



**İN VİTRO ŞARTLARDA BEŞ TRİTİKALE
GENOTİPİNİN TUZ STRESİNE YANITININ BAZI
BİYOKİMYASAL VE FİZYOLOJİK PARAMETRELER
KULLANILARAK İNCELENMESİ**

Serap KARAMAN

Yüksek Lisans Tezi

**Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Dr. Öğr. Üyesi İsmail BEZİRGANOĞLU**

2019

Her Hakkı Saklıdır



**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**İN VİTRO ŞARTLARDA BEŞ TRİTİKALE GENOTİPİNİN TUZ STRESİNE
YANITININ BAZI BİYOKİMYASAL VE FİZYOLOJİK PARAMETRELER
KULLANILARAK İNCELENMESİ**

Serap KARAMAN

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi İsmail BEZİRGANOĞLU

Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı

Erzurum

2019

Her hakkı saklıdır

T.C.
ERZURUM TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TEZ ONAY FORMU

**İN VİTRO ŞARTLARDA BEŞ TRİTİKALE GENOTİPİNİN TUZ STRESİNE
YANITININ BAZI BİYOKİMYASAL VE FİZYOLOJİK PARAMETRELER
KULLANILARAK İNCELENMESİ**

Dr. Öğr. Üyesi İsmail BEZİRGANOĞLU danışmanlığında, Serap KARAMAN tarafından hazırlanan bu çalışma 06 / 12 / 2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı'nda Yüksek lisans tezi olarak **oy birliği** ile kabul edilmiştir.

Başkan	: Prof. Dr. Özkan AKSAKAL	İmza	:
Üye	: Doç. Dr. Emre İLHAN	İmza	:
Üye	: Dr. Öğr. Üyesi İsmail BEZİRGANOĞLU	İmza	:

Yukarıdaki sonucu onaylıyorum

Doç. Dr. Arzu GÖRMEZ
Enstitü Müdürü

Bu tez çalışması tarafından nolu proje ile desteklenmiştir.

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

Erzurum Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki tüm bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

06 / 12 / 2019

Serap KARAMAN

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İN VİTRO ŞARTLARDA BEŞ TRİTİKALE GENOTİPİNİN TUZ STRESİNE YANITININ BAZI BİYOKİMYASAL VE FİZYOLOJİK PARAMETRELER KULLANILARAK İNCELENMESİ

Serap KARAMAN

Erzurum Teknik Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi İsmail BEZİRGANOĞLU

Tuzluluk, bitki gelişimini kısıtlayan önemli abiyotik streslerden biridir. Tritikale, yüksek kaliteli tohumu, verim potansiyeli ve hastalığa karşı direnci ile bilinen, son derece uygun bir üründür. Bu çalışmada, kallus ve embriyogenik kallus oluşumunda ekili olan beş tritikale genotipinin (Ümran Hanım, Mikham 2002, Melez 2001, Tatlıcak ve Alper Bey) farklı konsantrasyonlardaki tuz stresine verdiği yanıtlar test edilmiştir. Kotiledon eksplantları, kallus indüksiyonu ve embriyogenik kallus oluşumu için eksplantlar olarak seçilmiştir. Test edilen beş tritikale genotipi, kallus büyümelerine ve embriyogenik kallus oluşumlarına göre değişmiştir. Daha iyi kallus indüksiyonu için Ümran Hanım, Tatlıcak ve Alper Bey gözlenirken; benzer şekilde, aynı genotipler, in vitro şartlarda tuzda daha iyi embriyogenik kallus oluşumuyla cevap vermiştir. Tuz stresi altında bu genotiplerin embriyogenik kallus büyümesinde önemli bir azalma gözlenmiştir. Embriyogenik kallusun NaCl' ye verdiği cevaplara göre, beş tritikale genotipi, Tatlıcak > Ümran Hanım > Alper Bey > Mikham 2002 > Melez 2001 olacak şekilde sıralanmıştır. Bu beş tritikale genotiplerinin hepsi tuz stresine maruz bırakıldıklarında kontrol bitkilerinden daha fazla prolin ve şeker biriktirmişlerdir. Prolin seviyesi 200 mM' da zirve yapmış, en düşük ve en yüksek içerik 0-200 mM tuz konsantrasyonlarında elde edilmiştir. Çözünabilir şekerlerin birikimi, kontrol gruplarına kıyasla yaklaşık iki kat artmıştır. Tuza duyarlı genotiplerde lipid peroksidasyonu tuza dayanıklı olanlara göre daha fazla olduğu gözlenirken, H₂O₂ miktarı tuza dayanıklı genotiplerde artarken, tuza duyarlı genotiplerde ise azaldığı gözlenmiştir. Antioksidan enzim aktiviteleri, artan NaCl konsantrasyonuna cevap olarak artan bir eğilim sergilemiştir.

2019, 53 sayfa

Anahtar Kelime: Embriyogenik Kallus, Lipid Peroksidasyon, H₂O₂, Tuz Stresi, Tritikale, Şeker, Prolin, Enzim Aktivitesi

ABSTRACT

MASTER THESIS

INVESTIGATION OF SALT STRESS RESPONSE OF FIVE TRITICALE GENOTYPES IN IN VITRO CULTURE USING SOME BIOCHEMICAL AND PHYSIOLOGICAL PARAMETERS

Serap KARAMAN

Erzurum Technical University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Ismail BEZIRGANOGLU

Salt stress is one of important matters negatively affects of agricultural productivity in worldwide. Triticale has hybrid genome, its source of high grain, good quality and resistant to pathogen. Resistance of triticale growing cultivars (Alper Bey, Mikham 2002, Tatlıcak, Melez 2002 and Ümran Hanım) of triticale to salinity were carried out in green calli induction in this research. Mature embryo was choosed as explants for calli formation and green calli induction. Tested cultivated differed in their calli formation and green calli induction. Tatlıcak, Ümran Hanım and Alper Bey were obtained for more quality calli formation; likewise, the same cultivars observed at the more green calli induction in the NaCl stress. Seriously reduce in green calli induction was determined in in vitro media. In terms of the resistance to NaCl based on green calli, tested cultivars were observed to Tatlıcak > Ümran Hanım > Alper Bey > Mikham 2002 > Melez 2001. A significant sugar and proline were reached in tested cultivars than in non-tested cultivars when all were carry out NaCl stress. Proline amount reached at 200 mM whereas the highest and lowest amount was observed at 200-0 mM in vitro NaCl media. The amount of soluble sugars was highly related to 0-200 mM NaCl levels. While lipid peroxidation was observed to be higher in salt-sensitive genotypes than salt-resistant ones, H₂O₂ amount increased in salt-resistant genotypes and decreased in salt-sensitive genotypes. Antioxidant enzyme activities demonstrated an increasing trend against of the high levels of salt.

2019, 53 pages

Key words: Embryogenic Calli, Lipid Peroxidation, H₂O₂, NaCl Stress, Triticale, Sugar, Proline, Enzyme Activity

TEŞEKKÜR

Lisans ve Lisansüstü eğitimim süresince bilgi, yardım ve desteğini esirgemeyerek beni yönlendiren danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi İsmail BEZİRGANOĞLU' na teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarım boyunca yardım ve desteklerini esirgemeyen çalışma arkadaşlarım Fatma BÖKE, Beyza REİSOĞLU, Abdul Saltuk Buğra DAŞ, Merve ŞİMŞEK ve Büşra YAZICILAR' a teşekkür ederim.

Hayatımın her döneminde olduğu gibi bu zorlu süreçte de yanımda olan, maddi manevi hiçbir desteğini esirgemeyen aileme yürekten teşekkür ederim.

Serap KARAMAN

Aralık 2019

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	11
3. MATERYAL VE YÖNTEM	16
3.1 Materyal.....	16
3.1.1 Yararlanılan cihazlar.....	16
3.1.2 Kullanılan çözeltiler ve hazırlanışları.....	16
3.1.3 Bitki materyali.....	18
3.2 Yöntem.....	18
3.2.1 Embriyogenik kallus oluşumu.....	18
3.2.2 Doku kültürü ortamı.....	19
3.2.3 Tuz stresi muamelesi.....	19
3.2.4 Prolin miktarının değerlendirilmesi.....	20
3.2.5 Çözünabilir şeker tayini.....	20
3.2.6 Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂) miktarının belirlenmesi.....	21
3.2.7 Lipid peroksidasyonu (LPO).....	21
3.2.8 Antioksidan enzim aktivitesi.....	21
3.2.8.1 Katalaz aktivitesinin belirlenmesi.....	22
3.2.8.2 Süperoksit dismutaz aktivitesinin belirlenmesi.....	22
3.2.8.3 Askorbat peroksidaz aktivitesinin belirlenmesi.....	22
3.2.8.4 Peroksidaz aktivitesinin belirlenmesi.....	22
3.2.9 İstatistiksel analiz.....	23
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	24
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	37
KAYNAKLAR	39
ÖZGEÇMİŞ	53

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

Açıklama

%	Yüzde
μM	Mikromolar
mL	Mililitre
mM	Milimolar
nm	Nanometre
nmol	Nanomol
mg	Miligram
M	Molar
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat derece

Kısaltmalar

2,4-D	2,4-diklorofenoksiasetik asit
APX	Askorbat Peroksidaz
CAT	Katalaz
DHAR	Dehidroaskorbat Redüktaz
DNA	Deoksiribonükleik asit
EDTA	Etilendiamine tetra asetik asit
GR	Glutasyon Redüktaz
H_2O_2	Hidrojen Peroksit
H_2SO_4	Sülfirik asit
HCl	Hidrojen Klorür
KH_2PO_4	Mono Potasyum Fosfat
LPO	Lipid Peroksidasyon
MDA	Malondialdehit
MES	2-Morfolinoetansülfonik Asit Monohidrat
MS	Murashige ve Skoog besin ortamı
Na_2CO_3	Sodyum Karbonat
NaCl	Sodyum Klorür
NaH_2PO_4	Monosodyum Fosfat

NaOH	Sodyum Hidroksit
NBT	Nitro Blue Tetrazolium
POX	Peroksidaz
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
RT-PCR	Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu
rpm	Devir/dakika
SOD	Süperoksit Dismutaz
TBA	Tiobarbitürik asit
TCA	Trikloroasetik asit
x g	Yerçekimi ivmesinin katı



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 Prolinin çoklu fonksiyonu	4
Şekil 4.1 A-Beş tritikale genotipi için NaCl içermeyen 4 mg L ⁻¹ 2,4-D takviye edilmiş MS ortamında kallus oluşumu. B-Beş tritikale genotipi için seçim kültüründen 2 hafta sonra elde edilen tuza dirençli embriyogenik kalluslar	24
Şekil 4.2 İn vitro şartlarda tuz stresi ile muamele edilen beş tritikale genotipindeki prolin değişimleri	28
Şekil 4.3 İn vitro şartlarda tuz stresiyle muamele edilen beş tritikale genotipinde çö-zünür şekerin değişimleri	29
Şekil 4.4 İn vitro şartlarda farklı konsantrasyonlarda tuz stresi ile muamele edilen beş tritikale genotipindeki lipid peroksidasyon içeriği	30
Şekil 4.5 İn vitro şartlarda farklı konsantrasyonlarda tuz stresi ile muamele edilen beş tritikale genotipindeki H ₂ O ₂ miktarı	31
Şekil 4.6 İn vitro şartlarda tuz stresi ile muamele edilen beş tritikale genotipinin 0., 7., 14., ve 21. günlerdeki SOD aktivitesinde meydana gelen değişiklikler	33
Şekil 4.7 İn vitro şartlarda tuz stresi ile muamele edilen beş tritikale genotipinin 0., 7., 14., ve 21. günlerdeki CAT aktivitesinde meydana gelen değişiklikler	34
Şekil 4.8 İn vitro şartlarda tuz stresi ile muamele edilen beş tritikale genotipinin 0., 7., 14., ve 21. günlerdeki APX aktivitesinde meydana gelen değişiklikler	35
Şekil 4.9 İn vitro şartlarda tuz stresi ile muamele edilen beş tritikale genotipinin 0., 7., 14., ve 21. günlerdeki POX aktivitesinde meydana gelen değişiklikler	36

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1 Abiyotik ve biyotik stres faktörleri	1
Çizelge 1.2 Bitkilerde enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar	7
Çizelge 3.1 Tez çalışmasında kullanılan cihazlar ve modelleri	16
Çizelge 4.1 İn vitro şartlarda NaCl stresinden etkilenen beş tritikale genotipinde kalluslar, embriyogenik kalluslar ve nekroz ağırlığının taze ağırlık artışı için varyans analizi (ANOVA)	24
Çizelge 4.2 Beş tritikale genotipinin ve NaCl konsantrasyonunun, beş tritikale genotipinde embriyogenik kallus oluşturan eksplantların yüzdesi üzerindeki etkisi	25

1. GİRİŞ

1. GİRİŞ

Bitkiler olumsuz çevre şartlarıyla (besin maddesi yoksunluğu, su yetersizliği, düşük veya yüksek sıcaklık, UV, tuzluluk, hastalık ve zararlılar) karşılaştıklarında gelişmeleri olumsuz yönde etkilenir. Bir çevrede meydana gelen çok sayıda olumsuz koşullar, stres olarak tanımlanır. Stres uzun süre devam edebilir veya gelip geçicidir. Stres, önemli metabolik ve fizyolojik değişimlere yol açarak bitkilerde büyüme ve gelişmeyi olumsuz yönde etkilerken, ürün kalitesinin ve miktarının azalmasına, bitkinin veya bitki organlarının ölümüne neden olabilmektedir. Bitkilerin maruz kaldığı stres faktörleri abiyotik ve biyotik olmak üzere iki sınıfa ayrılabilir (Demirbaş 2011) (Çizelge 1.1).

Çizelge 1.1 Abiyotik ve biyotik stres faktörleri.

Abiyotik Stres Faktörleri	Biyotik Stres Faktörleri
Kuraklık	Böcekler
Tuzluluk	Mantarlar
Radyasyon	Virüsler
Aşırı Sulama	Herbivorlar
Soğuk (üşüme ve donma)	Nematodlar
Yüksek Sıcaklık	Bakteriler
Oksidatif Stres	Kemirgenler
Topraktaki Besin Miktarı	Protozoa
Kimyasallar	Mikoplazma

Tuzluluk, çeşitli ürünlerde yüksek verim kayıplarına neden olan abiyotik bir strestir (Ashraf et al. 2004, 2009; Semiz and Suarez 2015; Nawaz et al. 2016). Tuzluluk, yüksek sıcaklık ve kuraklık gibi abiyotik stresler, dünyanın birçok yerinde bitkilerin büyümesini ve verimini azaltan ana faktörlerdir (Pareek et al. 2010; Mantri et al. 2012).Bitkilerin tuz stresine tabi tutulması, bitkilerde ciddi zararlara neden olabilir (Zhao et al. 2009; Farooq et al., 2015; Nuriyeva et al. 2016).

1. GİRİŞ

Yeryüzünde verimli toprakları etkisi altına alan tuz stresi, bitkilerin moleküler, fizyolojik ve biyokimyasal mekanizmalarında değişimlere yol açarak bitkileri etkilemektedir. Tuzluluk, sebeplerine göre iki grupta kategorize edilmiştir:

Primer (doğal) tuzluluk için:

- 1- Kayaların ayrışması,
- 2- Sığ tuzlu yer altı suyundan kılcalların yükselmesi,
- 3- Kıyı boyunca deniz suyunun girmesi,
- 4- Deniz rüzgarlarıyla gelen tuzlu kum,
- 5- Engelli drenaj.

Sekonder tuzluluk, aşağıdaki gibi insan faaliyetlerinden kaynaklanmaktadır:

- 1- Uygun drenaj sistemi olmadan sulamanın başlatılması,
- 2- Endüstriyel atıklar,
- 3- Gübrelerin aşırı kullanımı,
- 4- Doğal bitki örtüsünün ortadan kaldırılması,
- 5- Tuz bakımından zengin sularla su baskını,
- 6- Yüksek su tablası ve sulama için düşük kaliteli yer altı suyu kullanımı.

İnsan nüfusunun artması ile birlikte gelişen dünya üzerinde gıdaların üretimini kısıtlayan tuzluluk dikkate alınması gereken faktörlerden biridir (Flowers 2004). Toprağı etkileyen tuzluluk seviyesinde artış olmuştur. Bir zamanlar verimli olan alanlar, tuzdan etkilenen atık alanlar haline gelmiştir. Tuza bağlı problemler en az 75 ülkenin sınırları içerisinde görülmektedir (Szabolcs 1994).

Ciddi tuzluluk problemi olan ülkeler ABD, Avustralya, Çin, Hindistan, Irak, Meksika, Mısır, Pakistan, Rusya, Suriye ve Türkiye olarak sıralanabilir (Rhoades 1998). Ülkemizde yaklaşık olarak 1,5 milyon hektarlık alan tuzluluk sorunuyla karşı karşıyadır ve bu alanında %32,5' ini sulanabilir alanlar oluşturmaktadır. Tüm dünyada ise 800 milyon hektardan fazla alan tuzluluk probleminden etkilenmektedir (Yılmaz vd. 2011). Önümüzdeki 20 yıl içerisinde dünya genelinde bu oranın %50 civarında artacağı tahmin edilmektedir (Hasanuzzaman et al. 2013).

1. GİRİŞ

Tuzluluk strese neden olarak bitki büyümesi ve gelişmesini engellenmektedir. Tuz stresine neden olan etmenler: 1- Toprak çözeltisinin düşük ozmotik potansiyeli (su stresi), 2- Beslenme dengesizliği, 3- Spesifik iyon etkisi (tuz stresi), veya 4- Bu faktörlerin kombinasyonu şeklindedir (Ashraf 1994). Bir bitkide tuz stresinin başlangıcı ve devamında, büyüme, fotosentez, protein sentezi ve enerji ve lipid metabolizmaları gibi tüm süreçler etkilenir (Parida and Das 2005).

Tuzluluk stresi, bitkilerin belirgin bir şekilde hareket etmesine neden olur (Hernandez et al. 1995; Cherian et al. 1999; Takemura et al. 2000). Tuz stresi, yaprakların, gövdelerin ve köklerin taze ve kuru ağırlıklarında önemli bir azalmaya neden olur (Hernandez et al. 1995; AliDinar et al. 1999; Chartzoulakis and Klapaki 2000).

Bitkilerin su ve ozmotik potansiyeli, tuzluluk arttıkça azalırken, turgor basıncı ise tuzluluk arttıkça artar (Morales et al. 1998; Hernandez et al. 1999; Khan et al. 1999; Meloni et al. 2001; Khan 2001; Romeroaranda et al. 2001).

Yaprakların klorofil ve toplam karotenoid içerikleri genel olarak tuz stresi altında azalır (Gadallah 1999; Agastian et al. 2000). Bununla birlikte, Wang and Nil (2000), *Amaranthus*' ta tuz stresi altında klorofil içeriğinin arttığını saptamışlardır.

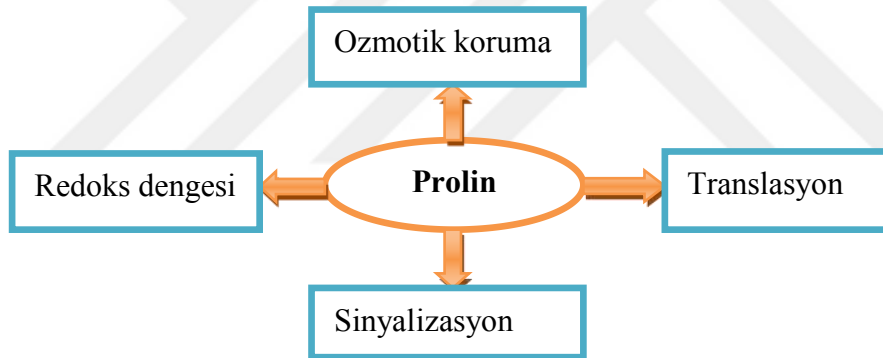
Yaprakların çözünür protein içerikleri, tuzluluğa tepki olarak azalır (Alamgir and Ali 1999; Wang and Nil 2000; Muthukumarasamy et al. 2000; Parida et al. 2002). Agastian et al. (2000), dutta çözünebilir proteinin düşük tuz konsantrasyonunda arttığını ve yüksek tuz konsantrasyonunda azaldığını bildirmiştir.

Prolin, ozmotik düzenleyici olarak görev yaptığı gösterilmiş ve çeşitli bitki türlerinde bildirilmiş, tuzluluk stresine cevap olarak biriken en yaygın metabolittir (Koca et al. 2007). Yüksek yapılı bitkilerin genelinde bulunan prolin, tuz stresi altında diğer aminoasitlere göre daha fazla birikir (Ábrahám et al. 2003). Normal şartlarda sitozolde biriken prolin, sitoplazmanın osmotik düzenlemelerine büyük ölçüde katkıda bulunur (Ketchum et al. 1991). Prolin, başta kuraklık ve tuzluluk stresi olmak üzere

1. GİRİŞ

hiperozmotik strese maruz kalan bitkilerin ozmoregülasyonunda kilit bir rol oynar (Ahmad and John 2005; Ahmad et al. 2006, 2010a, 2012a; Ahmad and Sharma 2010). Prolin birikiminin bitkilerin ozmotik düzenlemesindeki rolü hala belirsizdir (Koskeroglu ve Tuna 2010).

Prolin birikimi abiyotik strese uyum sağlama aracıdır ve ilk kez çavdar çimlerinde Kemble ve Mac Pherson (1954) tarafından gözlemlenmiştir. Prolin birikmesi stres toleranslarını farklı şekillerde etkiler (Şekil 1.1). Prolin, protein bütünlüğünü koruyan bir moleküler şaperon görevi görür ve böylece birçok enzimin aktivitesini artırır. Bitkilerin yanı sıra bakterilerde, protozoalarda, deniz bitkilerinde ve alglerde prolin birikiminin en yaygın dağılmış ozmolit olduğu belirlenmiştir (Mc Cue and Hanson 1990). Araştırmalar, prolin artışının bitkilerde biyosentetik yolağın uyarılmasından kaynaklandığını göstermektedir.



Şekil 1.1 Prolinin çoklu fonksiyonu

Stres koşullarında üretilen ve biriktirilen diğer ozmolit grubunu karbonhidratlar oluşturur. Bitkilerde çözünür karbonhidratların birikiminin, toplam CO₂ asimilasyon oranındaki önemli bir düşüşe rağmen, tuzluluk veya kuraklığa bir cevap olarak yoğun bir şekilde biriktiği bildirilmiştir (Murakeozy et al. 2003). Şeker grupları ve nişasta gibi karbonhidratlar, tuz stresine maruz kaldıklarında birikerek osmotik düzenleme ve karbon depolamada önemli bir rol oynamaktadır (Parida et al. 2002). Karbonhidratlardan glikoz, sukroz ve fruktoz osmotik düzenlemelerde görev alırken; früktoz aynı zamanda osmotik korumada da görev alır (Parida ve Das 2005). Çözünür

1. GİRİŞ

şekerler, osmotik korumada rol oynayarak tuzluluk stresine karşı yüksek bitkilerde yaygın olarak biriktiği bilinmektedir (Khedr 2003).

Toprakta veya doku kültüründe bulunan yüksek miktarda tuz, mineral besin alımında sınırlama, beslenme dengesizliği, mineral eksikliği, ozmotik stres, iyon toksisitesi ve oksidatif stres gibi sorunlara neden olan çok sayıda genetik ve biyokimyasal değişikliğe yol açabilir (Rozema and Flower 2008; Rahnama et al. 2010; James et al. 2011). Oksidatif ve ozmotik streslerin, birçok bitki türünün çalışmasını engelleyen hücresel membran bütünlüğünü, enzim aktivitesini, DNA ve klorofil içeriğini etkilediğini bildirilmişlerdir (Lokhande et al. 2010).

Abiyotik stres şartlarında bitkinin yaşamsal faaliyetleri yavaşlayarak, su alımı azalır. Bu da bitkinin CO₂ alımını azaltarak, fotosentetik elektronları O₂ molekülüne aktarır ve süperoksit radikallerini (O₂^{•-}) oluşturur. Fazla miktarda biriken süperoksit radikali, hidroksil radikali (OH^{*}) ve hidrojen peroksit (H₂O₂) ile birlikte singlet oksijeni (¹O₂) de içine alan reaktif oksijen türlerini (ROS) üreterek oksidatif strese ve bunun sonucunda da oksidatif hasara sebep olmaktadır (Mittler et al. 2002, 2004).

ROS' un bir türü olan H₂O₂' in hücre bölünmesini arttırdığı ve sekonder hücre duvarının oluşumunu tetiklediği, bu sayede taze ağırlığı arttırdığı düşünülmektedir (Potikha et al. 1999). Bitki dokularındaki H₂O₂ konsantrasyonundaki artış membran lipidlerinde hasara neden olarak büyümelerine etki edebilir (Johnson et al. 2003).

ROS bitki hücrelerinde membranların yapısındaki lipidleri oksitleyerek membran yapılarını bozmaktadır. Bunun sonucu olarak membran seçici geçirgenlik özelliğini ya kaybetmekte ya da azaltmaktadır. Hücrelerin membranlarında bulunan lipidlerin oksitlenmesi reaksiyonlarında ara ürün olarak MDA çıkmaktadır, bu durum tuz stresi çalışmalarında stresin ne ölçüde zarar verdiğini belirlemede önemlidir (Gossett et al. 1994). Tuzluluk gibi abiyotik stresler sonucu oluşan membran hasarları, çoğunlukla membran lipid peroksidasyonundan kaynaklanmaktadır. Tuz stresi, lipid peroksidasyonunu uyarak bitkide MDA miktarını arttırmaktadır (Mishra and Choudhuri 1999).

1. GİRİŞ

Yüksek konsantrasyonda tuz bulunduran ortamlarda bitkilerin büyüme ve hayat döngülerini tamamlayabilme kabiliyetlerine tuz toleransı denir (Parida and Das 2005). Tuzluluk stresine tolerans genellikle oksidatif stres ile ilişkilendirilmiştir. Oksidatif stres altındaki bitkilerde, bitki hücrelerinin farklı lokalizasyonlarında (mitokondri, kloroplast, peroksizom ve nükleus) ROS oluşumu hasara ve hücre ölümüne sebep olmaktadır (Mano 2002). Diğer taraftan, ROS antioksidan direnç mekanizmalarının aktivasyonunda ve hücre içi redoks sinyalinde önemli bir rol oynamaktadır. ROS, membran lipidleri, proteinler ve nükleik asitler de dahil olmak üzere farklı hücresel bileşenlerde oksidatif hasara neden olur (Valko et al. 2006). Hücresel bileşenlerin ROS tarafından zarar görmesini önlemek için, bitkiler karmaşık bir antioksidan sistemi geliştirmişlerdir. Bu antioksidan savunma sisteminin bileşenleri, çeşitli alt hücre bölümlerinde bulunabilir (Hernandez et al. 2000; Ahmad and Umar 2011). ROS' un antioksidan enzimlerin doğal aktivasyonu ile atılması tuz toleransını artırabilir (Alscher et al. 2002). Tuz toleransı ve antioksidan enzimlerin aktivasyon artışı arasındaki ilişki, *Plantago* (Sekmen vd, 2007), *Pisum sativum* L. (bezelye) (Hernandez et al. 2000; Ahmad et al. 2008a, b), *Arabidopsis*, *Oryza sativa* L. (çeltik) (Dionisio-Sese and Tobita 2007), *Lycopersicon esculentum* (domates), *Glycine max* L. (soya fasulyesi), *Zea mays* L. (mısır) (Azevedo Neto et al. 2006) ve *Vicia faba* (bakla) (Azooz et al. 2011) bitkilerinde gösterilmiştir.

Bitkiler oksidatif stres altında yaşamlarını devam ettirebilmek, tuzluluğun olumsuz etkilerini azaltabilmek ve ROS' un toksik etkilerini önlemek için çeşitli enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlara sahiptirler (Noctor and Foyer 1998; Shi and Zhu 2008) (Çizelge 1.2).

1. GİRİŞ

Çizelge 1.2 Bitkilerde enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar.

ANTİOKSİDANLAR	
Enzimatik Olmayan Antioksidanlar	Enzimatik Antioksidanlar
Askorbik Asit (Vitamin C)	Süperoksit Dismutaz (SOD)
Tokoferoller (Vitamin E)	Askorbat Peroksidaz (APX)
Karotenoidler (Vitamin A)	Katalaz (CAT)
Glutasyon	Peroksidaz (POX)
Fenolik Bileşikler	Glutasyon Redüktaz (GR)

Tuz stresi genellikle bitki büyümesini engeller. Bitkiler farklı abiyotik streslere maruz kaldıklarında, süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), peroksidaz (POX) ve askorbat peroksidaz (APX) gibi enzimleri uzaklaştırarak bazı reaktif oksijen türleri (ROS) üretir (Li and Staden 1998). Tuz stresi altında, SOD, CAT, GR, DHAR, APX ve POX aktivitesindeki artışın yanı sıra tuza toleranslı çeşitlerdeki yüksek antioksidan aktivitesi de çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Ahmad et al. 2010a, 2012a; Azooz et al. 2011; Koyro et al. 2012).

Süperoksit dismutaz, ROS' a karşı O_2^- nin temel temizleyicisi olan bir savunma ajanıdır (Almoguera et al. 1995). Yüksek SOD aktivitesi, bitkiyi süperoksit radikale karşı korur ama yalnızca peroksidasyona karşı membran korumasından sorumlu olarak kabul edilemez, çünkü aynı zamanda bir ROS olan O_2^- yi H_2O_2 ' ye dönüştürme rolü de vardır.

Katalaz (CAT), peroksizomlarda H_2O_2 ' nin ana temizleyicilerindendir, hidrojen peroksiti suya ve moleküler oksijene dönüştürür (Willekens et al. 1995). CAT aktivitesinin, soya fasulyesi (Comba et al.1998), tütün (Bueno et al. 1998), salatalık (Lechno et al. 1997), dut (Sudhakar et al. 2001; Ahmad et al. 2010a) ve hardalda (Ahmad et al. 2012a) tuz stresi altında arttığı bulunmuştur. Azevedo Neto et al. (2006), tuz toleransına farklılık gösteren iki mısır çeşidinde daha yüksek CAT aktivitesi bulmuşlardır.

1. GİRİŞ

Askorbat peroksidaz (APX), yüksek bitkilerde, alglerde ve bazı siyanobakterilerde bulunan hidrojen peroksit temizleyici bir enzimdir (Asada 1992). Askorbat peroksidaz (APX), sitosolik APX' in fotosentetik olmayan dokularda, H_2O_2 ' ye bağlı sitozolik enzimlerin inhibe edilmesini önlemede temel bir rol oynayarak çeşitli izoformlara sahip multijenik bir ailedir (Verniquet et al. 1991). Tuz toleransı mekanizmalarında APX, protein seviyesinde kanıtlanmıştır (Elkahouia et al. 2005; Masood et al. 2006; Koca et al. 2007). APX aktivitesi, tuza duyarlı ve tuza toleranslı çeşitlerde antioksidan enzimlerin aktivitelerinin karşılaştırılmasında tuz stresine cevap vermede kilit rol oynamıştır (Gueta-Dahan et al. 1997; Ahmad et al. 2008a, 2010a, 2012a; Ahmad and Umar 2011).

Peroksidaz (POX), stres altındaki bitkilerde stresle başa çıkabilmek için ROS kontrolü ve detoksifikasyonunda rol oynayan önemli antioksidan enzimlerden biridir (Büyük ve ark. 2012). POX, indirgeyici olarak çeşitli substratları kullanarak H_2O_2 ' i temizler ve hücre duvarı polimerleri ile etkileşim içindedirler (Gechev et al. 2006).

Antioksidan enzim aktivitesi, bitkilerde tuz toleransı ile pozitif ilişkilidir (Lokhande et al. 2011). Birçok araştırmacı, tuz direnci mekanizmasının tüm bitki aşaması boyunca aktif olduğunu ve bunun hem in vitro hem de ex vitro durumlarda test edildiğini belirtmiştir. (Watanabe et al. 2000; Troncoso et al. 2002). Farklı genotiplerde fizyolojik değişiklikler ile kallus kültürleri arasında tuz stresi ile yakın bir ilişki olduğu daha önce bildirilmiştir (Piwowarczyk et al. 2016). Fizyolojik değişimlerin, tuza duyarlı ve tuza dirençli çeşitler veya genotipler arasındaki farklılığa etkisi rutin olarak test edilmektedir (Djukic et al. 2013). Seleksiyon aracı olarak farklı NaCl konsantrasyonları kullanarak tuz direnci için in vitro şartlarda, şeker kamışı, patates, tatlı patates ve pancar dahil olmak üzere birçok bitki türüne uygulanmıştır (Prakash and Jack 1993; Yang et al. 2005; Gandonou et al. 2006; He et al. 2009).

Tritikale (x *Triticosecale* Wittmack), yüksek verim potansiyeli bulunan buğday ile olumsuz koşullara (abiyotik ve biyotik stres koşulları) dayanıklı olan çavdarın melezlenmesiyle üretilmiş yapay bir tahıldır. Tritikaleleri melezlemek için kullanılan ebeveynlerinin kromozom sayılarına göre, tetraploid, hekzaploid veya oktoploid olabilir. Tetraploid tritikaleler ($2n = 28$) DDRR (Bernard 1987), ABRR veya A, B, D ve

1. GİRİŞ

R genomlarının kombinasyonu şeklinde olabilir (Baum and Lelley 1988). Günümüzde en fazla kullanılan tritikaleler hekzaploid ($2n = 42$) formda bulunanlardır. Hekzaploid tritikalelerin klasik genomu AABBRR' dir (O'Mara 1953). Oktoploid kromozomlu tritikaleler ($2n = 56$) ekmeklik buğday ve çavdar melezlenerek elde edilmiştir ve genomu AABBDDRR' dir (Müntzing 1939).

Tritikale, klasik ıslah ile geliştirilmiş ve günümüzde dünyada yaklaşık 3×10^6 hektarlık alanda yetiştirilen yapay amfidiploid bir tahıldır (Lelley et al. 1989; Machzynska et al. 2014; <http://www.fao.org/faostat/tr/>). Tritikale tuzluluk, soğuk, asidik topraklar, kuraklık gibi abiyotik stres koşullarına adapte sağlamış ve bu alanlarda diğer serin iklim tahıllarından daha yüksek verim verebilme yeteneğine sahip bir bitkidir (Briggle 1969; Yağmur ve Kaydan 2008).

Tritikaleye ilişkin yoğun çalışmalar 1950' lerin başlarında (Kiss 1966) başlamış, ardından somatik doku kültürü (Immonen 1996), moleküler genetik (Balatero et al. 1995) ve transgenik çalışmalar üzerine yapılan araştırmalarla devam etmiştir (Zimny et al. 1995). Türkiye' de tritikale üzerine yapılan çalışmalar ilk olarak 1970' li yıllarda başlamıştır. Ege Bölgesi ve Diyarbakır yöresinde yapılan çalışmalarda, tritikale hatlarının ekmeklik ve makarnalık buğdaylara göre sırasıyla (%5-44) ve (%5-71) daha fazla verim verdiği gözlenmiştir (Duğan 2010).

Tritikale, çavdardan gelen özellik ile kurak tarım alanlarına iyi uyum gösterir ve diğer tahıllarla karşılaştırıldığında birim alandan daha yüksek tane verimi verebilir. Tritikale, çavdardan olumsuz yetiştirme koşullarına dayanıklılık özelliklerine sahip olduğundan;

- Tuz yoğunluğu yüksek tarım alanlarında,
- Toksik madde miktarı yüksek olan arazilerde,
- Molibden ve çinko gibi mikro besin maddesi eksikliği görülen tarlalarda,
- Bazı bitki hastalıklarının görüldüğü tarım alanlarında buğday ve arpada daha iyi sonuç vermektedir.

Stres koşullarına dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesi için geleneksel ıslah yöntemleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte, bu geleneksel ıslah

1. GİRİŞ

programları, genetik kaynakların eksikliği gibi bazı sınırlamalara sahiptir (Rai et al. 2011).

Bitkileri çevresel strese karşı korumak için farklı teknikler önerilmiştir. Bu nedenle, tuza dayanıklı genotipler üretmek için yeni teknikler geliştirilmelidir. Bu amaç için arzu edilen genotiplerin seçimi ve geliştirilmesi, uygun tarama yöntemleri gerektirir. Doku kültürü, çevresel stres faktörlerine karşı yeni çeşitler üretme girişimlerinde yardımcı olabilir. Bunlara ek olarak, in vitro kültür çalışmaları klasik üreme yöntemlerine kıyasla nispeten daha hızlı tepkilere, daha kısa üretim sürelerine ve düzenli çevresel koşullara izin verir (Zhao et al. 2009; Elmaghrabi et al. 2013).

Farklı bitki türlerinin tuz stres toleransını ölçmek için in vitro yöntemlerin kullanılması hızla artmaktadır ve bu yöntemler tütün (Nabors et al. 1980), çeltik (Lutts et al. 1999) ve buğday (Barakat and Abdel-Latif 1996) gibi bazı bitkilerde başarı kazanmıştır. Sürdürülebilir bir yöntemle tuzluluk stresine direnç için tritikale ıslahının yoğunlaştırılması, strese dayanıklı çeşitlerin üretilmesine yardımcı olacaktır. Şimdiye kadar tritikale, yoğun ıslah yöntemlerinde veya tuzluluk stresi direnci için doku kültürü tekniklerinde uygulanmamıştır. İn vitro çoğalma stratejileri, günümüzde strese dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesinde en etkili yoldur. Bu strateji, kısıtlı yer ve zamanla stres koşullarında başarılı olabilir (Elmagrahi et al. 2013) ve düşük maliyetli bir laboratuvar kullanılarak strese dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesi potansiyeline sahiptir.

Tritikale diğer tahıl ürünlerinden çeşitli abiyotik streslere karşı direnci ile öne çıkmasına rağmen, bu türde fizyolojik ve biyokimyasal seviyelerde bu streslere uyum mekanizmaları hala bilinmemektedir. Bu üründe, in vitro koşullar altında, tuz direnci ile ilgili herhangi bir deney yoktur.

Bu tez çalışmasında, in vitro şartlarda, farklı tritikale çeşitlerinin farklı konsantrasyonlardaki tuz ortamlarında verdiği yanıtları belirleyerek, bazı fizyolojik ve biyokimyasal parametrelerini ortaya çıkarmak amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Amini and Ehsanpour (2005) İran’ da yetişen iki domates (*Lycopersicon esculentum* Mill.) çeşidinin (Isfahani ve Shirazy) NaCl stresinde, çözünür proteinler, prolin, karbonhidratlar ve Na⁺, K⁺ üzerindeki etkilerini değerlendirmişlerdir. Tohumlar su agar ortamında çimlendirildikten sonra 21 gün boyunca farklı NaCl konsantrasyonları (0, 40, 80, 120 ve 160 mM) içeren MS ortamına aktarılmıştır. Tuz konsantrasyonunun artması Isfahani’ nin sap ve yapraklarındaki çözünür protein miktarını arttırırken Shirazy’ de azaltmıştır. NaCl konsantrasyonu arttıkça, her iki çeşidin sap, yaprak ve köklerindeki prolin miktarı da artmıştır. Shirazy’ de daha fazla prolin birikimi gözlenmiştir. İki çeşidin de köklere göre sap ve yapraklarındaki prolin birikiminin daha fazla olduğu bildirilmiştir. NaCl konsantrasyonunun artmasıyla Shirazy’ nin sap ve yapraklarındaki toplam karbonhidrat miktarı artarken Isfahani’ de azalmıştır. Tuz stresi her iki çeşitte de Na⁺ yı arttırırken K⁺ yı azalttığını saptamışlardır.

Chen et al. (2011) tuza toleranslı buğday çeşidi (Cang 6001) ile tuza duyarlı buğday çeşidi (Shi 4185) genotiplerinin tuz stresi altında fizyolojik parametrelerini incelemişlerdir. Tuz stresi, buğday fidelerinin çimlenmesini ve kök gelişimini belirgin şekilde inhibe etmiş, tohum çimlenmesi ve kök gelişimi üzerindeki NaCl etkilerinin kullanılan farklı NaCl konsantrasyonları ile değiştiğini saptamışlardır. NaCl stresi altında, oksidatif hasarın daha fazla olduğunu ve potasyum (K), kalsiyum (Ca), çinko (Zn) ve demir (Fe) birikimlerinin Shi 4185 fidelerinde Cang 6001 fidelerine göre daha düşük olduğunu ve bu sonuçlarla, Cang 6001’ in olumsuz koşullarda Shi 4185’ ten daha fazla iyon biriktirme kabiliyetine sahip olduğunu göstermişlerdir. SOD aktivitesinin Cang 6001 çeşidinde Shi 4185 çeşidine göre daha yüksek seviyede olduğu, gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) analizi sonucunda da sitoplazmik Cu/ZnSOD ve MnSOD transkriptlerinin tuz stresinde Cang 6011 genotipinde daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlarla, tuz stresi altında yüksek SOD aktivitesinin fideleri ROS hasarından koruduğunu ve mikro besin öğelerinin alımının iyileştirebileceği rapor edilmiştir. Ayrıca, tuz stresi altında tuza toleranslı Cang 6001 çeşidinin H₂O₂ seviyesinin tuza duyarlı Shi 4185 çeşidinden daha düşük olduğu saptanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Bhutta (2011) tuza toleranslı buğday (S-24) ve tuza duyarlı buğday (DN-27) genotiplerinin tuz stresi altında fizyolojik değişimlerini karşılaştırmış ve antioksidan enzimlerin tuz stresine yanıtını değerlendirmiştir. Tuz stresine maruz kalan her iki genotipte de sürgün uzunluklarının düştüğünü ve sürgünlerin taze ağırlıklarının azaldığını saptamıştır. Buğday fidelerinin yaprak nispi içeriği (RWC) tüm tuz konsantrasyonlarında S-24' te DN-27' den daha fazla azaldığı görülmüştür. Uzun süre yüksek NaCl konsantrasyonuna maruz kalan buğday fidelerinin yapraklarındaki membran stabilite indeksinin her iki genotipte de en düşük seviyelere ulaştığını bildirmiştir. Tuz stresinin artmasıyla birlikte süperoksit dismutaz (SOD), peroksidaz (POD) ve katalaz (CAT) enzimlerinin aktiviteleri S-24' te artmış ve DN-27' de ise tüm enzimler farklı tuz stresi konsantrasyonlarında sabit aktivite göstermiş, bu antioksidan enzimlerin her iki genotip için de sınırlayıcı faktörler olduğunu ve bu nedenlerin DN-27' de tuz hassasiyetine yol açtığı sonucuna varmıştır. CAT ve APX' in yüksek aktivitesi, hücrede H₂O₂ seviyesini düşürürken, membranların ve CO₂ fiksasyonunun stabilitesini arttırdığını bildirmiştir.

Koyuncu (2012) Türkiye' de yetiştirilen 13 makarnalık buğday (*T. durum* Desf.) çeşidinin olgunlaşmış embriyolarını kullanarak in vitro şartlarda tuza toleranslarını değerlendirmiştir. Embriyolara kallus oluşumu ile birlikte farklı NaCl konsantrasyonları uygulamıştır. Çeşitleri kallus oluşumu, kallus ağırlığı ve rejenere kallus sayısı parametrelerine göre değerlendirmiştir. Tuz konsantrasyonlarının artmasıyla bütün parametrelerdeki değerlerin azaldığını ve çeşitler arasında önemli farklılıkların bulunduğunu gözlemlemiştir. Çeşitlerin kallus oluşturma oranlarının artan tuz konsantrasyonları ile azaldığını, azalan kallus oluşumu ile birlikte kallus ağırlığının da doğrusal olarak düştüğünü ve yüksek NaCl konsantrasyonlarında kallusların rejenerasyon yeteneklerini yitirdiğini saptamıştır.

Ashfaq et al. (2014) buğdayda (*Triticum aestivum* L.) tuz stresinin hafifletilmesinde hidrojen peroksitin (H₂O₂) rolünü belirlemek için yaptıkları çalışmada, buğday çeşitlerini, çimlendikten 1 hafta sonra farklı konsantrasyonlarda (0, 50, 100 mM) H₂O₂ ve 100 mM NaCl ile 30 gün boyunca muamele etmişlerdir. Elde ettikleri sonuçlara göre H₂O₂ uygulamasının 30 günlük buğday fidelerinde prolin içeriğinin kontrol grupları ile karşılaştırıldığında arttığı ve artan stres koşullarından korumasını, su

2. KAYNAK ÖZETLERİ

potansiyeli ve osmotik potansiyelini de arttırdığını saptamışlardır. Ayrıca, H_2O_2 muamelesiyle tuz stresi altındaki bitkilerde meydana gelen pigment içeriğindeki azalmada iyileşmeler olduğu belirlenmiştir. Bitki büyüme parametrelerinde tuz stresi altında azalmalar olduğu izlenmiş, ancak bu azalmalar H_2O_2 uygulaması ile iyileştirilmiştir. H_2O_2 uygulamasının Na^+ ve Cl^- miktarındaki azalma ile tuz stresinin etkisini azalttığını, buna karşın prolin içeriğini, nitrat asimilasyonunu, su tutma kapasitesini ve fotosentetik pigmentlerin etkinliğini arttırdığını bildirmişlerdir.

Carrasco-Ríos and Pinto (2014) tuzluluğun, mısır (*Zea mays* L.) çeşitleri Lluteño (tuzluluğa adapte edilmiş) ve Jubilee' nin (gelişmiş çeşitlilik) yapraklarındaki lipid peroksidasyon ve antioksidan enzimler üzerindeki etkilerini değerlendirmişlerdir. Tuzluluk, bitki biyokütlesinde, Jubilee' de yaklaşık %60 ve Lluteño' da %20' lik önemli bir düşüşe neden olmuştur. Kök sistemindeki gelişim tuzluluğa tolerans göstererek korunmuştur. Biyokütledeki azalma ve peroksidlerin üretilmesinden kaynaklanan hücre zarlarındaki hasar Lluteño' da daha az görülmüştür. Her iki mısır çeşidinde de tuzluluktaki artış MDA içeriğinde de bir artışa neden olmuştur. Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi, her iki mısır çeşidinde de tuzluluk arttıkça azalmıştır. Katalaz (CAT) aktivitesi, Lluteño' da artarken Jubilee' de önemli bir değişiklik olmamıştır. Askorbat peroksidaz (APX) aktivitesi, Jubilee' de anlamlı bir farklılık göstermezken, Lluteño' da azalmıştır. Bununla birlikte, incelenen enzimlerin çoğu, kontrol bitkileriyle karşılaştırıldığında tuzluluktan önemli ölçüde etkilendiğini bildirmişlerdir.

Soleimani et al. (2015) gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu kullanarak, farklı konsantrasyonlardaki NaCl ile muameleden sonra kimyon (*Cuminum cyminum* L.)' daki iki antioksidan geninin yani demir-süperoksit dismutaz (Fe-SOD) ve katalazın (CAT) koruyucu rolünü belirlemiş ve enzimatik aktiviteler, üç antioksidan için spektrofotometrik olarak analiz edilmiştir. Büyüme parametreleri, protein içeriği ve prolin birikimi de ölçülmüştür. Kontrol bitkilerine kıyasla tuzla muamele edilen bitkilerde daha fazla prolin birikimi görülmüştür. Ayrıca, tuza maruz kalan bitkilerde daha yüksek süperoksit dismutaz (SOD), askorbat peroksidaz (APX) ve katalaz (CAT) aktiviteleri görülürken protein içeriğinde ise azalma görülmüştür. Kuru ağırlıkları kontrol gruplarına kıyasla azalmış ve bu azalma tuz konsantrasyonu ile kademeli olarak

2. KAYNAK ÖZETLERİ

artmıştır. Tuzla muamele, bitkilerin sürgün uzunluklarını düşürürken, kök uzunlukları tuzdan neredeyse etkilenmemiştir.

Pouya (2015) yaptığı çalışmada, iki tuza toleranslı (ET-84-15 ve ET-86-9) ve iki tuza hassasiyetli (ET-85-17 ve Jouvanilo) tritikale genotiplerinde uzun süreli tuz stresinin etkilerini inceleyerek, fotosentetik parametreleri ve antioksidan enzimlerini analiz etmiştir. 200 mM NaCl' ye maruz bırakılan tuza duyarlı tritikale genotiplerinin terleme oranı, stoma iletkenliği ve fotosentez hızında önemli bir azalma bulunmuştur. Tuz stresine maruz bırakılan tuza duyarlı genotipler kontrol grupları ile karşılaştırıldığında SOD, CAT, ve GPOD aktivitelerinde artışlar olduğunu, bu artış ile birlikte H₂O₂ ve MDA miktarlarının da yüksek olduğu, bunların aksine APX aktivitesinde ise değişiklik olmadığını belirlemiştir. Tuza toleranslı genotiplerin H₂O₂ ve MDA miktarlarının daha düşük olduğu, APX aktivitesinin sabit kaldığı ve diğer enzimlerin aktivitelerinde artışlar olduğu belirlenmiştir. Antioksidan enzimlerin aktivitesinin çiçeklenme evresinde geç filizlenme evresine göre hem tuzlu ortamda hem de kontrol ortamında daha yüksek olduğu bulunmuş ve çiçeklenme evresindeki tritikalenin tuza daha toleranslı olduğunu bildirilmiştir.

Piwowarczyk et al. (2016) mürdümük (*Lathyrus sativus* L.) bitkisinin abiyotik stres şartlarında fizyolojik ve moleküler mekanizmalarını anlayabilmek için, dört mürdümük genotipinin in vitro doku kültürü şartlarında tuzluluk stresine verdiği yanıtları, fide gelişim döneminde incelemişlerdir. Tuzluluk stresi, agar ortamına 0, 50, 100 ve 200 mM NaCl ilave edilerek indüklenmiştir. 0 ve 50 mM NaCl konsantrasyonları, çimlenme ve filizlenme yüzdesini önemli ölçüde etkilemezken, 200 mM NaCl konsantrasyonu bu parametrelerin seviyesini düşürmüştür. NaCl stresine maruz kalan mürdümük fidelerinin kök ve sürgün uzunluklarında önemli ölçüde azalma olmuş, sürgünlerin kuru ağırlığı bu durumdan etkilenmemiştir. Artan tuz konsantrasyonu, hem kök hem de sürgün dokularındaki hücresel zararın bütünlüğünü azaltmıştır. Köklerde daha fazla fenolik bileşik birikimi olurken ve antioksidan enzimlerin (peroksidaz ve katalaz) aktivitesinde önemli değişiklikler gözlenirken, sürgünlerde bu durumlar gözlenmemiştir. Prolin içeriği, 100 mM NaCl ortamında köklerde artmıştır. Tuz stresi, test edilen genotiplerin fotosentetik pigment içeriğinde

2. KAYNAK ÖZETLERİ

değişikliğe neden olmamıştır. Sürgünlerin köklerden daha iyi sonuç vermesinin deneylerin yapıldığı in vitro koşullardan kaynaklanabileceği sonucuna varmışlardır.

Demirbaş ve Balkan (2018) ülkemizde yaygın olarak yetiştirilen 4 tritikale çeşidini (Karma-2000, Presto-2000, Tatlıcak-97 ve Mikham-2002) kullanarak ve tritikale tohumlarına hidrojen peroksit (H_2O_2) ön uygulaması yaparak çeşitli tuz konsantrasyonlarında fide gelişim dönemindeki morfolojik ve fizyolojik parametrelerini saptamışlardır. Yapılan gözlemler ve ölçümlerle, tuz stresindeki artışın tüm morfolojik parametreleri baskıladığını belirlemişlerdir. Tuz stresi altında farklı genotipteki tritikale çeşitlerine yapılan H_2O_2 ön uygulamasına farklı tepkiler gösterdiği, morfolojik ve fizyolojik parametreler bakımından Tatlıcak-97 ve Presto-2000 çeşitlerinin en yüksek değerlere sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Tritikalede karşılaşılabilecek tuz stresinin olumsuz etkilerini azaltmak için tohumlara ekim öncesi H_2O_2 ön uygulaması yapılmasının yararlı olabileceği sonucuna varmışlardır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Yararlanılan cihazlar

Çizelge 3.1 Tez çalışmasında kullanılan cihazlar ve modelleri

Cihaz Adı	Model
İklimlendirme Kabini	Wisd Thermostable GC-450
Spektrofotometre	Thermo Scientific™ Multiskan Go
Soğutmalı Santrifüj	Hettich Zentrifugen Universal 320R
Vorteks	Wisd Wisemix VM-10
Ultra Saf Su Cihazı	Millipore, Q-3W
Steril Kabin	ESCO NordicSafe™
Otoklav	JSR, JSAC-60
pH Metre	OHAUS ST 3100F
Manyetik Karıştırıcı	Daihan, shr
Su Banyosu	Wisd-WiseBath, Daihan
+4 Soğutucu	Edesa
-20 Soğutucu	J.P. Selecta
Hassas Terazı	Shimadzu ATX 224

3.1.2 Kullanılan çözeltiler ve hazırlanışları

Çalışmada kullanılan çözeltilerin kullanıldığı yerler ve hazırlanış şekilleri aşağıda belirtilmiştir.

- % 3' lük sülfosalisilik asit** (prolin içeriği için homojenizasyon çözeltisi): 3 gram sülfosalisilik asit 100 mL saf su içerisinde çözülmüştür.
- Asit ninhidrin hazırlanışı** (prolin içeriği için): 1,25 gram ninhidrin 30 mL asetik asit ve 20 mL fosforik asit içerisinde çözülmüştür.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3. **Antron reaktifi** (çözünebilir şeker tayini için): 50 mg antron 50 mL %95' lik H_2SO_4 içerisinde çözülmüştür.
4. **0,1 mM EDTA-Etilen Diamin Tetra Asetik asit** (SOD reaksiyon karışımı için): 0,073 gram EDTA tartılmıştır, 250 mL 50 mM KH_2PO_4 (pH: 7,8) tamponu içerisine eklenerek çözülmüştür.
5. **0,2 M KH_2PO_4 (pH: 7,0)**, 0,1 mM EDTA (Hücresel antioksidan enzimlerin reaksiyon çözeltisi): 6,8 g KH_2PO_4 225 mL saf suda çözülmüş, 1 N NaOH ile pH: 7,0' ye titre edildikten sonra saf su ile 250 mL' ye tamamlanmış ve 0,0087 g EDTA ilave edilerek hazırlanmıştır.
6. **50 mM KH_2PO_4 (pH: 7,5)** (CAT tampon çözeltisi): 1,7 g KH_2PO_4 200 mL saf suda çözülmüş, pH: 7,5' e ayarlandıktan sonra hacim saf su ile 250 mL' ye tamamlanmıştır.
7. **20 mM H_2O_2 çözeltisi** (CAT aktivitesi ölçümünde kullanılan substrat çözeltisi): 170 μ L %35' lik H_2O_2 alınıp hacmi saf su ile 100 mL' ye tamamlanarak hazırlanmıştır.
8. **50 mM KH_2PO_4 (pH: 7,0)** (APX tampon çözeltisi): 1,7 g KH_2PO_4 200 mL saf suda çözülmüş, pH: 7,0' e ayarlandıktan sonra hacim saf su ile 250 mL' ye tamamlanmıştır.
9. **0,5 mM sodyum askorbat** (APX reaksiyon karışımı için): 0,1 g sodyum askorbat 100 mL saf su içerisinde çözülmüştür.
10. **6 mM H_2O_2 çözeltisi** (APX aktivitesi ölçümü için): 51 μ L %35' lik H_2O_2 alınıp hacmi saf su ile 100 mL' ye tamamlanarak hazırlanmıştır.
11. **13 mM metiyonin çözeltisi** (SOD reaksiyon karışımı için): 0,586 g metiyonin tartılmış, 250 mL 50 mM KH_2PO_4 (pH: 7,8) tamponu içerisine ilave edilerek çözülmüştür.
12. **2 μ M riboflavin** (SOD aktivitesi için 2. çözelti): 0,038 g riboflavin, 1 L saf suda çözülmüş, 3 mL' lik reaksiyon karışımının 2 μ M riboflavin içermesi için 60 μ L riboflavin alınmıştır.
13. **75 μ M NBT-Nitroblue Tetrazolium Klorür** (SOD reaksiyon karışımı için): 0,018 g NBT alınmış, 300 mL 50mM KH_2PO_4 (pH:7,8) tamponu içerisine ilave edilerek çözülmüştür.
14. **50 mM sodyum karbonat** (SOD reaksiyon karışımı için): 0,53 g Na_2CO_3 100 mL saf su içerisinde çözülmüştür.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

- 15. 50 mM KH₂PO₄ (pH: 7,8)** (SOD tampon çözeltisi): 1,7 g KH₂PO₄, 200 mL saf suda çözülmüş, pH: 7,8' e ayarlandıktan sonra hacim saf su ile 250 mL' ye tamamlanmıştır.
- 16. % 1' lik TCA** (trikloroasetik asit) (Lipid peroksidasyon aktivitesi homojenat çözeltisi): 100 mL saf su içerisine 0,1 g TCA ilave edilmiş, TCA tam olarak çözünene kadar karıştırılarak hazırlanmıştır.
- 17. % 0,5' lik TBA** (tiobarbutirik asit) (Lipid peroksidasyon aktivitesi reaksiyon çözeltisi): 100 mL saf su içine 20 gram TCA çözülmüş ve içerisine 0,5 g TBA ilave edilerek ve iyice karıştırılarak hazırlanmıştır.
- 18. 0,1 M NaH₂PO₄ (pH: 5,5)** (Peroksidazın aktivitesi ölçümünde kullanılan tampon çözeltisi): 3 g NaH₂PO₄ tartılarak 200 mL saf suda çözülmüş ve pH: 5,5'e ayarlandıktan sonra toplam hacim 250 mL' ye tamamlanmıştır.
- 19. Peroksidaz aktivitesi ölçümünde kullanılan substrat çözeltisi:** 30 µL guaikol ve 21 µL H₂O₂, 50 mL 0,1 M fosfat tamponu (NaH₂PO₄) (pH: 5,5) içinde çözülerek hazırlanmıştır.

3.1.3 Bitki materyali

Bir tritikale çeşidi (Ümran Hanım) Doğu Anadolu Tarımsal Araştırma Enstitüsü (Erzurum, Türkiye), dört tritikale çeşidi de (Alper Bey, Melez 2001, Mikham 2002 ve Tatlıcak) Bahri Dağdaş Uluslararası Tarımsal Araştırma Enstitüsü (Konya, Türkiye) tarafından temin edilmiştir.

3.2 Yöntem

3.2.1 Embriyogenik kallus oluşumu

Bu çalışmada, olgun tohumlar 5 dakika boyunca % 70 etanol ile muamele edilmiş, birkaç kez distile steril su ile yıkanmış, 20 dakika boyunca % 3' lük ticari çamaşır suyu (ACE) ile muamele edilmiş daha sonra birkaç kez distile steril su ile yıkanarak yüzey sterilizasyonu yapılmış ve gece boyunca 4 °C' de bekletilmiştir. Olgunlaşan tohumlardan aseptik olarak kesilmiş olan embriyolar, 26 ± 1 ° C' de 30 gün boyunca tam kuvvetli MS ortamı içeren petri kaplarında kültürlenmiştir. Embriyolar

3. MATERYAL VE YÖNTEM

toplam 4 muameleye karşılık gelen farklı 2,4-D konsantrasyonları ile desteklenmiş MS ortamında aktarılmıştır, diğer bir deyişle, kallus indüksiyonu için her biri 2, 4, 8 ve 12 mg L⁻¹ de 4 kez çoğaltılmıştır.

Aydınlatma koşulları, 1500 lx aydınlatma yoğunluğunda 16 saat aydınlık / 8 saat karanlık fotoperiyodu olarak ayarlanmıştır.

Kallus indüksiyon oranı aşağıdaki gibi hesaplanmıştır:
İndüklenmiş kalluslar / toplam eksplant sayısı x 100.

3.2.2 Doku kültürü ortamı

Deneyin tüm aşamalarında kullanılan kültür ortamı, 2 mg L⁻¹ glisin, 100 mg L⁻¹ miyoinositol, 0,5 mg L⁻¹ nikotinik asit, 0,5 mg L⁻¹ piridoksin HCl, 0,1 mg L⁻¹ tiamin HCl vitaminleri, 1,95 g L⁻¹ MES, 50 mg L⁻¹ askorbik asit ve 20 g L⁻¹ sukroz içeren MS ortamı otoklavlanmadan önce pH: 5,8' e ayarlanarak Murashige ve Skoog' a (1962) göre, 7 g L⁻¹ agar ile katılaştırılıp hazırlanmıştır.

Otoklavlandıktan sonra vitamin ve hormonları sterilize etmek için, 0,22 µm porlu selüloz nitrat filtreleri kullanılmıştır.

3.2.3 Tuz stresi muamelesi

Olgun tritikale embriyoları 4 mg L⁻¹ 2,4-diklorofenoksiasetik asit (2,4-D) içeren MS ortamına aktararak 15 gün boyunca karanlıkta kültürlenmiştir. Daha sonra sadece embriyogenik kalluslar beş farklı dozda (0, 50, 100, 150, 200 mM NaCl) NaCl içeren MS ortamına aktararak 60 gün boyunca kültürlenmiş ve 30 gün boyunca alt kültüre alınmıştır. Tüm kalluslar iklimlendirme kabiniinde, floresan ışığı altında 62 µmol m⁻² s⁻¹ de 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık döngüde ve 26 ± 1 °C' de tutulmuştur. Toplam kültür süresi 75 gün olmuştur.

Embriyogenik kallusların büyüme hızı, prolin birikimi, toplam çözünebilir şekerler ve antioksidan enzim aktiviteleri 30 günlük tuz stresine maruz bırakıldıktan sonra değerlendirilmiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Ayrıca 4 mg L⁻¹ 2,4-diklorofenoksiasetik asit (2,4-D) içeren MS ortamında 15 gün boyunca karanlıkta kültürlenmiş embriyolardan elde edilen embriyogenik kalluslar kontrol grupları (0 mM NaCl) da olmak üzere önce 50 mM NaCl içeren MS ortamına aktararak 15 gün boyunca kültürlenmiş ve bu süre sonunda H₂O₂ ve lipid peroksidasyon miktarlarına bakılmıştır. Daha sonra 50 mM NaCl’deki kalluslar 100 mM NaCl içeren MS ortamına aktararak 15 gün kültürlenmiş ve son olarak 100 mM NaCl içeren MS ortamındaki kalluslar 200 mM NaCl içeren MS ortamına aktarılmış ve 15 gün kültürlenerek analizler tekrar edilmiştir.

3.2.4 Prolin miktarının değerlendirilmesi

Prolin içeriği Bates et al. (1973) metodu ile ölçülmüştür. Embriyogenik kalluslar (100 mg), 5 mL %3’lük sülfosalisilik asit ile homojenize edilerek 4800 x g’de ve 4 °C’de 15 dakika santrifüj edilmiştir. 2 mL ekstrakta, 2 mL asit ninhidrin ve 2 mL glisial asetik asit eklenerek tüp içerisinde karıştırılmıştır. Örnekler 100 °C’de bir saat inkübe edilmiştir. Reaksiyon 20 dakika boyunca buz banyosunda bekletilmiş ve reaksiyon karışımına 4 mL toluen ilave edilerek reaksiyon sonlandırılmıştır. Standart olarak toluen kullanılarak, 520 nm’de reaksiyonun absorbansı ölçülmüştür. Prolin konsantrasyonu, bir kalibrasyon eğrisiyle belirlenmiştir.

3.2.5 Çözünabilir şeker tayini

Çözünabilir şeker tayini için embriyogenik kallus başına 50 mg doku bir havanda öğütülerek, 1 mL %80 etanol eklenerek homojenize edilmiş ve 5000 x g’de ve 4 °C’de 10 dakika santrifüjlenmiştir. Süpernatantlar başka tüplere aktarılmış ve pelletler tekrar 0,5 mL %80 etanolde homojenize edilerek, yukarıdaki gibi santrifüjlenmiştir. İkinci süpernatant ilk süpernatanta ilave edilmiştir. Toplam çözünabilir şeker tayini için, Watanabe et al. (2000) modifiye edilmiş bir yöntemi kullanılmıştır. 1mL ekstrakt 3 mL yeni hazırlanmış antron reaktifi (50 mg antron + 50 mL %95 H₂SO₄) ile muamele edilerek 100 °C’de 10 dakika bekletilmiştir. Buzla soğutulduktan sonra, standart olarak glikoz kullanılarak, 620 nm’de absorbansı ölçülerek standart eğri grafiği oluşturulmuştur.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.2.6 Hidrojen peroksit (H₂O₂) miktarının belirlenmesi

Hidrojen peroksit (H₂O₂) miktarının belirlenmesi için; 0,2 g embriyogenik kallus dokusu tartılarak 2 mL soğuk %0,1 TCA içinde homojenize edilmiştir. Homojenat 15000 rpm' de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Cam tüplere sırasıyla 0,5 mL 50 mM KH₂PO₄ (pH: 7,0) tamponu ve 1 mL KI eklenmiştir. Tüplere 0,5 mL süpernatanttan da eklenerek vortekslenmiştir. 390 nm' de absorbands değeri ölçülerek kaydedilmiştir. Sonuçlar g doku başına düşen H₂O₂ miktarı (nmol g⁻¹) olarak hesaplanmıştır.

3.2.7 Lipid peroksidasyonu (LPO)

Lipid peroksidasyonu için 0,2 g embriyogenik kallus dokusu tartılarak 2 mL soğuk %0,1 TCA içinde homojenize edilmiştir. Homojenat 15000 rpm' de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatanttan 1 mL alınarak cam tüpe konulmuştur. Cam tüpe 1 mL TCA içinde ısıtılmış %0,5' lik TBA eklenmiştir. Reaksiyon karışımı 98 °C sıcak su banyosunda 30 dakika inkübe edilmiş ve reaksiyon tüplerin buz banyosuna alınmasıyla durdurulmuştur. 562 ve 600 nm' de absorbandsları ölçülmüştür. Lipid peroksidasyonun (MDA) hesaplanmasında; 562 nm' de ölçülen absorbands değerinden 600 nm' de ölçülen absorbands değeri çıkarılmış ve 1 mL çözeltideki MDA (nmol g⁻¹): [(A₅₆₂- A₆₀₀)/155000] x 10⁶ formülüyle hesaplanmıştır. Sonuçlar MDA (nmol g⁻¹) şeklinde verilmiştir (Ananieva et al. 2002).

3.2.8 Antioksidan enzim aktivitesi

Enzimlerin ekstraksiyonu için, embriyogenik kallus dokularından 0,5 g tartılarak bir havan içerisine konulup üzerine sıvı azot ilave edilerek toz haline gelinceye kadar öğütülmüştür. Daha sonra üzerine 5 mL 0,1 mM etilen diamin tetra asetik asit (EDTA) içeren soğuk 0,2 M fosfat tamponu (pH: 7,0) eklenerek homojenize edilmiştir. Ekstrakt bir santrifüj tüpüne aktararak 12000 rpm' de, 4 °C' de 15 dakika santrifüjlenmiştir. Süpernatant, CAT, SOD, APX ve POX enzimlerinin aktivitesini ölçmek için kullanılmıştır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.2.8.1 Katalaz aktivitesinin belirlenmesi

Katalaz (CAT) aktivitesi için Gong et al. (2001) uyguladığı metot kullanılmıştır. Bu metot, katalazın ortamdaki H_2O_2 'nin oksijen ve suya dönüşümünü sağlarken meydana gelen absorbans değişiminin 240 nm' de izlenmesi esasına dayanmaktadır.

Katalaz (CAT) aktivitesi, 50 mM fosfat tamponuna (pH: 7,5) 20 mM H_2O_2 ilave edilerek 240 nm' de absorbanstaki düşüş izlenerek ölçülmüştür. Bir birim CAT aktivitesi, Gong et al. (2001) metoduna göre dakikada 1 nmol H_2O_2 kullanılan enzim miktarı olarak tanımlanmıştır.

3.2.8.2 Süperoksit dismutaz aktivitesinin belirlenmesi

Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi, Agarwall and Pandey (2004) metoduna göre nitro-blue tetrazolium (NBT) boyasının emilimindeki azalmanın izlenmesi ile belirlenmiştir. Reaksiyon karışımı 13 mM metiyonin, 2 μ M riboflavin, 75 μ M NBT, 0,1 mM EDTA, 50 mM sodyum karbonat (Na_2CO_3), 50 mM fosfat tamponu (pH: 7,8) ve 0,1 mL ekstrakt içermiştir. Riboflavin ilave edilerek tüpler çalkalanmış ve 30 cm altına iki floresan tüp içeren ışık kümesine yerleştirilmiştir. 20 dakika sonra, tüpler siyah bir örtü ile kaplanarak reaksiyon tamamlanmıştır. Absorbans, 560 nm' de spektrofotometrik olarak kaydedilmiştir.

3.2.8.3 Askorbat peroksidaz aktivitesinin belirlenmesi

Askorbat peroksidaz aktivitesi, Nakano and Asada (1981) metoduna göre 290 nm' de absorbanstaki azalışa bağlı olarak belirlenmektedir. Enzim aktivitesi, 50 mM potasyum fosfat tamponu (pH: 7,0), 0,5 mM sodyum askorbat, 0,1 mM EDTA, 6 mM H_2O_2 ve 0,2 mL enzim ekstraktı içeren 3 mL reaksiyon karışımının 290 nm' de ölçülmesiyle belirlenmiştir.

3.2.8.4 Peroksidaz aktivitesinin belirlenmesi

Peroksidaz (POX) aktivitesi, guaikol ve H_2O_2 'nin substrat olduğu reaksiyonun ürünü olan renkli bileşiğin meydana getirdiği absorbans artışının 470 nm' de izlenmesi

3. MATERYAL VE YÖNTEM

esasına dayanmaktadır. 0,1 M NaH_2PO_4 (pH: 5,5) çözeltisi hazırlanmıştır. 0,2 g embriyogenik kallus dokusu 2 mL 0,1 M NaH_2PO_4 (pH: 5,5) çözeltisinde homojenize edilmiştir. Aktivite ölçümü için spektrofotometre küvetine; 50 mL 0,1 M NaH_2PO_4 (pH: 5,5), 30 μL guaikol ve 21 μL H_2O_2 içeren POD çözeltisinden 3 mL konulduktan sonra, üzerine 10 μL enzim ekstraktı ilave edilmiştir. 470 nm’ de 5 dakika boyunca absorbanı artışı belirli aralıklarla kaydedilmiştir.

3.2.9 İstatistiksel analiz

Deney, her bir petri kabında 25 eksplant olacak şekilde tamamen rastgele 4 tekrarlı yapılmıştır. Her bir petri kabı bir deney birimi olarak kabul edilmiştir.

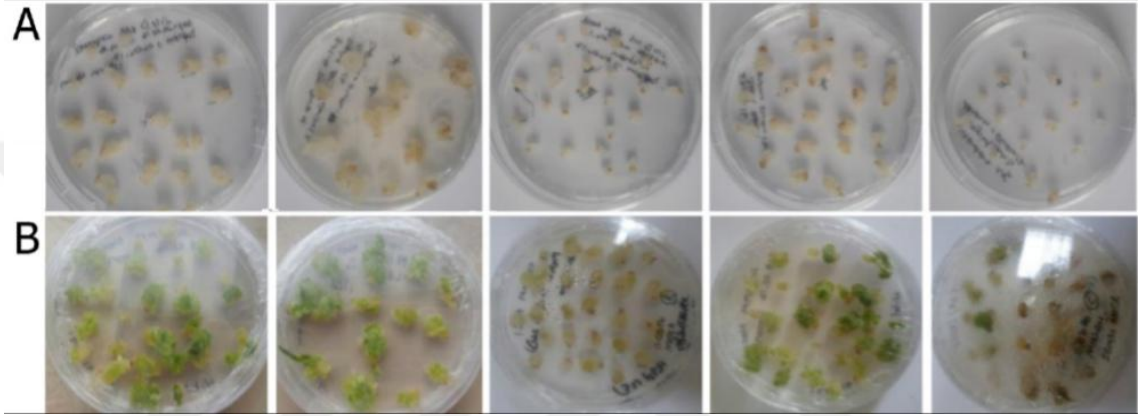
Varyans analizi ve Waller-Duncan K oranlı t testi, anlamlı farklılıkları belirlemek için kullanılmıştır.

İstatistiksel analiz, SPSS 20.0 (IBM Crop., Armonk, NY, ABD) kullanılarak yapılmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Bu çalışmada, başarılı kallus indüksiyonu için en iyi konsantrasyonu bulmak üzere farklı 2,4-D konsantrasyonları (2, 4, 8 ve 12 mg L⁻¹) test edilmiştir. Test edilen tüm genotiplerde kallus indüksiyonu için 4 mg L⁻¹ 2,4-D konsantrasyonunun en uygun olduğu bulunmuştur. 4 mg L⁻¹ de üretilen kallusların, kompakt, sağlıklı ve yumuşak olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1 A- Beş tritikale genotipi için NaCl içermeyen 4 mg L⁻¹ 2,4-D takviye edilmiş MS ortamında kallus oluşumu. B- Beş tritikale genotipi için seleksiyon kültüründen 2 hafta sonra elde edilen tuza dirençli embriyogenik kalluslar.

Çizelge 4.1 İn vitro şartlarda NaCl stresinden etkilenen beş tritikale genotipinde kalluslar, embriyogenik kalluslar ve nekroz ağırlıklarının taze ağırlık artışı için varyans analizi (ANOVA).

Genotipler	Kallus indüksiyonu (%)	Taze kallus ağırlığı (g)	Embriyogenik kallus ağırlığı(g)	Kallus nekroz ağırlığı (g)
Melez 2001	94,17 ^b ± 3,69	0,19 ^c ± 0,01	0,45 ^d ± 0,04	0,21 ^c ± 0,02
Alper Bey	97,13 ^a ± 11,58	0,17 ^d ± 0,01	0,65 ^b ± 0,06	0,62 ^a ± 0,06
Mikham 2002	97,33 ^a ± 11,62	0,17 ^d ± 0,01	0,48 ^c ± 0,04	0,30 ^d ± 0,03
Tatlıcak	98,47 ^a ± 11,45	0,23 ^b ± 0,02	0,68 ^a ± 0,06	0,52 ^c ± 0,05
Ümran Hanım	99,07 ^a ± 10,95	0,27 ^a ± 0,02	0,64 ^b ± 0,06	0,59 ^b ± 0,05

* Aynı sütunda farklı üst yazıya sahip değerler, Duncan testine göre P < 0,05 düzeyinde önemli ölçüde farklıdır; küçük harf = satırdaki fark olarak ifade edilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Çizelge 4.1’ de gösterilen sonuçlar, tritikale Ümran Hanım’ ın, diğer genotiplere kıyasla kallus oluşumu açısından en yüksek kallus indüksiyon hızına (%99,07) sahip olduğunu göstermiştir. Kültürlenmiş tritikale genotipleri arasında Mikham 2002 (%97,33) ve Tatlıcak (%98,47), Alper Bey (%97,13) ve Melez 2001 (%94,17) ile karşılaştırıldığında daha yüksek kallus oluşum oranlarına sahip olduğu görülmüştür. Kallus büyüme potansiyeli ve embriyogenik kallus oluşumu genotipten büyük ölçüde etkilenmiştir.

Sonuçlarımız, kallus indüksiyon oranlarının %94,17 ile %99,07 arasında değiştiğini göstermiştir. Bu da kallus büyüme potansiyelinde beş genotip arasındaki önemli genotipik varyasyonları göstermiştir (Çizelge 4.1; Şekil 4.1).

Çizelge 4.2 Beş tritikale genotipinin ve NaCl konsantrasyonunun, beş tritikale genotipinde embriyogenik kallus oluşturan eksplantların yüzdesi üzerindeki etkisi.

Konsantras- yonlar	Genotipler				
	Alper Bey	Melez 2001	Mikham 2002	Tatlıcak	Ümran Hanım
0 mM	95,00 ± 0,9aBC	94,00 ± 0,9aC	96,00 ± 0,9aBC	95,00 ± 0,9aBC	97,00 ± 0,9aA
50 mM	87,00 ± 0,8bB	51,00 ± 0,5bC	46,00 ± 0,4bD	95,00 ± 0,9aA	94,00 ± 0,9aA
100 mM	80,00 ± 0,8cC	45,00 ± 0,4cD	40,00 ± 0,4aE	93,00 ± 0,9bA	88,00 ± 0,8cB
150 mM	78,00 ± 0,7dB	36,00 ± 0,3dC	32,00 ± 0,3aE	90,00 ± 0,9cB	79,00 ± 0,7dA
200 mM	71,00 ± 0,7eC	30,00 ± 0,3eD	27,00 ± 0,2aE	85,00 ± 0,8dA	76,00 ± 0,7eB

* Aynı sütunda büyük harflerle ve küçük harflerle gösterilen değerler, Duncan testine göre $P < 0,05$ düzeyinde önemli ölçüde farklıdır; büyük harf = sütundaki fark; küçük harf = satırdaki fark olarak ifade edilmiştir. Değerler ortalama ± standart sapmadır.

İncelenen parametrelerdeki geniş bir değişiklik, farklı NaCl konsantrasyonlarına cevap olarak test edilen genotipler arasında belirlenmiştir. İn vitro tuz stresi koşullarında embriyogenik kallus oluşumu için ölçülen özelliklerin ortalama karşılaştırması (Çizelge

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.2), çalışılan tüm parametreler için tuz konsantrasyonunun, genotipin ve beş farklı genotipin etkileşiminin anlamlı etkilerinin gözlemlendiğini göstermiştir. Sonuçlar, embriyogenik kallus oluşumunun yüksek tuzluluk stresiyle önemli ölçüde azaldığını göstermiştir. Embriyogenik kallus oluşumu, kontrol bitkilerine kıyasla 150 mM ve 200 mM tuz stresi altındaki tüm genotiplerde önemli ölçüde azalmıştır. Özellikle, Melez 2001 ve Mikham 2002 genotiplerinin eksplantlarının büyüme potansiyeli, tuz stresi altında büyük ölçüde azalmıştır. Test edilen beş genotipten Tatlıcak, 200 mM NaCl' de %85 direnç gösterebilmiştir. Ümrân Hanım ve Alper Bey sırasıyla %76 ve %71 oranında dayanabilmiştir. Mikham 2002 ve Melez 2001' in büyümesi, 200 mM' de %27 ve %30 oranında belirgin bir şekilde durmuştur; üstelik bu iki genotip nekrotize edilmiş ve uygulamanın 2-3 haftasında ölmüştür (Şekil 4.1; Çizelge 4.2).

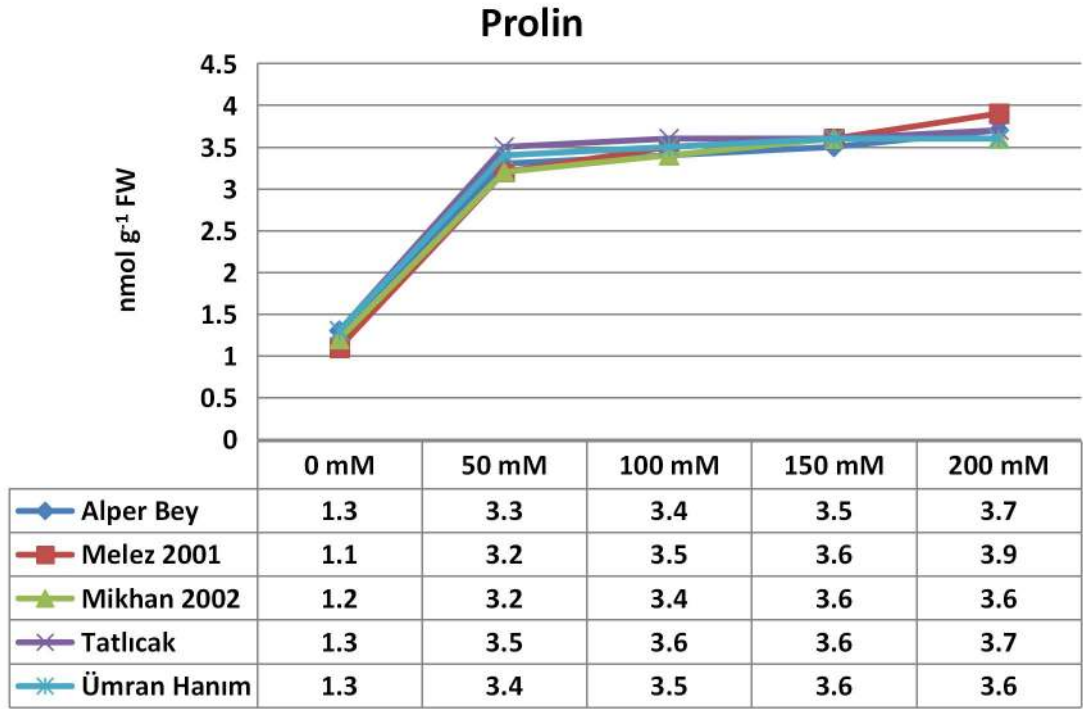
Tuzluluk, bitki büyümesini ve verimliliğini azaltan ana faktörlerden biridir. Tuzluluk direnci, normal şartlar altında geleneksel yetiştirme teknikleri kullanılarak elde edilmesi zor olan poligenik bir özelliktir (Richards 1996). İn vitro kültürün, tuz direncini değerlendirmek için kullanışlı ve hızlı bir yöntem olduğu bilinmektedir ve bitkilerde, özellikle de farklı tuz konsantrasyonlarında, moleküler seviyede fizyolojik ve biyokimyasal yolların incelenmesi için kontrollü ve kararlı bir ortam sağlamıştır. (Lokhande et al. 2010). İn vitro kültürün, yeni çeşit gelişimi sırasında tuz stresinin uyarılmasından sorumlu olabilecek stresli bir ortam olduğu öne sürülmüştür (Bang et al. 2015; Jo et al. 2016). Bitkilerin in vitro kültür koşullarında yenilenmesi, birkaç üründe incelenmiştir (Ghadakchiasl et al. 2016). Bu çalışmaların çoğu, tuz stresi ve kallus oluşumunu ve bitki rejenerasyonunu etkileyen faktörler üzerine yapılmıştır (Amini and Ehsanpour 2006). Bu çalışmada, farklı tuz konsantrasyonlarında tritikaleye ait in vitro embriyogenik kallus oluşumu tepkileri test edilmiş ve bu çalışma, tuz stresine verdikleri tepkilerde önemli farklılıklar göstermiştir. Beş tritikale genotipinin hayatta kalması için embriyogenik kallus indüksiyonu %27,0 ile %95,0 arasında değişmiştir (Çizelge 4.2). Embriyogenik kallus oluşumu ve tuz stresi koşulları altında bitki rejenerasyonunun son derece genotip bağımlı olduğu gösterilmiştir. Embriyogenik kallusların oluşumu genellikle oksinler, özellikle 2,4-D tarafından indüklenmiştir (Lutts et al.1999). Buğday, yulaf ve mısır gibi birçok bitkide embriyogenik kallusların rejenerasyonu için tek başına oksin olarak 2,4-D kullanılmıştır (He et al. 1986; Regitzer et al. 1989; Naqvi et al. 2002). Bu çalışmada, tritikalede embriyogenik kallus potansiyeli olan kallusların

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

indüksiyonu için düşük 2,4-D konsantrasyonu kullanılmıştır. Sonuçlarımız, embriyogenik kallus oluşum yüzdesinin, NaCl seviyesine ve genotipe bağlı olarak (Çizelge 1), önceki raporlardakilere benzer şekilde önemli ölçüde değiştiğini göstermiştir (Piwowarczyk et al. 2016). Kallus indüksiyonu ve rejenerasyon kapasitesinin benzer bir cevabı makarnalık buğday genotiplerinde de bildirilmiştir (Rashid et al. 2002). Bu araştırmacılara göre, ortamın yapısı, genotip ve eksplant kaynağı gibi birçok faktör, kallus büyüme kapasitesi, embriyonik farklılaşma ve bitki yetiştiriciliği kapasitesiyle ilgili işlemleri çeşitli derecelerde etkilemiştir. Buğday genotiplerinde kallus başlatma yanıtında önemli genotipik farklılıklar gözlenmiş ve kallus indüksiyon kapasitesi, tuz ortamı ile ilişkilendirilmiştir (Özgen ve diğerleri 1996).

Tritikale embriyogenik kallusların prolin içeriği, tuz stresine yanıtta kademeli olarak arttığı görülmüştür. Tüm tuz seviyelerinin prolin içeriğinde hafif artışlara neden olduğu ve en yüksek prolin seviyesinin 200 mM NaCl' ye maruz kalan tüm genotiplerde olduğu görülmüştür (Şekil 4.2). Embriyogenik kalluslardaki prolin seviyesinin, in vitro koşullar altında NaCl konsantrasyonu ile yüksek derecede ilişkili olduğu ve en düşük prolin konsantrasyonunun, 0 mM NaCl' de olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.2). Test edilen prolin içeriği en güçlü tuz stresi koşulları altında, kontrol gruplarına göre 3,48 kat artış göstererek 3,87 nmol g⁻¹FW (200 mM NaCl) değerine ulaşmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

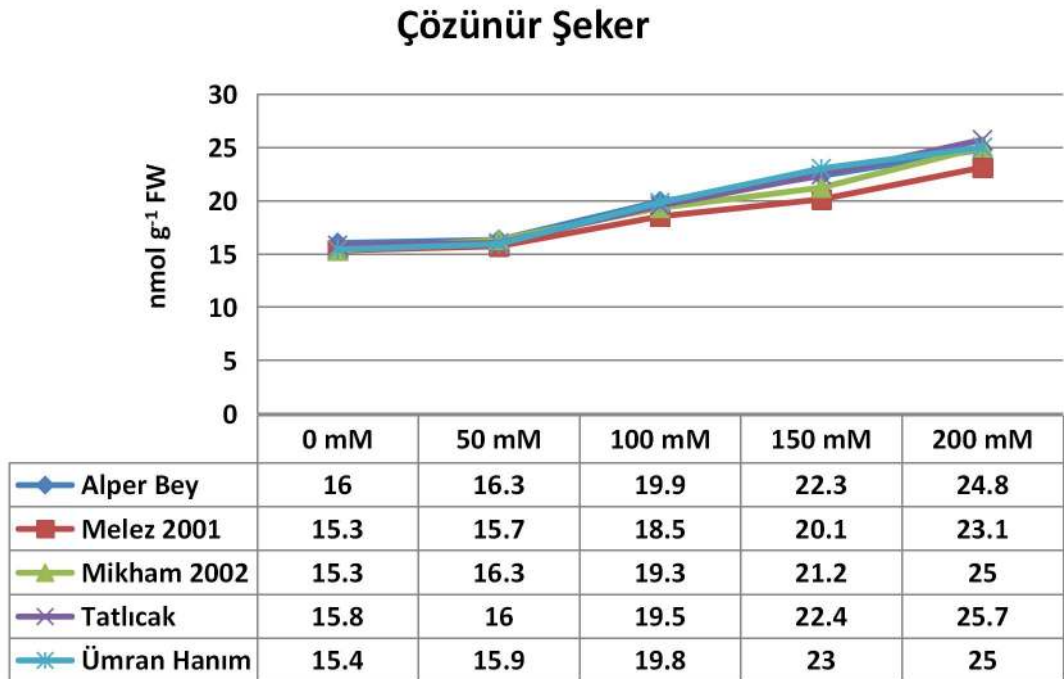


Şekil 4.2 İn vitro şartlarda tuz stresi ile muamele edilen beş tritikale genotipindeki prolin değişimleri.

Embriyogenik farklılaşma ayrıca, prolin ve çözünabilir şeker içerikleri gibi uygun çözünen maddelerin senteziyle tuz stresine karşı ozmotik düzenleme olduğunu göstermiştir (Patade et al. 2012). Yapılan çalışmada, patates ve kinoa' da diğerleri tarafından bildirildiği gibi, tritikaleye ait prolin içeriği ile NaCl arasında güçlü bir ilişki vardır (Ochatt et al. 1999; Hariadi et al. 2011). Prolin içeriğinin tuzluluk stresine karşı koruyucu etkileri olduğu gösterilmiştir (Ahmad et al. 2008). Sonuçlarımız aynı zamanda, test edilen tüm genotiplerin kontrol grubu embriyogenik farklılaşmasıyla karşılaştırıldığında, tuza dirençli embriyogenik farklılaşmada prolin içeriği birikiminde artış olduğunu göstermiştir. Embriyogenik kallus oluşumu prolin ile negatif yönde ilişkilidir ($R = -0,484$, $P < 0,001$). Kallusların embriyogenik kallus oluşumunda pozitif bir ilişki vardı ($R = 0,681$, $P < 0,001$). Prolin birikim seviyesi, büyüme azaldığında bile yükselmeye devam etmiştir. Benzer şekilde, Zhao et al. (2009), farklı tuz uygulamalarının mangrov *Thellungiella halophila*' da prolin seviyelerini arttırdığını bulmuşlardır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Tuzla muamele edilmiş kalluslarda kontrollere göre şeker birikiminde önemli değişiklikler gözlenmiştir. Tüm tritikale çeşitleri, in vitro kültürde benzer şeker birikimi sergilemiştir. Tritikale çeşitlerinin, in vitro ortamda tuz stresine kıyasla şeker seviyesi 15,3 ila 25,65 mg/g arasında değişmiştir. Tuz stresi ile muamele edildiğinde, kontrol bitkilerine kıyasla Tatlıcak' ta şeker birikimi yaklaşık iki kat artarak 15,76' dan 25,65 mg/g' a kadar yükselmiştir (Şekil 4.3). Tatlıcak çeşidine ait kalluslarda en yüksek oranda şeker birikimi görülmüş, ardından Ümran Hanım ve daha sonra Alper Bey gelmiştir. Tuzla muamele edilmiş kalluslardaki şeker birikimi, tuz konsantrasyonundaki artışla birlikte önemli ölçüde artmıştır. Tatlıcak' taki şeker içeriği, 200 mM tuz stresinde üst seviyeye ulaşarak, tuz stresi altındaki diğer genotiplerden daha yüksek olduğu görülmüştür. Kontrol grupları ile karşılaştırıldığında, test edilen tüm genotiplerin şeker içeriği, tuz stresi sonrası benzer artışlar göstermiştir.

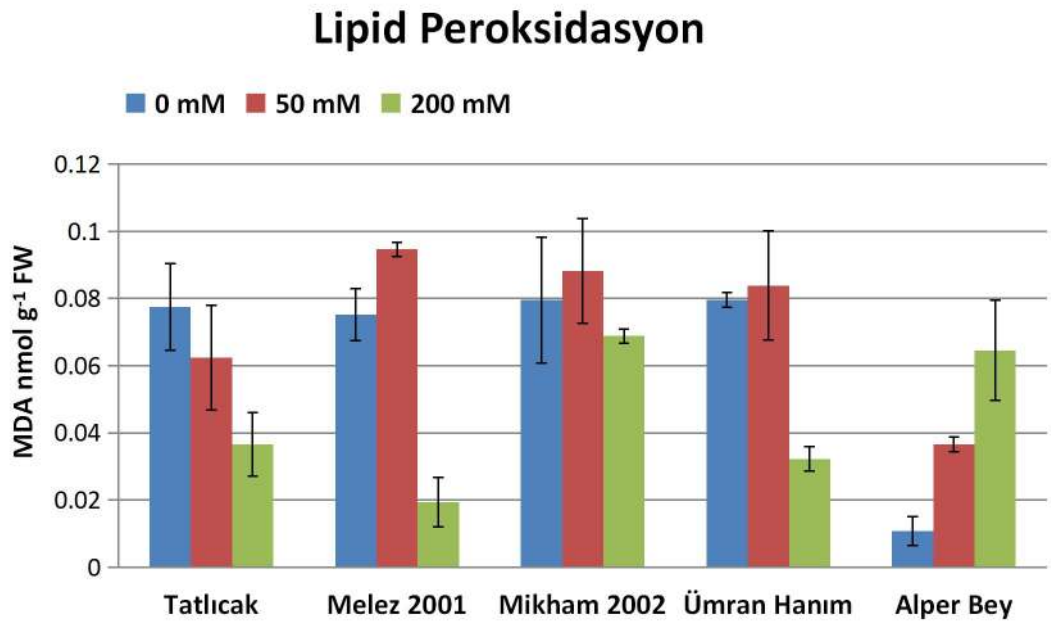


Şekil 4.3 İn vitro şartlarda tuz stresıyla muamele edilen beş tritikale genotipindeki çözünür şekerin değişimleri.

Tuz stresinin çözülebilir şeker biriktirme üzerindeki etkileri açıkça tuza dayanma kabiliyeti ile ilişkilidir. (Watanabe et al. 2000). Çözünebilir şeker ayrıca tuz stresi altındaki hücrenin ozmotik düzenlenmesini sağlar (Şekil 4.3). Lokhande et al. (2011),

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

200 mM NaCl ile muamele edildiğinde, *Sesuvium portulaca*’nın tuz stresli kalluslarının strese maruz kalmayan kalluslardan daha fazla şeker biriktirdiğini göstermiştir. Ayrıca, birçok üründe çözünür şekerlerin birikimi abiyotik strese karşı belgelendirilmiştir. Sonuçlarımız, en yüksek şeker seviyesinin, embriyogenik kallus oluşumuna katkıda bulunabilecek 200 mM NaCl ile muamele edilmiş grupta bulunduğunu göstermiştir. Dolayısıyla, bu özelliğin tritikale genotiplerinden türetilmiş embriyogenik kalluslarda etkili bir tuz direnci belirteci olduğu görülmüştür.

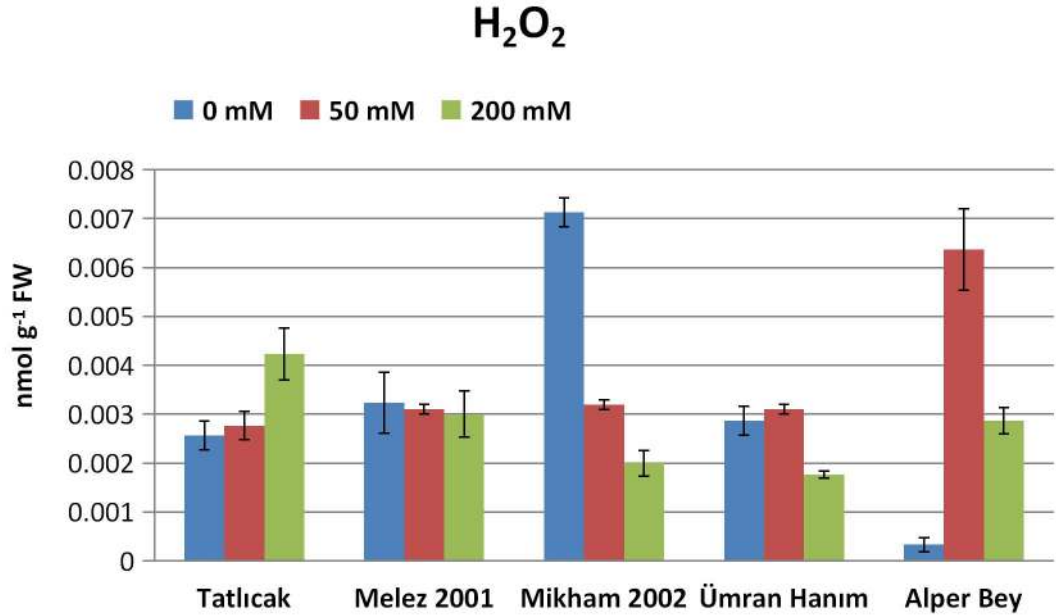


Şekil 4.4 İn vitro şartlarda farklı konsantrasyonlarda tuz stresi ile muamele edilen beş tritikale genotipindeki lipid peroksidasyon içeriği.

MDA lipid peroksidasyonunun sitotoksik bir ürünü olup serbest radikallerin ve bu nedenle de doku hasarının bir göstergesidir (Ohkawa et al. 1979). Bazı çalışmalar, tuz stresinin plazma membran lipidlerinin yapısında ve bileşiminde değişiklikler yarattığını göstermiştir (Mansour et al. 2005). Ancak, membran lipidlerinin doygunluğunun uyarlanabilir bir değere sahip olup olmadığı, lipid sınıfı ile tuz toleransı arasında bir korelasyon olup olmadığı veya tuzluluğun sadece olumsuz bir etkisi olup olmadığı açık değildir (Mansour and Salama 2004). Tuz stresine maruz kalan bitkilerin MDA içeriğinin arttığı birçok çalışmalarda bildirilmiştir (Gunes et al. 2007; Sekmen et al. 2007). Çalışmamızdaki beş tritikale genotipine ait embriyogenik kallus dokularında

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

lipid peroksidasyonundaki değişimler Şekil 4.4' de gösterilmiştir. Kademeli olarak NaCl konsantrasyonları (0, 50, 100 ve 200 mM NaCl) ile muamele edilen gruplar, kontrol grupları ile karşılaştırıldığında Tatlıcak genotipinde en yüksek MDA değeri kontrol grubunda gözlenirken artan tuz konsantrasyonu ile birlikte bu değerin azaldığı gözlenmiştir. Melez 2001, Mikham 2002 ve Ümran Hanım genotiplerinde en yüksek MDA değeri 50 mM NaCl konsantrasyonlarında gözlenirken kontrol grubundaki MDA değerinin 50 mM NaCl konsantrasyonuna göre biraz daha düşük olduğu ve en düşük değerin 200 mM NaCl konsantrasyonlarında olduğu görülmüştür. Alper Bey genotipinde ise kontrol grubuna kıyasla 50 mM ve 200 mM NaCl konsantrasyonlarında artış gözlenmiştir. Azevedo Neto et al. (2006), hassas mısır genotiplerinde lipid peroksidasyonun tuzlulukla arttığını bulmuşlardır. Gosset et al. (1994), tuz stresi uyguladıkları hassas pamuk çeşidindeki lipid peroksidasyonunun dayanıklı çeşitten daha fazla olduğunu belirtmişlerdir. Sonuçlarımız bu bulgularla paralellik göstermiş ve tuza duyalı çeşitlerdeki lipid peroksidasyonun tuza dayanıklı çeşitlerdekinden fazla olduğunu göstermiştir. Sonuçlarımızdaki farklılıkların embriyogenik kallusların farklı NaCl konsantrasyonlarında kısa süreli tutulması sebebiyle ortama tam adapte olamamasının bir göstergesi olabilir.



Şekil 4.5 İn vitro şartlarda farklı konsantrasyonlarda tuz stresi ile muamele edilen beş tritikale genotipindeki H₂O₂ miktarı.

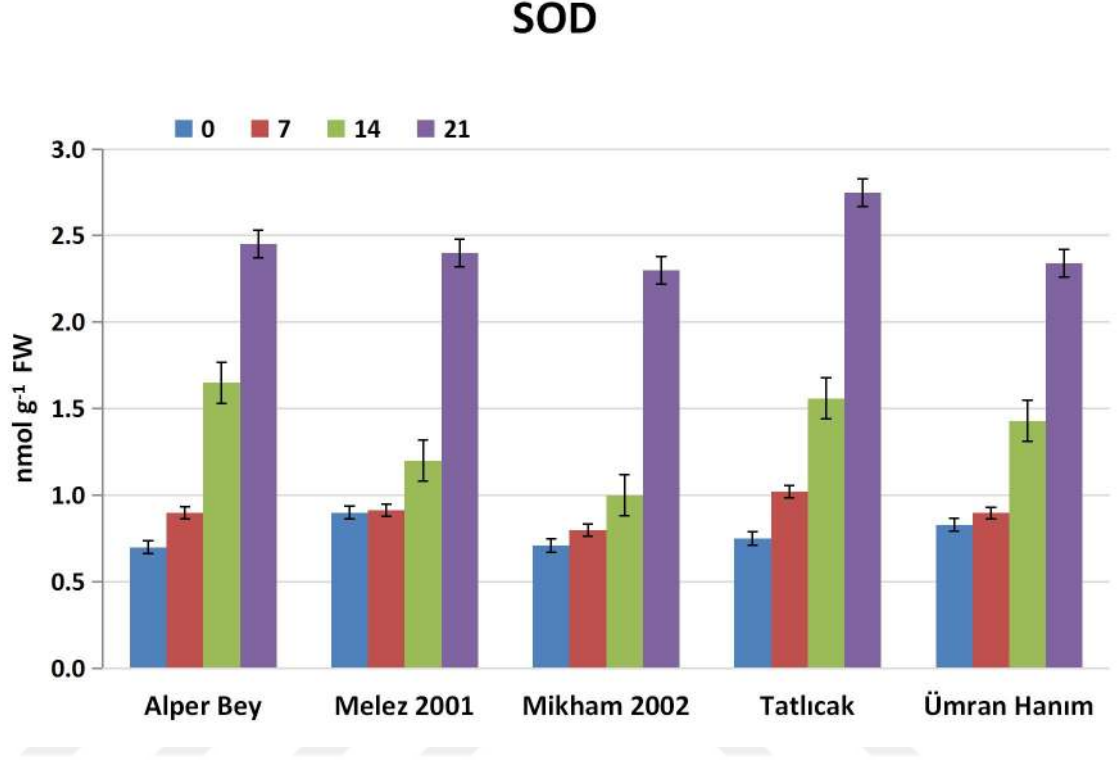
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

ROS' un bir çeşidi olan H_2O_2 ' in hücre bölünmesini arttırdığı ve sekonder hücre duvarının oluşumunu tetiklediği, bu sayede taze ağırlığı arttırabildiği düşünülmektedir (Potikha et al. 1999). Yapılan araştırmalarda tuz stresinin bitkilerde H_2O_2 miktarını arttırdığı bildirilmiştir (Neil et al. 2002; Yaşar 2003). Çalışmamızdaki farklı konsantrasyonlarda tuz stresine maruz bırakılan beş tritikale genotipindeki hidrojen peroksit miktarları incelendiğinde, kontrol bitkilerine göre 50 mM NaCl stresindeki genotiplerden Tatlıcak, Ümran Hanım ve Alper Bey' in H_2O_2 miktarının kontrol gruplarına göre arttığı, Melez 2001 ve Mikham 2002 genotiplerindeki H_2O_2 miktarlarının ise azaldığı gözlenmiştir. En yüksek H_2O_2 miktarının Alper Bey genotipinde olduğu belirlenmiştir. 200 mM NaCl stresi altındaki genotipler incelendiğinde kontrol gruplarına göre hidrojen peroksit miktarı Tatlıcak ve Alper Bey' de artarken, Melez 2001, Mikham 2002 ve Ümran Hanım' da azaldığı gözlenmiştir. 50 mM ve 200 mM NaCl stresi altındaki genotiplerin H_2O_2 miktarları karşılaştırıldığında Tatlıcak genotipinin H_2O_2 miktarının 200 mM NaCl stresinde 50 mM NaCl stresinden daha fazla olduğu, Melez 2001, Mikham 2002, Ümran Hanım ve Alper Bey' de ise daha az olduğu görülmüştür. Hameed et al. (2012), *Suaeda fruticosa*' da yapmış oldukları araştırmada NaCl uygulamasının H_2O_2 miktarını arttırdığı ve bu miktarların birbirlerine yakın değerler olduğunu bildirilmişlerdir. Sonuçlarımız, tuzluluk koşullarının çalıştığımız Tatlıcak, Ümran Hanım ve Alper Bey genotiplerinde oksidatif hasara yol açtığını ve Alper Bey' in tuzluluktan daha fazla etkilendiğini göstermektedir.

CAT, APX, SOD ve POX gibi antioksidan enzimlerin aktivitelerinin seviyeleri, 1 ay sonunda in vitro şartlarda 200 mM NaCl stresli embriyogenik kalluslarda araştırılmıştır. Test edilen enzim aktivitelerinin miktarı in vitro kültürün süresi ile artmıştır. SOD aktivitesi en yüksek Tatlıcak genotipinde görülürken, diğer tüm genotiplerde benzer değerlere sahip olduğu görülmüştür (Şekil 4.6). CAT aktivitesinin Mikham 2002' de diğer genotiplerden önemli ölçüde düşük olduğu ve Melez 2001' de de nispeten düşük olduğu gözlenirken, bu enzimin aktivitesinin 200 mM NaCl-stresli embriyogenik kalluslardaki diğer genotiplerde neredeyse aynı olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.7). Tuz ortamındaki APX aktivitesi Tatlıcak ve Alper Bey' de en yüksek, Ümran Hanım genotipinde de nispeten yüksek iken Melez 2001 ve Mikham 2002 genotipleri 200 mM NaCl-stresli embriyogenik kalluslarda daha düşük APX aktivitesine sahip olduğu görülmüştür (Şekil 4.8). POX aktivitesi Tatlıcak' ta en yüksek, Alper Bey'

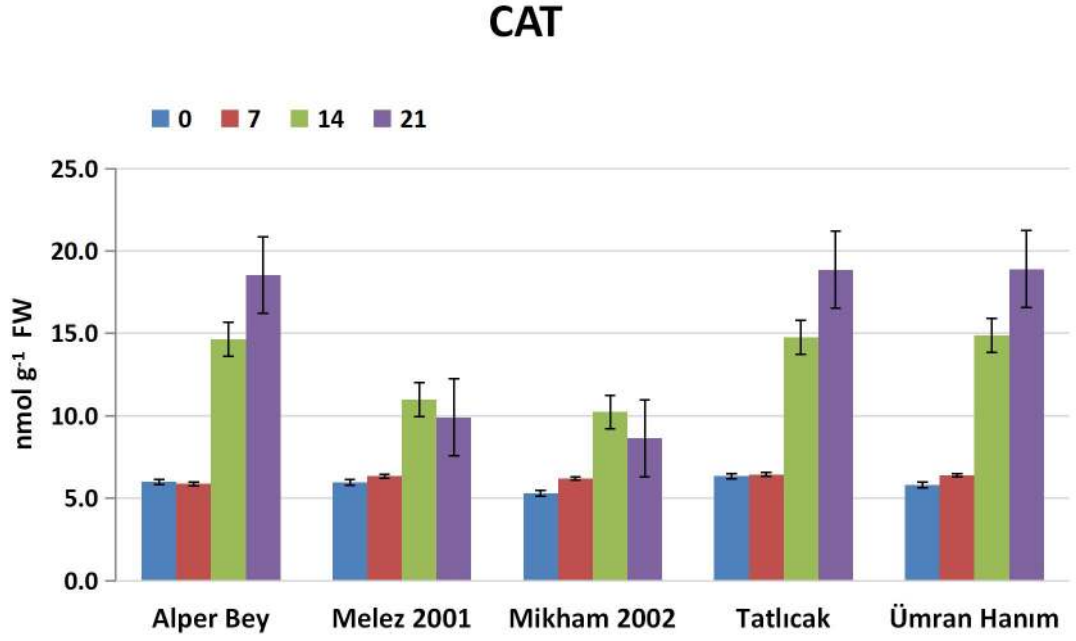
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

de nispeten yüksek görülürken diğer genotiplerde ise neredeyse aynı olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.9).



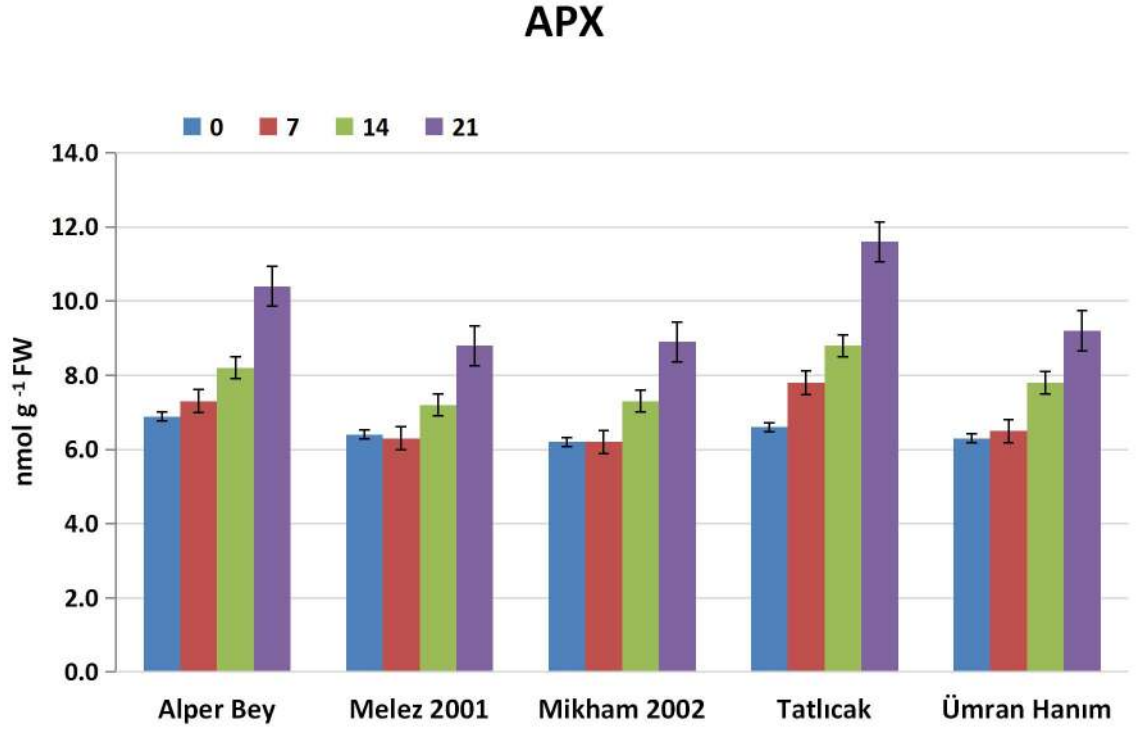
Şekil 4.6 İn vitro şartlarda tuz stresi ile muamele edilen beş tritikale genotipinin 0., 7., 14., ve 21. günlerdeki SOD aktivitesinde meydana gelen değişimleri.

Önceki çalışmalar, tuza toleranslı türlerin, stres koşullarında antioksidan enzim aktivitelerini arttırdığını göstermiştir (Thounaojam et al. 2012; Shen et al. 2013; Long et al. 2014). Furtana et al. (2010), *Cucumis sativus*' ta tuz stresi koşullarında SOD aktivitesinin arttığını göstermişlerdir. Bu çalışmada, tuz stresi çalışılan tüm genotiplerin embriyogenik kalluslarında SOD aktivitesi kademeli olarak artmıştır (Şekil 4.6). Tuz stresi altındaki buğday genotiplerinde, SOD aktivitesi açısından benzer bir cevap bulunmuştur (Sairam and Srivastava 2002). Bu sonuçlar hem tuzla muamele edilmiş hem de muamele edilmemiş koşullar altında tuz stresi ile SOD arasında anlamlı bir pozitif ilişki olduğunu göstermiştir. Tuza dirençli hatlardaki daha yüksek SOD aktivitesi, hücrelerin detoksifikasyonuna yardımcı olan daha iyi ROS temizleme kapasitesini yansıtmıştır.



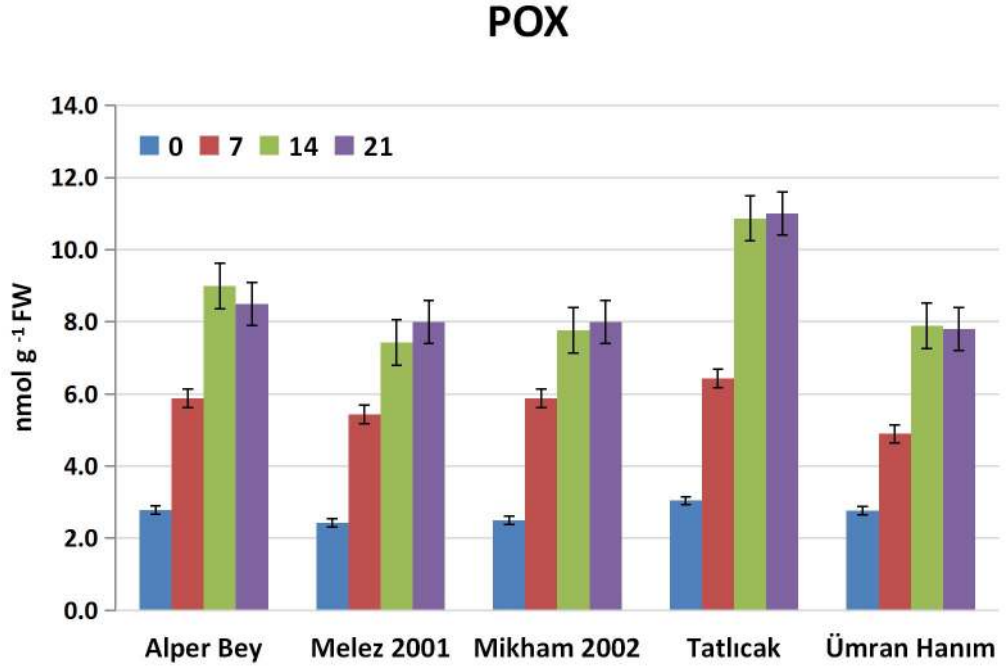
Şekil 4.7 İn vitro şartlarda tuz stresi ile muamele edilen beş tritikale genotipinin 0., 7., 14., ve 21. günlerdeki CAT aktivitesinde meydana gelen değişimleri.

CAT aktivitesi stresli embriyogenik kalluslar ve kontrol grubu kalluslar ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak artmıştır (Şekil 4.7), kallusların dokularının, artan tuz stresiyle birlikte H_2O_2 ' yi temizleme kapasitesinin artırılması gerektiğini öne sürmüştür. Furtana et al. (2010), *Cucumis sativus*' ta tuz stresi koşullarında CAT aktivitesinin arttığını göstermişlerdir. Sonuçlar, *Suaeda nudiflora* (Cherian and Reddy 2003) ve *Crithmum aritimum*' un (Amor et al. 2005) kallus kültürlerinde artan tuz stresi altında CAT aktivitesindeki azalmayı öneren raporlarla çelişmektedir.



Şekil 4.8 İn vitro şartlarda tuz stresi ile muamele edilen beş tritikale genotipinin 0., 7., 14., ve 21. günlerdeki APX aktivitesinde meydana gelen değişimleri.

APX aktivitesi, tuz stresi altındaki hem tuza toleranslı hem de tuza duyarlı çeşitlerde artmıştır. Tuza toleranslı bir tritikale çeşidinin, tuz stresi koşulları altında, tuza duyarlı çeşitten daha yüksek APX aktivitesine sahip olduğu gösterilmiştir (Şekil 4.8). Bu da APX aktivitesinin doğrudan tuz stresiyle ilişkili olduğunu gösteren önceki çalışmalarla uyumlu olduğunu göstermiştir (Santos et al. 2004; Sekmen ve arkadaşları, 2007).



Şekil 4.9 İn vitro şartlarda tuz stresi ile muamele edilen beş tritikale genotipinin 0., 7., 14., ve 21. günlerdeki POX aktivitesinde meydana gelen değişimleri.

Tuzlu ortamda çeltik yapraklarında (Lee et al. 2001) ve *Suaeda nudiflora*'nın kalluslarında (Cherian and Reddy 2003) POX enzim aktivitesinin arttığı belirlenmiştir. POX aktivitesi tuz stresi ile muamele edilen embriyogenik kalluslar ve kontrol grubu kalluslar karşılaştırıldığında hem tuza duyarlı hem de tuza dayanıklı genotiplerde artış gözlenmiştir (Şekil 4.9). Wang and Han (2009), tuz stresi altındaki yonca çeşitlerinden tuza dayanıklı olanların POX aktivitesinin daha yüksek olduğu ve tuza karşı tolerans geliştirebileceğini bildirmişlerdir. Benzer şekilde çalışmamızdaki tuza dayanıklı genotiplerdeki POX aktivitesinin tuza duyarlı genotiplerden daha yüksek olduğu görülmüştür.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu araştırmada Türkiye’ de ıslah programına alınan üç tritikale genotipinin ve iki adet farklı tritikale genotipinin in vitro koşullarda tuz stresine verdikleri yanıtlar belirlenmiştir. Ayrıca kallus ve embriyogenik kallusların uzun süre tuz stresine maruz bırakılmasıyla antioksidan enzim aktiviteleri, prolin ve çözülebilir karbon içerikleri belirlenmiştir. Kademeli olarak tuz stresine maruz bırakılan embriyogenik kallusların hidrojen peroksit miktarlarına ve lipid peroksidasyonlarına bakılmıştır.

Elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir:

- Embriyogenik kallusların hayatta kalma oranı, test edilmiş tritikale genotiplerini, Tatlıcak ve Ümran Hanım genotiplerinin tuza dayanıklı olanlar ve Mikham 2002 ve Melez 2001 genotiplerinin ise tuza duyarlı olanlar olarak sınıflandırılması imkânını sağlamıştır.
- Alper Bey, tuz stresine duyarlılık açısından orta düzeyde gözükmiştir. Bu nedenle, 200 mM tuz stresi indüksiyonu, tritikaledeki stres direnci çalışmalarında sıkı bir seçim süreci olarak düşünülebilir.
- Sonuçlar SOD, CAT, APX ve POX enzimlerin aktivitelerinde tuza dayanıklı genotiplerdeki aktivitelerin tuza duyarlı genotiplere göre daha yüksek olduğunu göstermiştir.
- Stresli kalluslardaki prolin ve çözünür şekerler yüksek NaCl konsantrasyonları ile ilişkilidir.
- Tuz stresi altındaki kalluslarda lipid peroksidasyonu tritikale çeşitlerine göre farklılık göstermiştir.
- Tuza duyarlı genotiplerde lipid peroksidasyonu tuza dayanıklı genotiplerden daha fazla görülmüştür.
- Zararlı reaktif oksijen türlerinden biri olan ve genelde stres koşullarında artan H₂O₂ miktarı, tuz stresi koşullarında tuza dayanıklı genotiplerde artarken, tuza duyarlı genotiplerde ise azalmıştır.
- Antioksidan enzimlerin tuz koşullarına verdiği tepkiler tritikaleye ait çeşitlerde farklılık göstermiştir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

- Sonuçlar ayrıca tuzun SOD, CAT, APX ve POX enzimlerinin aktivitelerini arttırdığını da göstermiştir. Bu in vitro seleksiyon yöntemi, tuz stresine dirençli tritikale embriyogenik kalluslarının seçilmesinde uygulamalar için büyük avantajlara sahiptir.
- İn vitro koşullarda embriyogenik kallus oluşumu için tritikale genotipleri arasındaki varyasyonlar, tuza dayanıklı genotipleri saptamanın alternatif ve hızlı bir yolu olarak kullanılabilir.

Öneriler

- Tritikalede yapılmış olan bu çalışma diğer tahıllar içinde in vitro koşullarda tuz stresinde seleksiyon çalışmaları içinde uygulanabilir.
- Yine laboratuvar koşullarında diğer stres kaynaklı seleksiyon için daha büyük sayıdaki örneklerin seçiminde hızlı bir yöntemdir.
- Tarla testlerinde meydana gelebilecek kontrol dışı hatalar bu şekilde önlenabilir.
- Bitki fizyolojik parametre analizlerinin daha güvenilir sonuçlar alınmasına olanak sağlamaktadır.

KAYNAKLAR

- Ábrahám, E., Rigó, G., Székely, G., Nagy, R., Koncz, C. and Szabados, L. 2003. Light-dependent induction of proline biosynthesis by abscisic acid and salt stress is inhibited by brassinosteroid in *Arabidopsis*. Plant Molecular Biology, 51: 363-372.
- Agastian, P., Kingsley, S.J. and Vivekanandan, M. 2000. Effect of salinity on photosynthesis and biochemical characteristics in mulberry genotypes. Photosynthetica 38, 287-290.
- Ahmad, P. and Jhon, R. 2005. Effect of Salt stress on growth and biochemical parameters of *Pisum sativum* L. Arch Agro Soil, 51(6): 665-672.
- Ahmad, P., Sharma, S. and Srivastava, P.S. 2006. Differential physio-biochemical responses of high yielding varieties of Mulberry (*Morus alba*) under alkalinity (Na_2CO_3) stress *in vitro*. Physiol Mol Biol plants, 12(1): 59-66.
- Ahmad, P., John, R., Sarwat, M. and Umar, S. 2008. Responses of proline, lipid peroxidation and antioxidative enzymes in two varieties of *Pisum sativum* L. under salt stress. Int J Plant Prod, 2: 353-366.
- Ahmad, P., Jhon, R., Sarwat, M. and Umar, S. 2008a. Responses of proline, lipid peroxidation and antioxidative enzymes in two varieties of *Pisum sativum* L. under salt stress. Int J Plant Product, 2(4): 353-366.
- Ahmad, P., Sarwat, M. and Sharma, S. 2008b. Reactive oxygen species, antioxidants and signaling in plants. J Plant Biol, 51(3): 167-173.
- Ahmad, P. and Sharma, S. 2010. Physio-biochemical attributes in two cultivars of mulberry (*M. alba*) under NaHCO_3 stress. Int J Plant Product, 4(2): 79-86.
- Ahmad, P., Jalcel, C.A., Salem, M.A., Nabi, G. and Sharma, S. 2010a. Roles of Enzymatic and non-enzymatic antioxidants in plants during abiotic stress. Crit Rev Biotechnol, 30(3): 161-175.
- Ahmad, P. and Umar, S. 2011. Oxidative stress: role of antioxidants in plants. Studium Press, New Delhi.

- Ahmad, P. and Prasad, M.N.V. 2012a. Environmental adaptations and stress tolerance in plants in the era of climate change. Springer Science+Business Media, New York.
- Alamgir, A.N.M. and Ali, M.Y. 1999. Effect of salinity on leaf pigments, sugar and protein concentrations and chloroplast ATPase activity of rice (*Oryza sativa* L.). Bangladesh J. Bot. 28, 145-149.
- AliDinar, H. M., Elbert, G. and Ludders, P. 1999. Growth, chlorophyll content, photosynthesis and water relations in guava (*Psidium guajava* L.) under salinity and different nitrogen supply. Gartenbauwissenschaft 64, 54–59.
- Almoguera, C., Coca, M.A. and Jouanin, L. 1995. Differential accumulation of sunflower tetra-ubiquitin mRNA during zygotic embryogenesis and developmental regulation of their heat shock response. Plant Physiol, 107: 765-773.
- Alscher, R.G., Erturk, N. and Heath, L.S. 2002. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. J Exp Bot, 53: 1331-1341.
- Amini, F. and Ehsanpour, A.A. 2005. Soluble proteins, proline, carbohydrates and Na⁺/K⁺ changes in two tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cultivars under *in vitro* salt stress. Am. J. Biochem & Biotech, 1(4): 204-208.
- Amini, F. and Ehsanpour, A.A. 2006. Response of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cultivars to MS, water agar and salt stress in *in vitro* culture. Asian J Plant Sci, 9: 170-175.
- Amor, N.B., Hamid, K.B., Debez, A., Grignon, C. and Abdelly, C. 2005. Physiological and antioxidant responses of the perennial halophyte *Crithmum maritimum* to salinity. Plant Sci, 168: 889- 899.
- Ananieva, E.A., Alexieva, V.S. and Popova, L.P. 2002. Treatment with salicylic acid decreases the effects of paraquat on photosynthesis. Journal of Plant Physiology, 159: 685-693.
- Asada, K. 1992. Ascorbate peroxidase a hydrogen peroxide scavenging enzyme in plants. Plant Physiol, 85: 235-241.

- Ashfaq, F., Iqbal, M., Khan, R. and Khan, N.A. 2014. Exogenously applied H₂O₂ promotes proline accumulation, water relations, photosynthetic efficiency and growth of wheat (*Triticum aestivum* L.) under salt stress, Annual Research & Review in Biology, 4(1): 105-120.
- Ashraf, M. 1994. Organic substances responsible for salt tolerance in *Eruca sativa*. Biol plant, 36: 255-259.
- Ashraf, M. and Harris, J.C. 2004. Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. Plant Sci, 166: 3-16.
- Azevedo Neto, A.D., Prisco, J.T., Eneás-Filho, J., Abreu, C.E.B. and Gomes-Filho, E. 2006. Effect of salt stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of salt-tolerant and salt-sensitive maize genotypes. Environmental and Experimental Botany, 56: 87-94.
- Azooz, M.M., Youssef, A.M. and Ahmad, P. 2011. Evaluation of salicylic acid (SA) application on growth, osmotic solutes and antioxidant enzyme activities on broad bean seedlings grown under diluted seawater. Inter J Plant physiol Biochem, 3: 253-264.
- Balatero, C.H., Darvey, N.L. and Luckett, D.J. 1995. Genetic analysis of anther culture response in 6x triticales. Theor Appl Genet, 90: 279-284.
- Bang, K.H., Kim, Y.C., Lim, J.Y., Kim, J.U., Lee, J.W., Kim, D.H., Kim, K.H. and Jo, I.H. 2015. Internal transcribed spacer barcoding DNA region coupled with high resolution melting analysis for authentication of *Panax* species. Korean J Med Crop Sci, 23: 439-445.
- Barakat, M.N. and Abdel-Latif, T.H. 1996. *In vitro* selection of wheat callus tolerant to high levels of salt and plant regeneration. Euphytica, 91: 127-140.
- Baum, M. and Lelley, T. 1988. A new method to procedure 4x triticales and their application in studying the development of a new polyploid plant. Plant Breeding, 100: 260-267.
- Bernard, S. and Bernard, M. 1987. Creating new forms 4x, 6x and 8x primary triticales associating both complete R and D genomes. Theor. Appl. Genet., 7: 55-59.
- Briggle, L.W. 1969. Triticale: A review. Crop Science, 9: 197-200.

- Bregitzer, P., Somers, D.A. and Rines, H.W. 1989. Development and characterization of friable, embryogenic oat callus. *Crop Sci*, 29: 798-803.
- Bueno, P., Piqueras, A., Kurepa, J., Savoure, A., Verbruggen, N., Montagu, V.M. and Inze, D. 1998. Expression of antioxidant enzymes in responses to abscisic acid and high osmoticum in tobacco BY-2 cell cultures. *Plant Sci*, 138: 27-34.
- Bhutta, W.M. 2011. Antioxidant activity of enzymatic system of two different wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars growing under salt stress. *Plant Soil Environ*, 57(3), 101-107, Pakistan.
- Büyük, İ., Soydam-Aydın, S. ve Aras S. 2012. Bitkilerin stres koşullarına verdiği moleküler cevaplar. *Trk Hij. Den. Biyol. Derg.*, 69(2) : 97-110.
- Carrasco-Ríos, L. and Pinto, M. 2014. Effect of salt stress on antioxidant enzymes and lipid peroxidation in leaves in two contrasting corn, 'Lluteņo' and 'Jubilee'. *Chilean J. Agric. Res.*, 74: 89-95.
- Chartzoulakis, K. and Klapaki, G. 2000. Response of two green house pepper hybrids to NaCl salinity during different growth stages. *Sci. Hortic.* 86, 247–260.
- Chen, L., Yin, H., Xu, J. and Liu, X. 2011. Enhanced antioxidative responses of a salt-resistant wheat cultivar facilitate its adaptation to salt stress. *African Journal of Biotechnology*, 10(74): 16887-16896, China.
- Cherian, S., Reddy, M.P. and Pandya, J.B. 1999. Studies on salt tolerance in *Avicennia marina* (Forst.) Vierh.: effect of NaCl salinity on growth, ion accumulation and enzyme activity. *Indian J. Plant Physiol.* 4, 266–270.
- Cherian, S. and Reddy, M.P. 2003. Evaluation of NaCl tolerance in the callus cultures of *Suaeda nudiflora* Moq. *Biol Plant*, 46: 193-198.
- Comba, M.E., Benavides, M.P. and Tomaro, M.L. 1998. Effect of salt stress on antioxidant defence system in soybean root nodules. *Aust J Plant Physiol*, 25: 665-671.
- Demirbas, S. 2011. *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. bitkisinde *Phelipanche ramosa* (L.) pomel parazitinin ve tuz stresinin neden olduğu fizyolojik, biyokimyasal ve gen ifadesi düzeyindeki değişimlerin araştırılması. Doktora Tezi, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Çanakkale.

- Demirbas, S. ve Balkan, A. 2018. Tuz stresi koşullarında bazı tritikale çeşitlerinin hidrojen peroksit ön uygulamasına tepkileri JOTAF/Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi, 15(2): 5-13.
- Dionisio-Sese, M.L. and Tobita, S. 2007. Antioxidant responses of rice seedlings to salinity stress. Plant Sci, 135: 1-9.
- Djukic, J.M., Stanisavljevic, N.R., Jovanovic, Z., Mikic, A. and Maksimovic, V. 2013. Differential response of three contrasting pea (*Pisum arvense*, *P. sativum* and *P. fulvum*) species to salt stress: assessment of variation in antioxidative defence and miRNA expression. Australian J Crop Sci, 7: 2145-2153.
- Duğan, S. 2010. Tritikalenin farklı toprak koşullarına uyum yeteneğinin belirlenmesi ve diğer serin iklim tahılları ile verim ve kalite yönünden karşılaştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tekirdağ.
- Elkahouia, S., Hernández, J.A., Abdelly, C., Ghrira, R. and Limama, F. 2005. Effects of salt on lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities of *Catharanthus roseus* suspension cells. Plant Sci, 168:607-613.
- Elmaghrabi, A.M., Ochatt, S., Rogers, H.J. and Francis, D. 2013. Enhanced tolerance to salinity following cellular acclimation to increasing NaCl levels in *Medicago truncatula* Plant Cell Tiss Organ Cult, 114: 61-70.
- Farooq, M.A., Saqib, Z.A. and Akhtar, J. 2015. Silicon-mediated oxidative stress tolerance and genetic variability in rice (*Oryza sativa* L.) grown under combined stress of salinity and boron toxicity. Turk J Agric For, 39: 718-729.
- Flowers, T.J. 2004. Improving crop salt tolerance. J.Exp. Bot., 55 (396): 307-19.
- Furtana, G.B. and Tıprıdamaz, R. 2010. Physiological and antioxidant response of three cultivars of cucumber (*Cucumis sativus* L.) to salinity. Turkish Journal of Biology, 34: 287-296.
- Gadallah, M.A.A. 1999. Effects of proline and glycine-betaine on *Vicia faba* response to salt stress. Biol. Plant. 42, 249-257.

- Gandonou, C.B., Errabii, T., Abrini, J., Mohamed, I. and Senhaji, N.S. 2006. Selection of callus cultures of sugarcane (*Saccharum* sp.) tolerant to NaCl and their response to salt stress. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 87: 9-16.
- Gechev, T.S., Breusegem, F.V., Stone, J.M., Denev, I. and Laloi, C. 2006. Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. *Bio Essays*, 28: 1091-1101.
- Ghadakchiasl, A., Mozafari, A. and Ghaderi, N. 2017. Mitigation by sodium nitroprusside of the effects of salinity on the morphophysiological and biochemical characteristics of *Rubus idaeus* under *in vitro* conditions. *Physiol Mol Biol Plants*, 23: 73-83.
- Gossett, D.R., Milhollon, E.P. and Lucas, M.C. 1994. Antioxidant response to NaCl stress in salt tolerant and salt sensitive cultivars of cotton. *Crop Sci*, 34: 706-714.
- Gueta-Dahan, Y., Yaniv, Z., Zilinskas, B.A. and Ben-Hayyim, G. 1997. Salt and oxidative stress: similar and specific responses and their relation to salt tolerance in citrus. *Planta*, 203: 460-469.
- Gunes, A., Inal, A., Bagci, E.G. and Pilbeam, D. 2007. Silicon-mediated changes of some physiological and enzymatic parameters symptomatic for oxidative stress in spinach and tomato grown in sodic-B toxic soil. *Plant and Soil*, 290: 79-102.
- Hameed, A., Hussain, T. and Gulzar, S. 2012. Salt tolerance of a cash crop halophyte *Suaeda fruticosa*: biochemical responses to salt and exogenous chemical treatments. *Acta Physiologiae Plantarum*, 34: 2331–2340.
- Hariadi, Y., Marandon, K., Tian, Y., Jacobsen, S.E. and Shabala, S. 2011. Ionic and osmotic relations in quinoa (*Chenopodium quinoa* Wild.) plants grown at various salinity levels. *J Exp Bot*, 62: 185-193.
- Hasanuzzaman, M., Nahar, K. and Fujita, M. 2013. Plant response to salt stress and role of exogenous protectants to mitigate salt-induced damages. Ahmad P., Azooz M. M., Prosod M.M.V (Eds.), in: *Ecophysiology and responses of plants under salt stress*, pp: 25-87.
- He, D.G., Tanner, G. and Scott, K. 1986. Somatic embryogenesis and morphogenesis in callus derived from the epiblast of immature embryos of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Sci*, 45: 19-24.

- He, S., Han, Y., Wang, Y., Zhai, H. and Liu, Q. 2009. In vitro selection and identification of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) plants tolerant to NaCl. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 96: 69-74.
- Hernandez, J.A., Olmos, E., Corpas, F.J., Sevilla, F. and del Rio, L.A. 1995. Salt-induced oxidative stress in chloroplasts of pea plants. *Plant Sci*, 105: 151-167.
- Hernandez, J.A., Campillo, A., Jimenez, A., Alacon, J.J. and Sevilla, F. 1999. Response of antioxidant systems and leaf water relations to NaCl stress in pea plants. *New Phytol*, 141: 241-251.
- Hernandez, J.A., Jimenez, A., Mullineaux, P. and Sevilla, F. 2000. Tolerance of pea (*Pisum sativum* L.) to long-term salt stress is associated with induction of antioxidant defences. *Plant Cell Environ*, 23: 853-862.
- Hussain, K., Majeed, A., Nawaz, K., Khizar, H.B. and Nisar, M.F. 2009. Effect of different levels of salinity on growth and ion contents of black seeds (*Nigella sativa* L.). *Curr Res J Biol Sci*, 1: 135-138.
- Immonen, S. 1996. Triticale breeding and synthesis applications of tissue culture. PhD, University of Helsinki, Helsinki, Finland.
- James, R.A., Blake, C., Byrt, C.S. and Munns, R. 2011. Major genes for Na⁺ exclusion, *Nax1* and *Nax2* (wheat *HKT1;4* and *HKT1;5*), decrease Na⁺ accumulation in bread wheat leaves under saline and water logged conditions. *J Exp Bot*, 8: 2939-2947.
- Jo, I.H., Bang, K.H., Hong, C.E., Kim, J.U., Lee, J.W., Kim, D.H., Hyun, D.Y., Ryu, H. and Kim, Y.C. 2016. Analysis of the chloroplast genome and SNP detection in a salt tolerant breeding line in Korean ginseng. *J Plant Biotechnol*, 43: 417-421.
- Johnson, S.M., Doherty, S.J., and Croy, R.R.D. 2003. Biphasic superoxide generation in potato tubers: a self amplifying response to stress. *Plant Physiology*, 13: 1440-1449.
- Kemble, A.R. and Macpherson, H.T. 1954. Sorbitol and proline as intracellular osmotic solutes in the green alga *Stichococcus bacillaris*. *Can J Bot*, 56: 676-679.
- Ketchum, R.E.B., Warren, R.C., Klima, L.J., Lopez-Gutierrez, F. and Nabors M.W. 1991. The mechanism and regulation of proline accumulation in suspension

- cultures of the halophytic grass *Distichlis spicata* L. J. Plant Physiol, 137: 368-374.
- Khan, M.A., Ungar, I.A. and Showalter, A.M. 1999. Effects of salinity on growth, ion content, and osmotic relations in *Halopyrum mocoronatum* (L.) Stapf. J. Plant Nutr, 22, 191-204.
- Khan, M.A. 2001. Experimental assessment of salinity tolerance of *Ceriops tagal* seedlings and saplings from the Indus delta, Pakistan. Aquat. Bot, 70, 259-268.
- Khedr, A.H.A. 2003. Proline induces the expression of salt-stressresponsive proteins and may improve the adaptation of *Panocratium maritimum* L. to salt stress. J Exp Bot, 54: 2553-2562.
- Kiss, A. 1966. Neue Richtung in der Triticale-Zuchtung. Z Pflanzenzuchtung, 55: 309-329, Germany.
- Koca, M., Bor, M., Ozdemir, F. and Turkan, I. 2007. The effect of salt stress on lipid peroxidation, antioxidative enzymes and proline content on sesame cultivars Environ Exp Bot, 60: 344-351.
- Koskeroglu, S. and Tuna, A.L. 2010. The investigation on accumulation levels of proline and stress parameters of the maize (*Zea mays* L.) plants under salt and water stress. Acta Physiol Plant, 32: 541-549.
- Koyro, H.W., Ahmad, P. and Geissler, N. 2012. Abiotic stress responses in plants: an overview. In: Ahmad P, Prasad MNV (eds). Environmental adaptations and stress tolerance of plants in the era of climate change. Springer Science + Business Media, 1-28, New York.
- Koyuncu, N. 2012. Bazı makarnalık buğday (*T. durum* Desf.) çeşitlerinin *in vitro* koşullarda yüksek tuz dozlarına tepkileri. Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi, 21(2): 70-74.
- Lechno, S., Zamski, E. and Telor, E. 1997. Salt stress-induced responses in cucumber plants. J plant Pysiol, 150(1-2): 206-211.
- Lee, D.H., Kim, T.S and 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: 737-745.

- Li, L. and Staden, J.V. 1998. Effect of plant growth regulators on the antioxidant system in callus of two maize cultivars subjected to water stress. *Plant Growth Regul*, 24: 55-66.
- Lokhande, V.H., Nikam, T.D. and Penna, S. 2010. Biochemical, physiological and growth changes in response to salinity in callus cultures of *Sesuvium portulacastrum* L. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 102: 17-25.
- Lokhande, V.H., Srivastava, S., Patade, V.Y., Dwivedi, S., Tripathi, R.D., Nikam, T.D. and Suprasanna, P. 2011. Investigation of arsenic accumulation and tolerance potential of *Sesuvium portulacastrum* (L.) L. *Chemosphere*, 82: 529-534.
- Lutts, S., Kinet, J.M. and Bouharmont, J. 1999. Improvement of rice callus regeneration in the presence of NaCl. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 57: 3-11.
- Mano, J. 2002. Early events in environmental stresses in plants, Induction mechanisms of oxidative stress, In: Inze D, van Montagu M (eds) *Oxidative stress in plants*. London, Taylor and Francis, 217-246.
- Mansour, M.M.F. and Salama, K.H.A. 2004. Cellular basis of salinity tolerance in plants. *Environmental and Experimental Botany*, 52: 113-122.
- Mansour, M.M.F., Salama, K.H.A., Ali, F.Z.M., and Abou Hadid, A.F. 2005. Cell and plant responses to NaCl in *Zea mays* L. Cultivars differing in salt tolerance. *General and Applied Plant Physiology*, 31: 29-41.
- Mantri, N., Patade, V., Penna, S., Ford, R. and Pang, E. 2012. Abiotic stress responses in plants: Present and future in *Abiotic Stress Responses in Plants: Metabolism, Productivity and Sustainability*, eds Ahmad P., Prasad M. N. V., editors, 1-19.10.4236. New York, NY.
- Masood, A., Shah, N.A., Zeeshan, M. and Abraham, G. 2006. Differential response of antioxidant enzymes to salinity stress in two varieties of *Azolla* (*Azolla pinnata* and *Azolla tilieuloides*). *Env. Exp. Bot.*, 58, 216-222.
- Meloni, D.A., Oliva, M.A., Ruiz, H.A. and Martinez, C.A. 2001. Contribution of proline and inorganic solutes to osmotic adjustment in cotton under salt stress. *J. Plant Nutr*, 24, 599-612.

- Mc Cue, K.F. and Hanson, A.D. 1990. Salt-inducible betaine aldehyde dehydrogenase from sugar beet: cDNA cloning and expression. *Trends Biotechnol*, 8: 358-362.
- Mishra, A. and Choudhuri, M.A. 1999. Effects of salicylic acid on heavy metal-induced membrane deterioration mediated by lipoxygenase in rice. *Biologia Plantarum*, 42: 409-415.
- Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 7: 405-410.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery M. and Van Breusegem, F. 2004. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science*, 9: 490-498.
- Morales, M.A., Sancho-Blanco, M.J., Olmos, E., Torrecillas, A. and Alarcon, J.J. 1998. Changes in the growth, leaf water relations and all ultrastructure in *Argyranthemum coronopifolium* plants under saline conditions. *J. Plant Physiol*, 153, 174-180.
- Murakeozy, E.P., Nagy, Z., Duhaze, C., Bouchereau, A. and Tuba, Z. 2003. Seasonal changes in the levels of compatible osmolytes in three halophytic species of inland saline vegetation in Hungary. *J. Plant Physiol*, 160: 395-401.
- Muthukumarasamy, M., Gupta, S.D. and Pannerselvam, R. 2000. Enhancement of peroxidase, polyphenol oxidase and superoxide dismutase activities by triadimefon in NaCl stressed *Raphanus sativus* L. *Biol. Plant.*, 43, 317–320.
- Müntzing, A. 1939. Studies on the properties and the ways of production of rye-wheat amphidiploids. *Hereditas*, 25: 387-430.
- Nabors, M.W., Gibbs, G.E., Bernstein, C.S. and Meis M.E. 1980. NaCl tolerant tobacco plants from cultured cells. *Z Pflanzenphysiol*, 97: 13-17.
- Naqvi, S.M.S., Yasmin, T., Rashid, H., Chaudary, Z. and Qureshi, A. 2002. Callus induction from seeds of *Zea mays* var. EV-2097. *Pakistan J Biol Sci*, 5: 956-958.
- Nawaz, M.F., Gul, S., Tanvir, M.A., Akhtar, J., Chaudary, S. and Ahmad, I. 2016. Influence of NaCl-salinity on Pb-uptake behavior and growth of River Red gum tree (*Eucalyptus camaldulensis* Dehnh.). *Turk J Agric For*, 40: 425-432.
- Neil, S., Desikan, R. and Hancock, J. 2002. Hydrogen peroxide signalling. *Current Opinion in Plant Biology*, 5: 388-395.

- Noctor, G., and Foyer, C. 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49: 249-279.
- Nuriyeva, S., Akparov, Z., Hajiyeve, E., Abbasov, M. and Sharma, R.C. 2016. Evaluation of wheat genetic resources of Azerbaijan on normal and saline fields. *Turk J Agric For*, 40: 186-193.
- Ochatt, S.J., Marconi, P.L., Radice, S., Arnozis, P.A. and Caso, O.H. 1999. In vitro recurrent selection of potato: production and characterization of salt tolerant cell lines and plants. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 55: 1-8.
- Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yagi, K. 1979. Assay for lipid peroxidation in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem*, 95: 351.
- O'Mara, J.G. 1953. The cytogenetics of Triticale. *Bot. Rev.*, 19: 587-605.
- Özgen, M., Türet, M., Özcan, S. and Sancak, C. 1996. Callus induction and plant regeneration from immature and mature embryos of winter durum wheat genotypes. *Plant Breeding*, 115: 455-458.
- Pareek, A., Sopory, S. K., Bohnert, H. J. and Govindjee 2010. Abiotic stress adaptation in plants. *Physiological, Molecular and Genomic Foundation*, 10,1007 / 978-90-481-3112-9, Berlin.
- Parida, A., Das, A.B. and Das, P. 2002. NaCl stress causes changes in photosynthetic pigments, proteins and other metabolic components in the leaves of a true mangrove, *Bruguiera parviflora*, in hydroponic cultures. *J. Plant Biol*, 45, 28–36.
- Parida, A. K. and Das, A. B. 2005. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 60, 324-349.
- Patade, V.Y., Bhargava, S. and Suprasanna, P. 2012. Halopriming mediated salt and iso-osmotic PEG stress tolerance and gene expression profiling in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). *Mol Biol Rep*, 39: 9563-9572.
- Piowarczyk, B., Tokarz, K. and Kamińska, I. 2016. Responses of grass pea seedlings to salinity stress in in vitro culture conditions. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 124: 227-240.

- Potikha, T.S., Collins, C.C., Johnson, D.I., Delmer, D.P. and Levine, A. 1999. The involvement of hydrogen peroxide in the differentiation of secondary walls in cotton fibers. *Plant Physiol*, 119: 849-858.
- Pouya, A.K. 2015. Changes in activities of antioxidant enzymes and photosynthetic attributes in triticale (*x Triticosecale Wittmack*) genotypes in response to long-term salt stress at two distinct growth stages. *Acta Physiologiae Plantarum*, 37-72, Iran.
- Prakash, S.N. and Jack, M.W. 1993. Comparison of tissue culture and whole plant responses to salinity in potato. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 33: 273-280.
- Rahnama, A., James, R.A., Poustini, K. and Munns, R. 2010. Stomatal conductance as a screen for osmotic stress tolerance in durum wheat growing in saline soil. *Funct Plant Biol*, 37: 255-263.
- Rai, M.K., Kalia, R.K., Singh, R., Gangola, M.P. and Dhawan, A.K. 2011. Developing stress tolerant plants through in vitro selection — an overview of the recent progress *Env Exp Bot*, 71: 89-98.
- Rashid, H., Ghani, R.A., Chaudhry, Z., Naqvi, S.M.S. and Quraishi, A. 2002. Effects of media, growth regulators and genotypes on callus induction and regeneration in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Biotechnology*, 1: 46-54.
- Rhoades, G. 1998. *Managed professionals: unionized faculty and restructuring academic labor*. State University of New York Press, Albany.
- Richards, R.A. 1996. Defining selection criteria to improve yield under drought. *Plant Growth Reg*, 20: 157-166.
- Romeroaranda, R., Soria, T. and Cuartero, J. 2001. Tomato plant-water uptake and plant-water relationships under saline growth conditions. *Plant Sci*, 160, 265-272.
- Rozema, J. and Flowers, T. 2008. Ecology: crops for a salinized world. *Science*, 322: 1478-1480.
- Sairam, R.K. and Srivastava, G.C. 2002. Changes in antioxidant activity in sub cellular fractions of tolerant and susceptible wheat genotypes in response to long-term salt stress. *Plant Sci*, 162: 897-904.

- Santos, I., Fidalgo, F., Almeida, C.M. and Salema, R. 2004. Biochemical and ultra structural changes in leaves of potato plants grown under supplementary UV-B radiation. *Plant Sci*, 167: 925-935.
- Sekmen, A.H., Turkan, I. and Takio, S. 2007. Differential in responses of antioxidative enzymes and lipid peroxidation to salt stres in salt-tolerant *Plantago maritima* and salt sensitive *Plantago media*. *Physiologia Plantarum*, 131: 399-411.
- Semiz, G.D. and Suarez, D.L. 2015. Tomato salt tolerance: impact of grafting and water composition on yield and ion relations. *Turk J Agric For*, 39: 876-886.
- Shi, Q.H. and Zhu, Z.J. 2008. Effects of exogenous salicylic acid on manganese toxicity, element contents and antioxidative system in cucumber. *Environ Exp Bot*, 63: 317-326.
- Soleimani, Z., Afshar, A.S. and Nematpour, F.S. 2015. Responses of antioxidant gene and enzymes to salinity stress in the *Cuminum cyminum* L. *Russ J Plant Physiol*, 64: 361-367.
- Sudhakar, C., Lakshmi, A. and Giridara Kumar, S. 2001. Changes in the antioxidant enzyme efficacy in two high yielding genotypes of mulberry (*Morus alba* L.) under NaCl salinity. *Plant Sci*, 161: 613-619.
- Szabolcs, I. 1994. Soil salinization. In: Pessarakli M (ed) *Handbook of plant crop stres*. Mercel Dekker, 3-11, New York.
- Takemura, T., Hanagata, N., Sugihara, K., Baba, S., Karube, I. and Dubinsky, Z. 2000. Physiological and biochemical responses to salt stress in the mangrove, *Bruguiera gymnorrhiza*. *Aquat. Bot.*, 68, 15-28.
- Troncoso, A., Matte, C., Cantos, M. and Lavee, S. 1999. Evaluation of salt tolerance of *invitro*-grown grape vine root stock varieties. *Vitis*, 38: 55-60.
- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M. and Mazur, M. 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *ChemBiol Interact*, 160: 1-40.
- Verniquet, F., Gaillard, J., Neuburger, M. and Douce, R. 1991. Rapid inactivation of plant aconitase by hydrogen peroxide. *Biochem J*, 276: 643-648.

- Wang, X. and Han, J. 2009. Changes of proline content, activity, and active isoforms of antioxidative enzymes in two alfalfa cultivars under salt stress. *Agricultural Sciences in China*, 8(4): 432-440.
- Wang, Y. and Nil, N. 2000. Changes in chlorophyll, ribulose biphosphate carboxylase–oxygenase, glycine betaine content, photosynthesis and transpiration in *Amaranthus tricolor* leaves during salt stress. *J. Hortic. Sci. Biotechnol*, 75, 623-627.
- Watanabe, S., Kojima, K.Y. and Sasaki, S. 2000. Effects of saline and osmotic stress on proline and sugar accumulation in *Populus euphratica* *in vitro*. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 63: 199-206.
- Willekens, H., Inze, D., Van Montagu, M. and Van Camp, W. 1995. Catalases in plants. *Mol Breed*, 1: 207-228.
- Yang, A.F., Duan, X.G., Gu, X.F., Gao, F. and Zhang, J.R. 2005. Efficient transformation of beet (*Beta vulgaris*) and production of plants with improved salt-tolerance. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 83: 259- 270.
- Yağmur, M., and Kaydan, D. 2008. All eviation of osmotic stress of water and salt in germination and seedling growth of triticale with seed priming treatments. *African Journal of Biotechnolgy*, 7(13): 2156-216.
- Yaşar, F. 2003. Tuz stresi altındaki patlıcan genotiplerinde bazı antioksidant enzim aktivitelerinin in vitro ve in vivo olarak incelenmesi. Doktora Tezi, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Van.
- Yılmaz, E., Tuna, A. L. ve Bürün, B. 2011. Bitkilerin tuz stresi etkilerine karşı geliştirdikleri tolerans stratejileri. *C.B.Ü. Fen Bilimleri Dergisi*, 7(1): 47–66.
- Zhao, X., Tan, H.J, Liu, Y.B., Li, X.R. and Chen, G.X. 2009. Effect of salt stress on growth and osmotic regulation in *Thellungiella* and *Arabidopsis* callus. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 98: 97-103.
- Zimny, J., Becker, D., Brettschneider, R. and Lörz, H. 1995. Fertile, transgenic *Triticale* (x *Triticosecale* Wittmack). *Mol Breeding*, 1: 155-164.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

İsim- Soy İsim : Serap KARAMAN
Uyruğu : T.C.
Doğum Tarihi ve Yeri : 10.07.1993 / Tatvan
Medeni Hali : Bekar
Telefon : +90 (533) 506 3993
E mail : serap.krmn11@gmail.com

Eğitim

Derece	Üniversite	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	Erzurum Teknik Üniversitesi - Natioanal Chung Hsing Üniversitesi	2019
Lisans	Erzurum Teknik Üniversitesi	2016
Lise	Tatvan Anadolu Lisesi	2011