(5): p. 6387-6397.
- Fink, R.C. ve Scandalios, J.G., 2002, Molecular evolution and structure–function relationships of the superoxide dismutase gene families in angiosperms and their relationship to other eukaryotic and prokaryotic superoxide dismutases, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 399(1): 19-36.
- Flowers, T. J. ve Colmer, T.D., 2015, Plant salt tolerance: adaptations in halophytes, *Annals of Botany*, 115(3): 327-331.
- Foyer, C. H., Lelandais, M. ve Kunert, K.J., 1994, Photooxidative stress in plants, *Physiologia Plantarum*, 92(4): 696-717.
- Franco, J.G., Franco, S.S.H., Franco, C.H., Arthur, V., Arthur, P.B., Villavicencio, A.L.C., 2017, Low doses of gamma radiation in soybean, *International Nuclear Atlantic Conference*.

- Freisleben, R. Ve Lein, A., 1942, Über die Auffindung einer mehltreueresistenten Mutante nach Röntgenbestrahlung einer anfälligen reinen Linie von Sommergerste, *Naturwissenschaften*, 30(40): p. 608-608.
- Fuller, D.Q., 2011, Pathways to Asian civilizations: Tracing the origins and spread of rice and rice cultures, *Rice*, 4(3-4): 78-92.
- Geissler, N., Hussin, S. ve Koyro, H.-W., 2010, Elevated atmospheric CO₂ concentration enhances salinity tolerance in *Aster tripolium* L. *Planta*, 231(3): p. 583-594.
- Gharsallah, C., Fakhfakh, H., Grubb, D. ve Gorsane, F., 2016, Effect of salt stress on ion concentration, proline content, antioxidant enzyme activities and gene expression in tomato cultivars, *AoB Plants*, 8: plw055.
- Ghosh, B., Md, N.A. ve Gantait, S., 2016, Response of Rice under Salinity Stress: A Review Update, *Rice Research*, Open Access: 1-8.
- Giuffrida, F., Cassaniti, C., Malvuccio, A. ve Leonardi, C., 2017, Effects of salt stress imposed during two growth phases on cauliflower production and quality, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(5): 1552-1560.
- Godoy, J.A., Lunar, L., Torres-Schumann, S., Moreno, J., Rodrigo, R.M. ve Pintor-Toro, J.A., 1994, Expression, tissue distribution and subcellular localization of dehydrin TAS14 in salt-stressed tomato plants, *Plant Molecular Biology*, 26(6): p. 1921-1934.
- Gong, D., Wang, G., Si, W., Zhou, Y., Liu, Z. ve Jia, J., 2018, Effects of Salt Stress on Photosynthetic Pigments and Activity of Ribulose-1, 5-bisphosphate Carboxylase/Oxygenase in *Kalidium foliatum*, *Russian Journal of Plant Physiology*, 65(1): 98-103.
- Gong, Q., Li, P., Ma, S., Rupassara, S.I. ve Bohnert, H.J., 2005, Salinity stress adaptation competence in the extremophile *Thellungiella halophila* in comparison with its relative *Arabidopsis thaliana*, *The Plant Journal*, 44(5): p. 826-839.
- Goss, T. ve Hanke, G., 2014, The end of the line: can ferredoxin and ferredoxin NADP (H) oxidoreductase determine the fate of photosynthetic electrons?, *Current Protein and Peptide Science*, 15(4): 385-393.
- Green, T.G.A., Sancho, L.G., Pintado, A., Saco, D., Martín, S., Arróniz-Crespo, M., Angel Casermeiro, M., de la Cruz Caravaca, M.T., Cameron, S. ve Rozzi, R., 2017, Sodium chloride accumulation in glycophyte plants with cyanobacterial symbionts, *AoB Plants*, 9(6): plx053.
- Gregorio, G.B., 1997, Tagging salinity tolerance genes in rice using amplified fragment length polymorphism (AFLP), *agris.fao.org*.
- Gronow, M. ve Griffiths, G., 1971, Rapid isolation and separation of the non-histone proteins of rat liver nuclei, *Febs Letters*, 15(5): 340-344.

- Guan, Q., Liao, X., He, M., Li, X., Wang, Z., Ma, H., Yu, S. ve Liu, S., 2017, Tolerance analysis of chloroplast OsCu/Zn-SOD overexpressing rice under NaCl and NaHCO₃ stress, *PloS One*, 12(10): e0186052.
- Guan, Q., Takano, T. ve Liu, S., 2012, Genetic transformation and analysis of rice OsAPX2 gene in *Medicago sativa*, *PloS One*, 7(7): e41233.
- Guo, L., Devaiah, S.P., Narasimhan, R., Pan, X., Zhang, Y., Zhang, W. ve Wang, X., 2012, Cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases interact with phospholipase D δ to transduce hydrogen peroxide signals in the *Arabidopsis* response to stress, *The Plant Cell*, 24(5): 2200-2212.
- Gupta, P.K., Varshney, R.K. ve Prasad, R., 2002, Molecular markers: principles and methodology, *Molecular techniques in crop improvement*, Springer, 9-54.
- Gupta, S., Garg, V., Kant, C. ve Bhatia, S., 2015, Genome-wide survey and expression analysis of F-box genes in chickpea, *BMC Genomics*, 16(1): 67.
- Hallett, J., 2002, Climate change 2001: The scientific basis. Contribution of Working Group I to the Third Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change, *Cambridge University Press*, Cambridge, 881pp.
- Hariadi, Y.C., Nurhayati, A.Y., Soeparjono, S. ve Arif, I., 2015, Screening six varieties of rice (*Oryza sativa*) for salinity tolerance, *Procedia Environmental Sciences*, 28: p. 78-87.
- Hashimoto, M., Kisseleva, L., Sawa, S., Furukawa, T., Komatsu, S. ve Koshiba, T., 2004, A novel rice PR10 protein, RSOsPR10, specifically induced in roots by biotic and abiotic stresses, possibly via the jasmonic acid signaling pathway, *Plant and cell physiology*, 45(5): p. 550-559.
- Hayashi, G., Moro, C.F., Rohila, J.S., Shibato, J., Kubo, A., Imanaka, T., Kimura, S., Ozawa, S., Fukutani, S. ve Endo, S., 2015, 2D-DIGE-based proteome expression changes in leaves of rice seedlings exposed to low-level gamma radiation at Iitate village, Fukushima, *Plant Signaling & Behavior*, 10(12): e1103406.
- Hayat, S., Hayat, Q., Alyemeni, M.N., Wani, A.S., Pichtel, J. ve Ahmad, A., 2012, Role of proline under changing environments: a review, *Plant Signaling & Behavior*, 7(11): 1456-1466.
- Hazman, M., Hause, B., Eiche, E., Nick, P. ve Riemann, M., 2015, Increased tolerance to salt stress in OPDA-deficient rice allene oxide cyclase mutants is linked to an increased ROS-scavenging activity, *Journal of Experimental Botany*, 66(11): 3339-3352.
- Heide, H., Kalisz, H.M. ve Follmann, H., 2004, The oxygen evolving enhancer protein 1 (OEE) of photosystem II in green algae exhibits thioredoxin activity, *Journal of Plant Physiology*, 161(2): 139-149.
- Hernandez, J., Campillo, A., Jimenez, A., Alarcon, J. ve Sevilla, F., 1999, Response of antioxidant systems and leaf water relations to NaCl stress in pea plants, *The New Phytologist*, 141(2): 241-251.

- Hernandez, J., Jimenez, A., Mullineaux, P. ve Sevilla, F., 2000, Tolerance of pea (*Pisum sativum* L.) to long-term salt stress is associated with induction of antioxidant defences, *Plant, Cell & Environment*, 23(8): 853-862.
- Hernández, J.A. ve Almansa, M.S., 2002, Short-term effects of salt stress on antioxidant systems and leaf water relations of pea leaves, *Physiologia Plantarum*, 115(2): 251-257.
- Hoang, T.M., Moghaddam, L., Williams, B., Khanna, H., Dale, J. ve Mundree, S.G., 2015, Development of salinity tolerance in rice by constitutive-overexpression of genes involved in the regulation of programmed cell death, *Frontiers in Plant Science*, 6: 175.
- Hoang, T.M.L., Tran, T.N., Nguyen, T.K.T, Williams, B., Wurm, P., Bellairs, S. ve Mundree, S., 2016, Improvement of salinity stress tolerance in rice: challenges and opportunities, *Agronomy*, 6(4): 54.
- Hong, M.J., Kim, D.Y. ve Seo, Y.W., 2015, Interactions between wheat Tubby-like and SKP1-like proteins, *Genes & Genetic Systems*, 90(5): 293-304.
- Hong, S.H., Tripathi, B.N., Chung, M.-S., Cho, C., Lee, S., Kim, J.-H., Bai, H.-W., Bae, H.-J., Cho, H.-Y. ve Chung, B.Y., 2018a, Functional switching of ascorbate peroxidase 2 of rice (OsAPX2) between peroxidase and molecular chaperone, *Scientific Reports*, 8(1): 9171.
- Hong, M.J., Kim, D.Y., Ahn, J.-W., Kang, S.-Y., Seo, Y.W. ve Kim, J.-B., 2018b, Comparison of radiosensitivity response to acute and chronic gamma irradiation in colored wheat, *Genetics and Molecular Biology Online Ahead of Print*.
- Hoque, T.S., Hossain, M.A., Mostofa, M.G., Burritt, D.J., Fujita, M. ve Tran, L.-S.P., 2016, Methylglyoxal: an emerging signaling molecule in plant abiotic stress responses and tolerance, *Frontiers in Plant Science*, 7: 1341.
- Horie, T., Karahara, I. ve Katsuhara, M., 2012, Salinity tolerance mechanisms in glycophytes: An overview with the central focus on rice plants, *Rice*, 5(1): 11.
- Hossain, M.M., Liu, X., Qi, X., Lam, H.-M. ve Zhang, J., 2014, Differences between soybean genotypes in physiological response to sequential soil drying and rewetting, *The Crop Journal*, 2(6): 366-380.
- IAEA, 2017, Mutant Variety Database, Son Erişim: 14.08.2017, Link: <https://mvd.iaea.org>.
- Ilahi, I., Bano, S., Jabeen, M. ve Rahim, F., 2005, Micropropagation of rice (*Oryza sativa* L. cv Swat-II) through somatic embryogenesis, *Pakistan Journal of Botany*, 37(2): 237.
- IRRI, 2017, World Rice Statistics Online Query Facility, Son Erişim: 17.08.2017, Link: <http://ricestat.irri.org:8080/wrsv3/entrypoint.htm>.
- Ishikawa, T. ve Shigeoka, S., 2008, Recent advances in ascorbate biosynthesis and the physiological significance of ascorbate peroxidase in photosynthesizing organisms, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 72(5): 1143-1154.

- Izawa, T. ve Shimamoto, K., 1996, Becoming a model plant: the importance of rice to plant science, *Trends in Plant Science*, 1(3): p. 95-99.
- Jackson, S.A., 2016, Rice: the first crop genome, *Rice*, 9(1): 14.
- Jain, S.M., Brar, D.S. ve Ahloowalia, B., 2013, Somaclonal variation and induced mutations in crop improvement, *Springer Science & Business Media*.
- Jamil, M., Bashir, S., Anwar, S., Bibi, S., Bangash, A., Ullah, F. Ve Rha, E.S. 2012, Effect of salinity on physiological and biochemical characteristics of different varieties of rice, *Pak. J. Bot*, 44(2012): p. 7-13.
- Jang, H.H., Chi, Y.H., Park, S.K., Lee, S.S., Lee, J.R., Park, J.H., Moon, J.C., Lee, Y.M., Kim, S.Y. ve Lee, K.O., 2006, Structural and functional regulation of eukaryotic 2-Cys peroxiredoxins including the plant ones in cellular defense-signaling mechanisms against oxidative stress, *Physiologia Plantarum*, 126(4): 549-559.
- Jankangram, W., Thammasirirak, S., Jones, M.G., Hartwell, J. ve Theerakulpisut, P., 2011, Proteomic and transcriptomic analysis reveals evidence for the basis of salt sensitivity in Thai jasmine rice (*Oryza sativa* L. cv. KDML 105), *African Journal of Biotechnology*, 10(72): 16157-16166.
- Jankowicz-Cieslak, J., Tai, T.H., Kumlehn, J. ve Till, B.J., 2016, *Biotechnologies for Plant Mutation Breeding*, Springer.
- Jehan, T. ve Lakhanpaul, S., 2006, Single nucleotide polymorphism (SNP)–methods and applications in plant genetics: a review, *Indian Journal of Biotechnology*, 5:435-459pp.
- Jiang, Q., Hu, Z., Zhang, H. ve Ma, Y., 2014, Overexpression of GmDREB1 improves salt tolerance in transgenic wheat and leaf protein response to high salinity, *The Crop Journal*, 2(2-3): 120-131.
- Jiang, Y., Yang, B., Harris, N.S., Deyholos, M.K., 2007, Comparative proteomic analysis of NaCl stress-responsive proteins in *Arabidopsis* roots, *Journal of experimental botany*, 58(13): p. 3591-3607.
- Jiya, M., Olamide, F., Yusuf, D.O.A., Abdulhakeem, A., Muhammad, M.L., Zulukanaini, S.B. ve David, T.S., 2018, Effects of gamma irradiation on submergence tolerance of two selected varieties of lowland rice (*Oryza sativa* L.), *GSC Biological and Pharmaceutical Sciences*, 02(03): 031–037.
- Joseph, E., Mohanan, K. ve Radhakrishnan, V., 2015a, Effect of salinity variation on the quantity of antioxidant enzymes in some rice cultivars of North Kerala, India, *Univers J Agric Res*, 3: 89-105.
- Joseph, E., Radhakrishnan, V. ve Mohanan, K., 2015b, A Study on the accumulation of Proline–an osmoprotectant amino acid under salt stress in some native rice cultivars of north Kerala, India, *Universal Journal of Agricultural Research*, 3(1): 15-22.
- Juliano, B.O., 1993, Rice in human nutrition, *IRRI Food and Nutrition Series*, 26.

- Kanawapee, N., Sanitchon, J., Srihaban, P. ve Theerakulpisut, P., 2011, Genetic diversity analysis of rice cultivars (*Oryza sativa* L.) differing in salinity tolerance based on RAPD and SSR markers, *Electronic Journal of Biotechnology*, 14(6): p. 2-2.
- Kanber, R., Çullu, M.A., Kendirli, B., Antepi, S. ve Yılmaz, N., 2005, Sulama, Drenaj ve Tuzluluk, *Türkiye Ziraat Mühendisliği VI. Teknik Kongresi*, 3-7.
- Kang, S., Chen, S. ve Dai, S., 2010, Proteomics characteristics of rice leaves in response to environmental factors, *Frontiers in Biology*, 5(3): 246-254.
- Kant, S., Kant, P., Raveh, E. ve Barak, S., 2006, Evidence that differential gene expression between the halophyte, *Thellungiella halophila*, and *Arabidopsis thaliana* is responsible for higher levels of the compatible osmolyte proline and tight control of Na⁺ uptake in *T. halophila*, *Plant, Cell & Environment*, 29(7): p. 1220-1234.
- Kara, Y., Ergün, Z. ve Vaizogullari, H.E., 2016, The effect of different gamma radiation applied on Tokak-157/37 barley (*Hordeum vulgare*) and Karahan-99 wheat (*Triticum aestivum*) on M₁ generation, *International Journal of Secondary Metabolite*, Vol. 2, Issue 1, pp. 8-12.
- Kaur, C., Sharma, S., Singla-Pareek, S.L. ve Sopory, S.K., 2015, Methylglyoxal, triose phosphate isomerase, and glyoxalase pathway: implications in abiotic stress and signaling in plants, *Elucidation of Abiotic Stress Signaling in Plants*, Springer: 347-366.
- Keown, J.R., Griffin, M.D., Mertens, H.D. ve Pearce, F.G., 2013, Small oligomers of ribulose-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) activase are required for biological activity, *Journal of Biological Chemistry*, 288(28): 20607-20615.
- Khan, M.A. ve Abdullah, Z., 2003, Salinity–sodicity induced changes in reproductive physiology of rice (*Oryza sativa*) under dense soil conditions, *Environmental and Experimental Botany*, 49(2): 145-157.
- Khan, W.M., Muhammad, Z., Akhtar, N., Burni, T., Younas, A. ve Umar, N., 2018, Gamma radiation induced mutation in M2 generation of Pea (*Pisum sativum* L.), *Pure and Applied Biology*, 7(2): 832-839.
- Khattak, M.S., Abiri, R., Valdiani, A., Atabaki, N., Shariat, M., Talei, D. ve Maziah, M., 2017, Somatic embryogenesis and in-vitro regeneration of rice (*Oryza sativa* L.) cultivars under one-step and multiple-step salinity stresses, *Journal of Plant Breeding and Genetics*, 5(2): 75-89.
- Kim, D.W., Rakwal, R., Agrawal, G.K., Jung, Y., Shibato, J., Jwa, N., Iwahashi, Y., Iwakashi, H., Kim, D.H., Shim, I. ve Usui, K., 2005, A hydroponic rice seedling culture model system for investigating proteome of salt stress in rice leaf, *Electrophoresis*, 26(23): p. 4521-4539.
- Kim, K.-Y., Huh, G.-H., Lee, H.-S., Kwon, S.-Y., Hur, Y. ve Kwak, S.-S., 1999, Molecular characterization of cDNAs for two anionic peroxidases from suspension cultures of sweet potato, *Molecular and General Genetics*, 261(6): 941-947.

- Kim, S.-K., You, Y.N., Park, J.C., Joung, Y., Kim, B.-G., Ahn, J.C. ve Cho, H.S., 2012, The rice thylakoid lumenal cyclophilin OsCYP20-2 confers enhanced environmental stress tolerance in tobacco and *Arabidopsis*, *Plant Cell Reports*, 31(2): 417-426.
- Kim, S.Y., Jang, H.H., Lee, J.R., Sung, N.R., Lee, H.B., Lee, D.H., Park, D.-J., Kang, C.H., Chung, W.S. ve Lim, C.O., 2009, Oligomerization and chaperone activity of a plant 2-Cys peroxiredoxin in response to oxidative stress, *Plant Science*, 177(3): 227-232.
- Kong-ngern, K., Bunnag, S. ve Theerakulpisut, P., 2012, Activity as potential indicators for salt tolerance in rice (*Oryza sativa* L.), *International Journal of Botany*, 8(2): 54-65.
- Kong-Ngern, K., Daduang, S., Wongkham, C., Bunnag, S., Kosittrakun, M. ve Theerakulpisut, P., 2005, Protein profiles in response to salt stress in leaf sheaths of rice seedlings, *Science Asia*, 31: 403-408.
- Korkmaz, N., Gündüz, M. ve Şerafettin, A., 2016, Gediz Nehri'nin Güneyindeki Tarım Alanlarının Taban Suyu Seviyesi ve Kalitesinin Zamansal Değişimi, *Derim*, 33(2): 263-278.
- Kosová, K., Vítámvás, P., Urban, M.O. ve Prášil, I.T., 2013a, Plant proteome responses to salinity stress—comparison of glycophytes and halophytes, *Functional Plant Biology*, 40(9): 775-786.
- Kosová, K., Prášil, I.T. ve Vítámvás, P., 2013b, Protein contribution to plant salinity response and tolerance acquisition, *International Journal of Molecular Sciences*, 14(4): 6757-6789.
- Kumar, K., Kumar, M., Kim, S.-R., Ryu, H. ve Cho, Y.-G., 2013, Insights into genomics of salt stress response in rice, *Rice*, 6(1): 27.
- Kumar, R.R., Goswami, S., Singh, K., Dubey, K., Singh, S., Sharma, R., Verma, N., Kala, Y.K., Rai, G.K. ve Grover, M., 2016, Identification of putative RuBisCo Activase (TaRca1)—the catalytic chaperone regulating carbon assimilatory pathway in wheat (*Triticum aestivum*) under the heat stress, *Frontiers in Plant Science*, 7: 986.
- Kumar, V., Shriram, V., Nikam, T., Jawali, N. ve Shitole, M.G., 2009, Antioxidant enzyme activities and protein profiling under salt stress in indica rice genotypes differing in salt tolerance, *Archives of Agronomy and Soil Science*, 55(4): 379-394.
- Kurek, I., Chang, T.K., Bertain, S.M., Madrigal, A., Liu, L., Lassner, M.W. ve Zhu, G., 2007, Enhanced thermostability of *Arabidopsis* Rubisco activase improves photosynthesis and growth rates under moderate heat stress, *The Plant Cell*, 19(10): 3230-3241.
- Laemmli, U.K., 1970, Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, *Nature*, 227(5259): 680-685.
- Laghmouchi, Y., Belmehdi, O., Bouyahya, A., Senhaji, N.S. ve Abrini, J., 2017, Effect of temperature, salt stress and pH on seed germination of medicinal plant *Origanum compactum*, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 10: 156-160.

- Lagoda, P., 2007, Effects of mutagenic agents on the DNA sequence in plants, *Plant Breeding and Genetics Newsletter*, 19: 13-14.
- Lee, D.-G., Park, K.-W., An, J.W, Sohn, Y.G., Ha, J.K., Kim, H.Y., Bae, D.W., Lee, K.H., Kang, N.J. ve Lee, B.-H., 2011, Proteomics analysis of salt-induced leaf proteins in two rice germplasms with different salt sensitivity, *Canadian Journal of Plant Science*, 91(2): 337-349.
- Lee, D.H., Kim, Y.S. ve Lee, C.B., 2001, The inductive responses of the antioxidant enzymes by salt stress in the rice (*Oryza sativa* L.), *Journal of Plant Physiology*, 158(6): 737-745.
- Lehnert, S., 2007, Biomolecular action of ionizing radiation, *CRC Press*.
- Li, J.Y., Jiang, A.L. ve Zhang, W., 2007, Salt Stress-induced Programmed Cell Death in Rice Root Tip Cells, *Journal of Integrative Plant Biology*, 49(4): 481-486.
- Li, W., Zhang, C., Lu, Q., Wen, X. ve Lu, C., 2011, The combined effect of salt stress and heat shock on proteome profiling in *Suaeda salsa*, *Journal of Plant Physiology*, 168(15): p. 1743-1752.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. ve Randall, R.J., 1951, Protein measurement with the Folin phenol reagent, *Journal of Biological Chemistry*, 193(1): 265-275.
- Lu, Z., Liu, D. ve Liu, S., 2007, Two rice cytosolic ascorbate peroxidases differentially improve salt tolerance in transgenic *Arabidopsis*, *Plant Cell Reports*, 26(10): 1909-1917.
- Lutts, S., Kinet, J. ve Bouharmont, J., 1996, Effects of various salts and of mannitol on ion and proline accumulation in relation to osmotic adjustment in rice (*Oryza sativa* L.) callus cultures, *Journal of Plant Physiology*, 149(1-2): p. 186-195.
- Ma, B., Gao, L., Zhang, H., Cui, J. ve Shen, Z., 2012, Aluminum-induced oxidative stress and changes in antioxidant defenses in the roots of rice varieties differing in Al tolerance, *Plant Cell Reports*, 31(4): 687-696.
- Macgillivray, A.J. ve Wood, D.R., 1974, The Heterogeneity of Mouse-Chromatin Nonhistone Proteins as Evidenced by Two-Dimensional Polyacrylamide-Gel Electrophoresis and Ion-Exchange Chromatography, *The FEBS Journal*, 41(1): 181-190.
- Magdeldin, S., Enany, S., Yoshida, Y., Xu, B., Zhang, Y., Zureena, Z., Lokamani, I., Yaoita, E. ve Yamamoto, T., 2014, Basics and recent advances of two dimensional-polyacrylamide gel electrophoresis, *Clinical Proteomics*, 11(1): 16.
- Manaa, A., Ahmed, H.B., Valot, B., Bouchet, J., Aschi-Smiti, S., Causse, M. ve Faurobert, M., 2011, Salt and genotype impact on plant physiology and root proteome variations in tomato, *Journal of Experimental Botany*, 62(8): p. 2797-2813.
- Matsuo, T. ve Hoshikawa, K., 1993, Science of the rice plant, *Food and Agriculture Policy Research Center*, Tokyo.

- Mattioli, R., Costantino, P. ve Trovato, M., 2009, Proline accumulation in plants: not only stress, *Plant Signaling & Behavior*, 4(11): 1016-1018.
- Méchin, V., Damerval, C. ve Zivy, M., 2007, Total protein extraction with TCA-acetone, *Plant Proteomics, Springer*: 1-8.
- Melchiorre, M., Robert, G., Trippi, V., Racca, R. ve Lascano, H.R., 2009, Superoxide dismutase and glutathione reductase overexpression in wheat protoplast: photooxidative stress tolerance and changes in cellular redox state, *Plant Growth Regulation*, 57(1): 57.
- Meloni, D.A., Oliva, M.A., Martinez, C.A. ve Cambraia, J., 2003, Photosynthesis and activity of superoxide dismutase, peroxidase and glutathione reductase in cotton under salt stress, *Environmental and Experimental Botany*, 49(1): 69-76.
- Mishra, P., Bhoomika, K. ve Dubey, R., 2013, Differential responses of antioxidative defense system to prolonged salinity stress in salt-tolerant and salt-sensitive Indica rice (*Oryza sativa* L.) seedlings, *Protoplasma*, 250(1): 3-19.
- Moons, A., Bauw, G., Prinsen, E., Montagu, M.V. ve Straeten, V.D., 1995, Molecular and physiological responses to abscisic acid and salts in roots of salt-sensitive and salt-tolerant Indica rice varieties, *Plant Physiology*, 107(1): p. 177-186.
- Mostofa, M.G., Hossain, M.A., Fujita, M. ve Tran, L.-S.P., 2015, Physiological and biochemical mechanisms associated with trehalose-induced copper-stress tolerance in rice, *Scientific Reports*, 5: 11433.
- Motohashi, T., Nagamiya, K., Prodhon, S.H., Nakao, K., Shishido, T., Yamamoto, Y., Moriwaki, T., Hattori, E., Asada, M. ve Morishima, H., 2007, Production of salt stress tolerant rice by overexpression of the catalase gene, *katE*, derived from *Escherichia coli*, *Proceedings Asia Pacific Conference on Plant Tissue and Agribiotechnology*, 18(1): 37-41.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. Ve Erlich, H., 1986, Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. in Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology, *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- Munns, R., 2002, Comparative physiology of salt and water stress, *Plant, cell & environment*, 25(2): p. 239-250.
- Munns, R. ve Tester, M., 2008, Mechanisms of Salinity Tolerance, *Annual Review of Plant Biology*, 59(1): 651-681.
- Muranaka, S., Shimizu, K. ve Kato, M., 2002, Ionic and osmotic effects of salinity on single-leaf photosynthesis in two wheat cultivars with different drought tolerance, *Photosynthetica*, 40(2): 201-207.
- Murshed, R., Lopez-Lauri, F. ve Sallanon, H., 2013, Effect of water stress on antioxidant systems and oxidative parameters in fruits of tomato (*Solanum lycopersicon* L, cv. Micro-tom), *Physiol Mol Biol Plants*, 19(3): 363-378.

- Ndimba, B.K., Chivasa, S., Simon, W.J. ve Slabas, A.R., 2005, Identification of Arabidopsis salt and osmotic stress responsive proteins using two-dimensional difference gel electrophoresis and mass spectrometry, *Proteomics*, 5(16): p. 4185-4196.
- Negrão, S., Schmöckel, S. ve Tester, M., 2017, Evaluating physiological responses of plants to salinity stress, *Annals of Botany*, 119(1): 1-11.
- Nei, M. ve Li, W.-H., 1979, Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(10): 5269-5273.
- Ng, W. ve Tan, S., 2015, Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers: Are We Doing It Right?, *ASM Science Journal*, 9(1): 30-39.
- Nouri, M.-Z., Moumeni, A. ve Komatsu, S., 2015, Abiotic stresses: insight into gene regulation and protein expression in photosynthetic pathways of plants, *International Journal of Molecular Sciences*, 16(9): 20392-20416.
- Nxele, X., Klein, A. ve Ndimba, B., 2017, Drought and salinity stress alters ROS accumulation, water retention, and osmolyte content in sorghum plants, *South African Journal of Botany*, 108: 261-266.
- O'Farrell, P.H., 1975, High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins, *Journal of Biological Chemistry*, 250(10): 4007-4021.
- Oladosu, Y., Rafii, M.Y., Abdullah, N., Abdul Malek, M., Rahim, H.A., Hussin, G., Razi Ismail, M., Abdul Latif, M. ve Kareem, I., 2015, Genetic variability and diversity of mutant rice revealed by quantitative traits and molecular markers, *Agrociencia*, 49(3).
- Oladosu, Y., Rafii, M.Y., Abdullah, N., Hussin, G., Ramli, A., Rahim, H.A., Miah, G. ve Usman, M., 2016, Principle and application of plant mutagenesis in crop improvement: a review, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 30(1): 1-16.
- Ologundudu, A.F., Adelusi, A.A. ve Akinwale, R.O., 2014, Effect of Salt Stress on Germination and Growth Parameters of Rice (*Oryza sativa* L.), *Notulae Scientia Biologicae*, 6(2).
- Omokawa, H. ve Aonuma, S.-i, 2002, Amelioration of the salt-stressed root growth of rice and normalization of the Na⁺ distribution between the shoot and root by (S)- α -methylbenzyl-2-fluoro-4-methylphenylurea, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 66(2): 336-343.
- Ossowski, S., Schneeberger, K., Lucas-Lledó, J.I., Warthmann, N., Clark, R.M., Shaw, R.G., Weigel, D. ve Lynch, M., 2010, The rate and molecular spectrum of spontaneous mutations in *Arabidopsis thaliana*, *Science*, 327(5961): 92-94.
- Özdemir, F., Bor, M., Demiral, T. ve Türkan, I., 2004, Effects of 24-epibrassinolide on seed germination, seedling growth, lipid peroxidation, proline content and antioxidative system of rice (*Oryza sativa* L.) under salinity stress, *Plant Growth Regulation*, 42(3): 203-211.

- Palatnik, J.F., Tognetti, V.B., Poli, H.O., Rodriguez, R.E., Blanco, N., Gattuso, M., Hajirezaei, M., Sonnewald, U., Valle, E.M. ve Carrillo, N., 2003, Transgenic tobacco plants expressing antisense ferredoxin-NADP (H) reductase transcripts display increased susceptibility to photo-oxidative damage, *The Plant Journal*, 35(3): p. 332-341.
- Pandey, A., Chakraborty, S., Datta, A. ve Chakraborty, N., 2008, Proteomics approach to identify dehydration responsive nuclear proteins from chickpea (*Cicer arietinum* L.), *Molecular & cellular proteomics*, 7(1): p. 88-107.
- Pang, Q., Chen, S., Dai, S., Chen, Y., Wang, Y. ve Yan, X., 2010, Comparative proteomics of salt tolerance in *Arabidopsis thaliana* and *Thellungiella halophila*, *Journal of proteome research*, 9(5): p. 2584-2599.
- Parida, A.K. ve Das, A.B., 2005, Salt tolerance and salinity effects on plants: a review, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 60(3): 324-349.
- Parmesan, C., 2006, Ecological and evolutionary responses to recent climate change, *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.*, 37: 637-669.
- Parry, M., M. Parry, M.L., Canziani, O., Palutikof, J., Van der Linden, P. ve Hanson, C., 2007, Climate change 2007-impacts, adaptation and vulnerability: Working group II contribution to the fourth assessment report of the IPCC, *Cambridge University Press*.
- Passamani, L.Z., Barbosa, R.R., Reis, R.S., Heringer, A.S., Rangel, P.L., Santa-Catarina, C., Grativol, C., Veiga, C.F., Souza-Filho, G.A. ve Silveira, V., 2017, Salt stress induces changes in the proteomic profile of micropropagated sugarcane shoots, *PloS One*, 12(4): e0176076.
- PD, K. ve Dudhe, S., 2018, Effect of gamma radiation on various growth parameters of *Linum usitatissimum* L, *International journal of Life Sciences*, A12: 161-164.
- Peng, Z., Wang, M., Li, F., Lv, H., Li, C. ve Xia, G., 2009, A proteomic study of the response to salinity and drought stress in an introgression strain of bread wheat. *Molecular & Cellular Proteomics*, 8(12): p. 2676-2686.
- Per, T.S., Khan, N.A., Reddy, P.S., Masood, A., Hasanuzzaman, M., Khan, M.I.R. ve Anjum, N.A., 2017, Approaches in modulating proline metabolism in plants for salt and drought stress tolerance: Phytohormones, mineral nutrients and transgenics, *Plant Physiology and Biochemistry*, 115: 126-140.
- Pereira, A., 2016, Plant abiotic stress challenges from the changing environment, *Frontiers in Plant Science*, 7:1123.
- Petrov, V., Hille, J., Mueller-Roeber, B. ve Gechev, T.S., 2015, ROS-mediated abiotic stress-induced programmed cell death in plants, *Frontiers in Plant Science*, 6: 69.
- Pilahome, W., Bunnag, S. ve Suwanagul, A., 2017, Two-Step Salt Stress Acclimatization Confers Marked Salt Tolerance Improvement in Four Rice Genotypes Differing in Salt Tolerance, *Arabian Journal for Science and Engineering*, 42(6): 2191-2200.

- Popovska, M., Popovski, B. ve Gjamovski, V., 2017, Primary effects of gamma radiation (Cs137) on the morphology of leaves at some sweet cherry varieties, *International Scientific*, p. 148.
- Poustini, K., Siosemardeh, A. ve Ranjbar, M., 2007, Proline accumulation as a response to salt stress in 30 wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars differing in salt tolerance, *Genetic Resources and Crop Evolution*, 54(5): 925-934.
- Pushpalatha, G., Subrahmanyam, D., Sreenu, K., Ram, T., Subbarao, L., Parmar, B., Giri, A., Sarla, N. ve Rai, V., 2013, Effect of salt stress on seedling growth and antioxidant enzymes in two contrasting rice introgression lines, *Indian Journal of Plant Physiology*, 18(4): 360-366.
- Qados, A.M.A., 2011, Effect of salt stress on plant growth and metabolism of bean plant *Vicia faba* (L.), *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 10(1): 7-15.
- Qian, W., Ge, S. ve Hong, D.-Y., 2001, Genetic variation within and among populations of a wild rice *Oryza granulata* from China detected by RAPD and ISSR markers, *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 102(2): 440-449.
- Qian, Z., Cui, M. Xin, X., Ming, X., Jing, L. ve Jin-xia, W., 2014, Overexpression of a cytosolic ascorbate peroxidase gene, *OsAPX2*, increases salt tolerance in transgenic alfalfa, *Journal of Integrative Agriculture*, 11: 020.
- Rabbani, M.A., Maruyama, K., Abe, H., Khan, M.A., Katsura, M., Ito, Y., Yoshiwara, K., Seki, M., Shinozaki, K. ve Yamaguchi-Shinozaki, K., 2003, Monitoring expression profiles of rice genes under cold, drought, and high-salinity stresses and abscisic acid application using cDNA microarray and RNA gel-blot analyses, *Plant Physiology*, 133(4): 1755-1767.
- Rabilloud, T., 1996, Solubilization of proteins for electrophoretic analyses, *Electrophoresis*, 17(5): p. 813-829.
- Rabilloud, T., 2014, How to use 2D gel electrophoresis in plant proteomics, *Plant Proteomics: Methods and Protocols*, p. 43-50.
- Rabilloud, T. ve Lelong, C., 2011, Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: a tutorial, *Journal of Proteomics*, 74(10): 1829-1841.
- Rahman, M.H., Naim, M.A., Matin, M.A., Anee, T.I., Hossain, M.A. ve Hasanuzzaman, M., 2016, Variations of Growth Parameters in Some Aromatic Rice Varieties under Salt Stress, *Bangladesh Agronomy Journal*, 19(2): p. 1-10.
- Rahneshan, Z., Nasibi, F. ve Moghadam, A.A., 2018, Effects of salinity stress on some growth, physiological, biochemical parameters and nutrients in two pistachio (*Pistacia vera* L.) rootstocks, *Journal of Plant Interactions*, 13(1): 73-82.
- Raina, A., Laskar, R.A., Khursheed, S., Amin, R., Tantray, Y.R., Parveen, K. ve Khan, S., 2016, Role of mutation breeding in crop improvement-past, present and future, *Asian Res. J. Agr.*, 2: 1-13.

- Ramesh, M., Murugiah, V. ve Gupta, A.K., 2009, Efficient in vitro plant regeneration via leaf base segments of indica rice (*Oryza sativa* L.), *Indian Journal of Experimental Biology*, 47: 68-74.
- Ramesh, R., Ramesh, T., Rao, P., Shankar, V. ve Bhave, M., 2017, High Temperature Stress Effectuated the Biochemical Parameters of Rice (*Oryza sativa* L.) Varieties and Hybrids, *Int. J. Pure App. Biosci.*, 5(4): 1478-1490.
- Rasoulnia, A., Bihamta, M.R., Peyghambari, S.A., Alizadeh, H. ve Rahnama, A., 2011, Proteomic response of barley leaves to salinity, *Molecular biology reports*, 38(8): p. 5055-5063.
- Reddy, I.N.B.L., Kim, B.-K., Yoon, I.-S., Kim, K.-H. ve Kwon, T.-R., 2017, Salt Tolerance in Rice: Focus on Mechanisms and Approaches, *Rice Science*, 24(3): 123-144.
- Reitz, M.U., Bissue, J.K., Zocher, K., Attard, A., Hückelhoven, R., Becker, K., Imani, J., Eichmann, R. ve Schäfer, P., 2012, The subcellular localization of Tubby-like proteins and participation in stress signaling and root colonization by the mutualist *Piriformospora indica*, *Plant Physiology*, pp. 112.201319.
- Rossatto, T., do Amaral, M.N., Benitez, L.C., Vighi, I.L., Braga, E.J.B., de Magalhaes Júnior, A.M., Maia, M.A.C. ve da Silva Pinto, L., 2017, Gene expression and activity of antioxidant enzymes in rice plants, cv. BRS AG, under saline stress, *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 23(4): 865-875.
- Rostoks, N., Mudie, S., Cardle, L., Russell, J., Ramsay, L., Booth, A., Svensson, J.T., Wanamaker, S.I., Walia, H. ve Rodriguez, E.M., 2005, Genome-wide SNP discovery and linkage analysis in barley based on genes responsive to abiotic stress, *Molecular Genetics and Genomics*, 274(5): 515-527.
- Rozema, J. ve Flowers, T., 2008, Crops for a Salinized World, *Science*, 322(5907): 1478-1480.
- Saha, B., Mishra, S., Awasthi, J.P, Sahoo, L. ve Panda, S.K., 2016, Enhanced drought and salinity tolerance in transgenic mustard [*Brassica juncea* (L.) Czern & Coss.] overexpressing *Arabidopsis* group 4 late embryogenesis abundant gene (*AtLEA4-1*), *Environmental and Experimental Botany*, 128: 99-111.
- Sahu, S., Das, P., Ray, M., ve Sabat, S.C., 2010, Osmolyte modulated enhanced rice leaf catalase activity under salt-stress, *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 1(01): p. 39.
- Sairam, R. ve Srivastava, G., 2002, Changes in antioxidant activity in sub-cellular fractions of tolerant and susceptible wheat genotypes in response to long term salt stress, *Plant Science*, 162(6): 897-904.
- Sairam, R., Srivastava, G., Agarwal, S, ve Meena, R., 2005, Differences in antioxidant activity in response to salinity stress in tolerant and susceptible wheat genotypes, *Biologia Plantarum*, 49(1): 85.

- Sakamoto, A., Tsukamoto, S., Yamamoto, H., Ueda-Hashimoto, M., Takahashi, M., Suzuki, H. ve Morikawa, H., 2003, Functional complementation in yeast reveals a protective role of chloroplast 2-Cys peroxiredoxin against reactive nitrogen species, *The Plant Journal*, 33(5): 841-851.
- Saleethong, P., Roytrakul, S., Kong-Ngern, K. ve Theerakulpisut, P., 2016, Differential proteins expressed in rice leaves and grains in response to salinity and exogenous spermidine treatments, *Rice Science*, 23(1): 9-21.
- Sangha, J.S., Chen, Y.H., Kaur, J., Khan, W., Abduljaleel, Z., Alanazi, M.S., Mills, A., Adalla, C.B., Bennett, J. ve Prithiviraj, B., 2013, Proteome analysis of rice (*Oryza sativa* L.) mutants reveals differentially induced proteins during brown planthopper (*Nilaparvata lugens*) infestation, *International Journal of Molecular Sciences*, 14(2): 3921-3945.
- Savicka, M. ve Škute, N., 2010, Effects of high temperature on malondialdehyde content, superoxide production and growth changes in wheat seedlings (*Triticum aestivum* L.), *Ekologija*, 56(1): 26-33.
- Sayyad-Amin, P., Jahansooz, M.-R., Borzouei, A. ve Ajili, F., 2016, Changes in photosynthetic pigments and chlorophyll-a fluorescence attributes of sweet-forage and grain sorghum cultivars under salt stress, *Journal of Biological Physics*, 42(4): 601-620.
- Seevers, P.M., Daly, J.M. ve Catedral, F.F., 1971, The role of peroxidase isozymes in resistance to wheat stem rust disease, *Plant Physiology*, 48(3): p. 353-60.
- Sekmen, A.H., Ozgur, R., Uzilday, B. ve Turkan, I., 2014, Reactive oxygen species scavenging capacities of cotton (*Gossypium hirsutum*) cultivars under combined drought and heat induced oxidative stress, *Environmental and Experimental Botany*, 99: 141-149.
- Semagn, K., Bjørnstad, Å. ve Ndjioudjop, M., 2006, An overview of molecular marker methods for plants, *African Journal of Biotechnology*, 5(25).
- Sen, S. ve Chandrasekhar, C., 2015, Effect of PGPR on enzymatic activities of rice (*Oryza sativa* L.) under salt stress, *Asian Journal of Plant Science and Research*, 5(6): 44-48.
- Sengupta, S. ve Majumder, A.L., 2009, Insight into the salt tolerance factors of a wild halophytic rice, *Porteresia coarctata*: a physiological and proteomic approach, *Planta*, 229(4): p. 911-929.
- Shahin Kaleybar, B., Kabirnattaj, S., Nematzadeh, G.A., Kazemitabar, S.K., Bahrami, S. ve Mona, S., 2015, Fingerprinting and genetic diversity evaluation of rice cultivars using Inter Simple Sequence Repeat marker, *Journal of Plant Molecular Breeding*, 3(1): 81-91.
- Shalata, A., Mittova, V., Volokita, M., Guy, M. ve Tal, M., 2001, Response of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii* to salt-dependent oxidative stress: The root antioxidative system, *Physiologia Plantarum*, 112(4): 487-494.
- Sharma, I. ve Ahmad, P., 2014, Catalase: a versatile antioxidant in plants, in *Oxidative Damage to Plants*, *Elsevier*, p. 131-148.

- Sharma, P. ve Dubey, R.S., 2016, Protein synthesis by plants under stressful conditions, *Handbook of plant and crop stress CRC Press.*, p. 475-528.
- Sharma, S., Mustafiz, A., Singla-Pareek, S.L., Shankar Srivastava, P. ve Sopory, S.K., 2012, Characterization of stress and methylglyoxal inducible triose phosphate isomerase (OscTPI) from rice, *Plant Signaling & Behavior*, 7(10): 1337-1345.
- Shaw, M.M. ve Riederer, B.M., 2003, Sample preparation for two-dimensional gel electrophoresis, *Proteomics: International Edition*, 3(8): 1408-1417.
- Shevchenko, A., Tomas, H., Havli, J., Olsen, J.V. ve Mann, M., 2006, In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes, *Nature Protocols*, 1(6): 2856.
- Shi, H., Ishitani, M., Kim, C. ve Zhu, J., 2000, The Arabidopsis thaliana salt tolerance gene SOS1 encodes a putative Na⁺/H⁺ antiporter, *Proceedings of the national academy of sciences*, 97(12): p. 6896-6901.
- Shobhana, V., Kumar, R.N., Karthikeyan, A., Ashokkumar, K., Sheeba, A. ve Vivekanandan, P., 2018, Evaluation of new plant type (NPT) lines of rice (*Oryza sativa* L.) for callus induction and in vitro plant regeneration, *International Journal of Chemical Studies*, 6(2): 206-212.
- Shu, Q., Forster, B.P. ve Nakagawa, H., 2012, Plant mutation breeding and biotechnology, *CABI*.
- Shukla, R. ve Ojha, E.K.M., 2018, Best plant harmon combination for In vitro callus initiation, organogenesis and regeneration of rice cv. swarna sub1, *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 7(2): 1890-1894.
- Silva, F., Stevens, C.J., Weisskopf, A., Castillo, C., Qin, L, Bevan, A. ve Fuller, D.Q., 2015, Modelling the geographical origin of rice cultivation in Asia using the rice archaeological database, *PLoS One*, 10(9): e0137024.
- Sindhi, V., Jain, M., Josula, D., Bisht, P., Sharma, K., Narayansamy, N., Nvsrk, P. ve Mehla N., 2016, Differential growth and antioxidant response to salinity stress in two Indian rice cultivars, *Methodology*, 2(1): 218-226.
- Singh, A. ve Sengar, R., 2015, DNA fingerprinting based decoding of indica rice (*Oryza sativa* L) via molecular marker (SSR, ISSR, & RAPD) in aerobic condition, *Advances in Crop Science and Technology*: 3(2): 1-8.
- Singh, A.K., Ansari, M.W., Pareek, A. ve Singla-Pareek, S.L., 2008, Raising salinity tolerant rice: recent progress and future perspectives, *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 14(1-2): 137-154.
- Singh, R. ve Green, M.R., 1993, Sequence-specific binding of transfer RNA by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, *Science*, 259(5093): p. 365-368.
- Singh, S., 2009, Climate change and crops, *Springer Science & Business Media*.

- Smirnoff, N., 1993, The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation, *New Phytologist*, 125(1): 27-58.
- Sobhanian, H., Razavizadeh, R., Nanjo, Y., Ehsanpour, A.A., Jazii, F.R., Motamed, N. Ve Komatsu, S., 2010, Proteome analysis of soybean leaves, hypocotyls and roots under salt stress, *Proteome Science*, 8(1): p. 19.
- Soda, N., Wallace, S. ve Karan, R., 2015, Omics study for abiotic stress responses in plants, *Advances in Plants & Agriculture Research*, 2(00037): 10.15406.
- Stewart, R.R.C. ve Bewley, J.D., 1980, Lipid-Peroxidation Associated with Accelerated Aging of Soybean Axes, *Plant Physiology*, 65(2): p. 245-248.
- Sugimoto, M. ve Takeda, K., 2009, Proteomic analysis of specific proteins in the root of salt-tolerant barley, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 73(12): p. 2762-2765.
- Swami, A.K., Alam, S.I., Sengupta, N. Ve Sarin, R., 2011, Differential proteomic analysis of salt stress response in *Sorghum bicolor* leaves, *Environmental and Experimental Botany*, 71(2): p. 321-328.
- Swapna, T., 2003, Salt stress induced changes on enzyme activities during different developmental stages of rice (*Oryza sativa* Linn.), *Indian Journal of Biotechnology*, 2: 251-258.
- Şavşatlı, Y., Köycü, C. ve A. Gülümser, A., 2006, Fideleme ve serpmme ekim yöntemlerinin bazı çeltik çeşitlerinde verim ve verim unsurlarına etkileri, *Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi*, 21(1): 6-13.
- Şen, A. ve Alikamanoglu, S., 2012, Analysis of drought-tolerant sugar beet (*Beta vulgaris* L.) mutants induced with gamma radiation using SDS-PAGE and ISSR markers, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 738: 38-44.
- Şen, A., Ozturk, I., Yaycili, O. ve Alikamanoglu, S., 2017, Drought tolerance in irradiated wheat mutants studied by genetic and biochemical markers, *Journal of Plant Growth Regulation*, 36(3): 669-679.
- Taji, T., Seki, M., Satou, M., Sakurai, T., Kobayashi, M., Ishiyama, K., Narusaka, Y., Narusaka, M., Zhu, J. Ve Shinozaki, K., 2004, Comparative genomics in salt tolerance between *Arabidopsis* and *Arabidopsis*-related halophyte salt cress using *Arabidopsis* microarray, *Plant Physiology*, 135(3): p. 1697-1709.
- Tanou, G., Job, C., Rajjou, L., Arc, E., Belghazi, M., Diamantidis, G., Molassiotis, A. ve Job, D., 2009, Proteomics reveals the overlapping roles of hydrogen peroxide and nitric oxide in the acclimation of citrus plants to salinity, *The Plant Journal*, 60(5): p. 795-804.
- Taş, I. ve Öztürk, A., 2011, Karaman-Ayrancı Tuzlu Alkali Topraklarının Islahında Jips Kullanımı, *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Doğa Bilimleri Dergisi*, 14(1): 1-15.

- Taşlıgil, N. ve Şahin, G., 2011, Türkiye’de Çeltik (*Oryza sativa* L.) Yetiştiriciliği ve Coğrafi Dağılımı, *Adıyaman Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü Dergisi*, 2011(6).
- Teixeira, F. K., Menezes-Benavente, L., Margis, R. ve Margis-Pinheiro, M., 2004, Analysis of the molecular evolutionary history of the ascorbate peroxidase gene family: inferences from the rice genome, *Journal of Molecular Evolution*, 59(6): 761-770.
- Theerakulpisut, P., Kanawapee, N. ve Panwong, B., 2017, Seed priming alleviated salt stress effects on rice seedlings by improving Na⁺/K⁺ and maintaining membrane integrity, *International Journal of Plant Biology*, 7: 6402.
- Tondelli, A., Francia, E., Barabaschi, D., Aprile, A., Skinner, J., Stockinger, E., Stanca, A. ve Pecchioni, N., 2006, Mapping regulatory genes as candidates for cold and drought stress tolerance in barley, *Theoretical and Applied Genetics*, 112(3): 445-454.
- Trenberth, K., Jones, P., Ambenje, P., Bojariu, R., Easterling, D., Klein Tank, A., Parker, D., Rahimzadeh, F., Renwick, J. ve Rusticucci, M., 2007, Observations: surface and atmospheric climate change. Chapter 3, *Climate Change*, 235-336.
- Tripathy, S.K., Ekka, R., Lenka, D., Ranjan, R., Pal, S. ve Mohapatra, B.R., 2012, Performance of short duration rice mutants and assessment of genetic diversity using RAPD and ISSR markers, *International Journal of Agronomy and Agricultural Research*, 2: 16-24.
- Tripathy, S.K., Ranjan, R., Dash, S., Bastia, D.L.D.N, Baisakh, B., Satpathy, P.C. ve Sahu, S., 2016, Isolation of useful scented rice mutants and comparative assessment of genetic diversity, *Journal of Environmental Biology*, 37(1): 65.
- Trivedi, D.K., Yadav, S., Vaid, N. ve Tuteja, N., 2012, Genome wide analysis of Cyclophilin gene family from rice and Arabidopsis and its comparison with yeast, *Plant Signaling & Behavior*, 7(12): 1653-1666.
- Tuberosa, R. ve Salvi, S., 2006, Genomics-based approaches to improve drought tolerance of crops, *Trends in Plant Science*, 11(8): 405-412.
- United Nations, 2017, World population prospects, the 2017 revision, *Document de Travail*.
- USDA, 2017, Natural Resources Conservation Service, Son Erişim: 18.07.2017, Link: <https://plants.usda.gov/java/ClassificationServlet?source=display&classid=Poaceae>.
- Ünan, R., 2016, Çeltikte (*Oryza sativa* L.) soğuk stresinin verim ve kalite unsurlarına etkileri ile soğuk stresine toleranslı genotiplerin morfolojik ve moleküler yöntemlerle belirlenmesi, Doktora Tezi, Namık Kemal Üniversitesi.
- Vaidyanathan, H., Sivakumar, P., Chakrabarty, R. ve Thomas, G., 2003, Scavenging of reactive oxygen species in NaCl-stressed rice (*Oryza sativa* L.)—differential response in salt-tolerant and sensitive varieties, *Plant Science*, 165(6): 1411-1418.
- Verbruggen, N. ve Hermans, C., 2008, Proline accumulation in plants: a review, *Amino Acids*, 35(4): 753-759.

- Verma, A.K., Sharma, S., Kakani, R.K., Meena, R.D. ve Choudhary, S., 2017, Gamma radiation effects seed germination, plant growth and yield attributing characters of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.), *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(5): 2448-2458.
- Vianello, A., Zancani, M., Nagy, G. ve Macrì, F., 1997, Guaiacol peroxidase associated to soybean root plasma membranes oxidizes ascorbate, *Journal of Plant Physiology*, 150(5): 573-577.
- Vighi, I., Benitez, L., Amaral, M., Moraes, G., Auler, P., Rodrigues, G., Deuner, S., Maia, L. ve Braga., 2017, Functional characterization of the antioxidant enzymes in rice plants exposed to salinity stress, *Biologia Plantarum*, 61(3): 540-550.
- Vishwakarma, K., Upadhyay, N., Kumar, N., Yadav, G., Singh, J., Mishra, R.K., Kumar, V., Verma, R., Upadhyay, R. ve Pandey, M., 2017, Absciscic acid signaling and abiotic stress tolerance in plants: a review on current knowledge and future prospects, *Frontiers in Plant Science*, 8: 161.
- Wadsworth, G.J. ve Scandalios, J.G., 1990, Molecular characterization of a catalase null allele at the Cat3 locus in maize, *Genetics*, 125(4): 867-872.
- Walia, H., Wilson, C., Condamine, P., Liu, X., Ismail, A.M. ve Close, T.J., 2007, Large-scale expression profiling and physiological characterization of jasmonic acid-mediated adaptation of barley to salinity stress, *Plant, Cell & Environment*, 30(4): 410-421.
- Walther, G.-R., Post, E., Convey, P., Menzel, A., Parmesan, C., Beebee, T.J., Fromentin, J.-M., Hoegh-Guldberg, O. ve Bairlein, F., 2002, Ecological responses to recent climate change, *Nature*, 416(6879): 389.
- Wang, J., Meng, Y., Li, B., Ma, X., Lai, Y., Si, E., Yang, K., Xu, X., Shang, X. ve Wang, H., 2015, Physiological and proteomic analyses of salt stress response in the halophyte *Halogeton glomeratus*, *Plant, Cell & Environment*, 38(4): 655-669.
- Wang, M.C., Peng, Z., Li, C., Li, F., Liu, C. ve Xia, G., 2008, Proteomic analysis on a high salt tolerance introgression strain of *Triticum aestivum*/*Thinopyrum ponticum*, *Proteomics*, 8(7): p. 1470-1489.
- Wang, X., Yang, P., Gao, Q., Liu, X., Kuang, T., Shen, S. ve He, Y., 2008, Proteomic analysis of the response to high-salinity stress in *Physcomitrella patens*, *Planta*, 228(1): p. 167-177.
- Wang, Y., Ying, Y., Chen, J. ve Wang, X., 2004, Transgenic *Arabidopsis* overexpressing Mn-SOD enhanced salt-tolerance, *Plant Science*, 167(4): 671-677.
- Wani, S.H., Sanghera, G.S. ve Gosal, S.S., 2011, An efficient and reproducible method for regeneration of whole plants from mature seeds of a high yielding Indica rice (*Oryza sativa* L.) variety PAU 201, *New Biotechnology*, 28(4): 418-422.
- Weiss, W. ve Görg, A., 2008, Sample solubilization buffers for two-dimensional electrophoresis, *2D PAGE: Sample Preparation and Fractionation*, Springer: 35-42.

- Willekens, H., Chamnongpol, S., Davey, M., Schraudner, M., Langebartels, C., Van Montagu, M., Inzé, D. ve Van Camp, W., 1997, Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defence in C3 plants, *The EMBO Journal*, 16(16): 4806-4816.
- Witzel, K., Weidner, A., Surabhi, G., Börner, A. ve Mock, H., 2009, Salt stress-induced alterations in the root proteome of barley genotypes with contrasting response towards salinity, *Journal of Experimental Botany*, 60(12): p. 3545-3557.
- Wu, G., Zhou, Z., Chen, P., Tang, X., Shao, H. ve Wang, H., 2014, Comparative ecophysiological study of salt stress for wild and cultivated soybean species from the Yellow River Delta, China, *The Scientific World Journal*, 2014(13).
- Xiong, J., Sun, Y., Yang, Q., Tian, H., Zhang, H., Liu, Y. ve Chen, M., 2017, Proteomic analysis of early salt stress responsive proteins in alfalfa roots and shoots, *Proteome Science*, 15(1): 19.
- Xu, J.-N., Xing, S.-S., Zhang, Z.-R., Chen, X.-S. ve Wang, X.-Y., 2016, Genome-wide identification and expression analysis of the tubby-like protein family in the *Malus domestica* Genome, *Frontiers in Plant Science*, 7: 1693.
- Xu, Y., 2010, Molecular plant breeding, *Cabi*.
- Yamane, K., Mitsuya, S., Taniguchi, M. ve Miyake, H., 2010, Transcription profiles of genes encoding catalase and ascorbate peroxidase in the rice leaf tissues under salinity, *Plant Production Science*, 13(2): 164-168.
- Yan, S., Tang, Z., Su, W. ve Sun, W., 2005, Proteomic analysis of salt stress-responsive proteins in rice root, *Proteomics*, 5(1): p. 235-244.
- Yang, C., Hu, H., Ren, H., Kong, Y., Lin, H., Guo, J., Wang, L., He, Y., Ding, X. ve Grabsztunowicz, M., 2016, Light-induced rice1 regulates light-dependent attachment of leaf-type ferredoxin-NADP⁺ oxidoreductase to the thylakoid membrane in rice and *Arabidopsis*, *The Plant Cell*, 28(3): 712-728.
- Yang, H.-B., Kang, W.-H., Nahm, S.-H. ve Kang, B.-C., 2015, Methods for Developing Molecular Markers, *Current Technologies in Plant Molecular Breeding*, Springer, 15-50.
- Yaprak, E., Kasap, M., Akpınar, G., Kayaaltı-Yüksek, S., Sinanoğlu, A., Guzel, N. ve Kocasarac, H.D., 2018, The prominent proteins expressed in healthy gingiva: A pilot exploratory tissue proteomics study, *Odontology*, 106(1): 19-28.
- Yaycılı, O., 2009, *Patates (Solanum tuberosum L.) Doku Kültüründe Somatik Mutasyonların Gama Radyasyonu ile Teşviki*, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi.
- Yazdani, M. ve Mahdih, M., 2011, Salt Stress-Induced Programmed Cell Death in Meristematic Cells of Rice Cultivars Roots, *International Conference on Biology, Environment and Chemistry*, 24(2011).
- Yazıcı, L., Çiçek, S., Küçükataban, F., Çoban, M. ve Tuncel, N., 2016, Nazilli 663 Pamuk (*Gossypium hirsutum* L.) Çeşidinde Farklı Gama Işını Dozlarının M1 Bitkilerinde Fide

Gelişimi Üzerine Etkisi ve Uygun Gama Dozunun Belirlenmesi, *Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 25(Özel Sayı-2): 88-93.

- Yoshida, S., Forno, D.A. ve Cock, J.H., 1971, Routine procedure for growing rice plants in culture solution, *Laboratory manual for physiological studies of rice*, p61-66.
- Yousuf, P.Y., Ahmad, A., Aref, I.M., Ozturk, M., Ganie, A.H. ve Iqbal, M., 2016, Salt-stress-responsive chloroplast proteins in Brassica juncea genotypes with contrasting salt tolerance and their quantitative PCR analysis, *Protoplasma*, 253(6): 1565-1575.
- Yu, J., Chen, S., Zhao, Q., Wang, T., Yang, C., Diaz, C., Sun, G. ve Dai, S., 2011, Physiological and proteomic analysis of salinity tolerance in Puccinellia tenuiflora, *Journal of Proteome Research*, 10(9): p. 3852-3870.
- Zadoks, J.C., Chang, T.T. ve Konzak, C.F., 1974, A decimal code for the growth stages of cereals, *Weed Research*, 14(6): 415-421.
- Zang, X., Geng, X., Wang, F., Liu, Z., Zhang, L., Zhao, Y., Tian, X., Ni, Z., Yao, Y. ve Xin, M., 2017, Overexpression of wheat ferritin gene TaFER-5B enhances tolerance to heat stress and other abiotic stresses associated with the ROS scavenging, *BMC Plant Biology*, 17(1): 14.
- Zar, J.H., 1984, Biostatistical analysis 2nd edition, *Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, USA*, (1984): 176-179.
- Zeng, Y., Li, Q., Wang, H., Zhang, J., Du, J., Feng, H., Blumwald, E., Yu, L. ve Xu, G., 2017, Two NHX-type transporters from Helianthus tuberosus improve the tolerance of rice to salinity and nutrient deficiency stress, *Plant Biotechnology Journal*, 16(1):310-321.
- Zhang, L., Peng, J., Chen, T., Zhao, X., Zhang, S., Liu, S., Dong, H., Feng, L. ve Yu, S., 2014, Effect of drought stress on lipid peroxidation and proline content in cotton roots, *J Anim Plant Sci.*, 24: 1729-1736.
- Zhang, Z., Zhang, Q., Wu, J., Zheng, X., Zheng, S., Sun, X., Qiu, Q. ve Lu, T., 2013, Gene knockout study reveals that cytosolic ascorbate peroxidase 2 (OsAPX2) plays a critical role in growth and reproduction in rice under drought, salt and cold stresses, *PloS One*, 8(2): e57472.
- Zörb, C., Herbst, R., Forreiter, C. ve Schubert, S., 2009, Short-term effects of salt exposure on the maize chloroplast protein pattern, *Proteomics*, 9(17): p. 4209-4220.
- Zörb, C., Schmitt, S., ve Mühling, K.H., 2010, Proteomic changes in maize roots after short-term adjustment to saline growth conditions, *Proteomics*, 10(24): p. 4441-4449.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı ALP
 Doğum Yeri Tolbuhin/BULGARİSTAN
 Doğum Tarihi 08.07.1984
 Uyruğu ☒ T.C. ☐ Diğer:
 Telefon +905356282250
 E-Posta Adresi a.ayan@iku.edu.tr
 Web Adresi <https://mobigen.iku.edu.tr/tr/molekuler-biyoloji-ve-genetik-bolumu-akademik-kadro>



Eğitim Bilgileri

Lisans

Üniversite İstanbul Üniversitesi
 Fakülte Fen Fakültesi
 Bölümü Biyoloji
 Mezuniyet Yılı 2007

Yüksek Lisans

Üniversite İstanbul Üniversitesi
 Enstitü Adı Fen Bilimleri Enstitüsü
 Anabilim Dalı Biyoloji
 Programı Radyobiyoloji
 Mezuniyet Tarihi 2010

Doktora

Üniversite İstanbul Üniversitesi
 Enstitü Adı Fen Bilimleri Enstitüsü
 Anabilim Dalı Biyoloji Anabilim Dalı
 Programı Radyobiyoloji Programı
 Mezuniyet Tarihi Tarih girmek için tıklayın veya dokununuz.

Makale ve Bildiriler

Uluslararası Hakemli / SCI-Expanded

- Özgün Makale, Çelik, Ö., Meriç, S., Ayan, A., Atak, Ç., 2018, Epigenetic analysis of WRKY Transcription Factor Genes in Salt Stressed Rice (*Oryza sativa* L.) plants, *Environmental and Experimental Botany*.
- Özgün Makale, Çelik, Ö., Atak, Ç., Ayan, A., 2017, Enzymatic and non-enzymatic comparison of two different industrial tomato (*Solanum lycopersicum*) varieties against drought stress, *Botanical Studies*, ss. 32 – 45.

- Özet Bildiri, Ayan, A., Çelik, Ö., Atak, Ç., 2014, Antioxidative defense system differences to drought stress of tomato cultivars, *Journal of Biotechnology*, ss. 117.
- Özet Bildiri, Çelik, Ö., Meriç, S., Ayan, A., Atak, Ç., 2017, Magnetic field induced production of anti-cancer agent vincristine from Madagascar Periwinkle (*Catharanthus roseus*) plant, *Journal of Biotechnology*, ss. 106.
- Özet Bildiri, Ayan, A., Çelik, Ö., Meriç, S., Atak, Ç., 2017, Two-dimensional protein profiles of drought tolerant tomato (*Solanum lycopersicum*) mutants improved by gamma radiation, *Journal of Biotechnology*, ss. 106.
- Özet Bildiri, Meriç, S., Çelik, Ö., Ayan, A., Atak, Ç., 2017, Investigation of Tos-17 transposon mobility in salt stressed rice (*Oryza sativa* L.) plants by IRAP method, *Journal of Biotechnology*, ss. 105 – 106.
- Özet Bildiri, Ayan, A., Çelik, Ö., Meriç, S., Atak, Ç., 2017, Inducing salt tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) varieties by gamma radiation, *Journal of Biotechnology*, ss. 103 – 104.

Kitap ve Kitap Bölümleri

- Çelik, Ö., Meriç, S., Ayan, A., Atak, Ç., 2019, Biotic stress tolerant plants through small RNA technology, *Plant Small RNA: Biogenesis, Regulation and Application*, Elsevier.