



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**GAMA RADYASYONU İLE TUZA TOLERANSLI TÛTÛN
(*Nicotiana tabacum* L.) MUTANTLARININ ELDESİ VE
SELEKSİYONU**

Özge ÇELİK

**Biyoloji Anabilim Dalı
Radyobiyoloji Programı**

Danışman

Prof.Dr. Yavuz ÇOTUK

Ağustos, 2010

İSTANBUL



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**GAMA RADYASYONU İLE TUZA TOLERANSLI TÛTÛN
(*Nicotiana tabacum* L.) MUTANTLARININ ELDESİ VE
SELEKSİYONU**

ÖZGE ÇELİK

**Biyoloji Anabilim Dalı
Radyobiyoloji Programı**

**Danışman
Prof.Dr. Yavuz ÇOTUK**

Ağustos, 2010

İSTANBUL

Bu çalışma/....../ 2010 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından
Anabilim Dalı programında Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Prof. Dr. Yavuz ÇOTUK (Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

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

Prof. Dr. Nermin GÖZÜKIRMIZI
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Leyla AÇIK
Gazi Üniversitesi
Fen-Edebiyat Fakültesi

Yrd. Doç. Dr. Sema ALİKAMANOĞLU
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin T2130 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Akademik hayatıma başladığım günden beri, bilgi ve deneyimleriyle her zaman yanımda olan çok değerli hocam Sayın Prof.Dr.Çimen ATAK'a sonsuz teşekkürlerini sunarım.

Tez çalışmamı gerçekleştirmem için gerekli olanağı sağlayan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Yavuz ÇOTUK'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam sırasında bana her türlü desteği sunan çok kıymetli hocam, İstanbul Kültür Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Dekanı ve Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Atilla ÖZALPAN'a ve Gazi Üniversitesi Biyoloji Bölümü öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Leyla AÇIK'a teşekkürlerimi sunuyorum.

Ayrıca, bu çok uzun yolda benden karşılıksız sevgi ve desteklerini esirgemeyen ve her zaman yanımda olduklarını hissettirerek manevi destek aldığım aileme ve sevgili eşim Op. Dr. Caner ÇELİK'e kalpten sevgilerimi ve teşekkürlerimi sunarım.

Ağustos, 2010

Özge ÇELİK

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİL LİSTESİ	viii
TABLO LİSTESİ.....	xi
ÖZET	xiii
SUMMARY.....	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR	3
2.1. STRES KAVRAMI	3
2.2. OKSİDATİF STRES.....	3
2.3. TUZ STRESİ	8
2.4. TUZ STRESİNİN BİTKİ BÜYÜME VE GELİŞMESİNE ETKİSİ.....	9
2.5. TUZ TOLERANSI.....	12
2.6. TUZ TOLERANSINI ARTTIRAN BİYOKİMYASAL VE MOLEKÜLER STRATEJİLER.....	12
2.6.1. Tuz Regülasyonunun Diğer Mekanizmaları	21
2.6.2. Prolin.....	21
2.7. TÜTÜN.....	23
2.7.1. İzmir Özbaş.....	27
2.7.2. Akhisar 97.....	29
2.8. MUTAJENİK RADYASYON.....	30
2.8.1. Mutasyon Islahı.....	34
2.9. GENETİK MARKIRLAR.....	38
2.9.1. Morfolojik Markırlar.....	38
2.9.2. Moleküler Markırlar.....	38

3. MALZEME VE YÖNTEM	41
3.1.İŞINLAMA ÖN ÇALIŞMALARİ.....	41
3.1.1.Gama Işımları ile LD₃₀, LD₅₀, GR₃₀ ve GR₅₀ Dozlarının Belirlenmesi.....	41
3.1.1.1.Tohumların Nem İçeriğinin Belirlenmesi.....	41
3.1.1.2.Işınlama.....	41
3.1.1.3.Tohumların In vitro Çimlendirilmesi.....	41
3.1.1.3.1. Yüzey Sterilizasyonu.....	41
3.1.1.3.2.Tütün Tohumlarının Çimlenmesi İçin Kullanılan Besiyeri.....	42
3.2. GAMA RADYASYONU İLE TOHUMLARIN İŞINLANMASI VE M₁ VE M₂ GENERASYONUNUN ELDESİ.....	42
3.2.1.Tohumların Işınlanması ve Denemenin Kurulması.....	42
3.2.2.Tarla Denemesi.....	42
3.2.3.Tütün Yapraklarının Kırımı.....	43
3.3. ŞEKER VE NİKOTİN MİKTARLARININ TAYİNİ.....	44
3.3.1. Tütünde İndirgen Şeker Miktarının Ölçülmesi.....	44
3.3.2. Tütünde Nikotin Miktarının Ölçülmesi.....	44
3.4. M₁ GENERASYONUNDAHASAT VE M₂ GENERASYONU İÇİN HAZIRLIK.....	44
3.5. M₂ GENERASYONUNUN TARLAYA EKİMİ.....	45
3.6. IN VITRO VE IN VIVO TUZLULUK ÇALIŞMALARİ.....	45
3.6.1. In Vitro Tuzluluk Denemesinin Kurulması.....	45
3.6.2. In Vivo Tuzluluk Denemesinin Kurulması.....	45
3.6.3. Morfolojik Zararların Belirlenmesi.....	46
3.7. BİYOKİMYASAL ANALİZLER.....	47
3.7.1. Fotosentetik Pigmentlerin Miktarlarının Belirlenmesi.....	47
3.7.2. Lipid Peroksidasyon Miktarının Belirlenmesi.....	47
3.7.3. Antioksidant Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi.....	48
3.7.3.1. Enzim Ekstraktlarının Hazırlanması.....	48
3.7.3.2. Total Protein Miktarının Belirlenmesi.....	48
3.7.3.3. Süperoksit Dismutaz Enziminin Aktivitesinin Belirlenmesi.....	48
3.7.3.4. Katalaz Enziminin Aktivitesinin Belirlenmesi.....	49

3.7.3.5. Guaiakol Peroksidaz Enziminin Aktivitesinin Belirlenmesi.....	49
3.7.3.6. Askorbat Peroksidaz Enziminin Aktivitesinin Belirlenmesi.....	50
3.7.3.7. Glutasyon Redüktaz Enziminin Aktivitesinin Belirlenmesi.....	50
3.7.3.8. Prolin Analizi.....	50
3.7.3.8.1. Standart Eğri Oluşturulması.....	50
3.7.3.8.2. Serbest Prolin Miktarının Ölçülmesi.....	51
3.8. TUZA TOLERANSLI FİDELERİN M₃ SELEKSİYONU.....	52
3.8.1. In Vitro Seleksiyon.....	52
3.9. TUZA TOLERANSLI OLARAK BELİRLENEN MUTANT BİTKİLERİN IN VITRO KOŞULLARDA KONTROLÜ.....	53
3.10. MUTANT BİTKİLERİN GLUTATYON REDÜKTAZ ENZİM AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ.....	53
3.11. MOLEKÜLER ANALİZLER.....	53
3.11.1. Bitki Materyalinin Eldesi.....	53
3.11.2. Genomik DNA İzolasyonu.....	53
3.11.3. Genomik DNA Analizi.....	54
3.11.3.1. Spektral Analiz.....	54
3.11.3.2. RAPD Analizinde Kullanılan Primerler ve Özellikleri.....	54
3.11.4. PZR Uygulaması.....	55
3.11.4.1. Agaroz Jel Elektroforezi ve Görüntüleme.....	55
3.11.4.2. Polimorfizmin Belirlenmesi.....	56
3.12. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER.....	56
4. BULGULAR	57
4.1. TÜTÜN (<i>Nicotiana tabacum</i> L.) ÇEŞİTLERİNE GAMA RADYASYONUN ETKİSİ.....	57
4.1.1. Radyasyon Hassasiyetinin Belirlenmesi.....	57
4.1.2. Tarla Denemesi (M ₁ Generasyonu).....	66
4.2. M₂ GENERASYONUNA AİT BULGULAR.....	72
4.3. IN VITRO TUZ DOZ DENEMESİNDEN ELDE EDİLEN BULGULAR.....	73
4.4. IN VITRO TUZ DOZ DENEMESİNDE BİYOKİMYASAL ANALİZLERDEN ELDE EDİLEN BULGULAR.....	77

4.4.1. Fotosentetik Pigmentler.....	77
4.4.2. Total Protein Analizi.....	79
4.4.3. Lipid Peroksidasyon Analizi.....	81
4.4.4. Antioksidant Enzim Aktiviteleri.....	83
4.5. <i>IN VIVO</i> TUZ DOZ DENEMESİNDE BİYOKİMYASAL	
ANALİZLERDEN ELDE EDİLEN BULGULAR.....	91
4.5.1. Fotosentetik Pigmentler.....	91
4.5.2. Total Protein Analizi.....	93
4.5.3. Lipid Peroksidasyon Analizi.....	95
4.5.4. Antioksidant Enzim Aktivitesi.....	96
4.5.5. Prolin Konsantrasyonu.....	104
4.6. MORFOLOJİK ZARARLANMA DEĞERLENDİRİLMESİ.....	111
4.7. TUZLULUĞA TOLERANSLI MUTANT BİTKİ SELEKSİYONUNA AİT	
BULGULAR.....	112
4.8. TUZ MUTANTLARININ GLUTATYON REDÜKTAZ (GR) ENZİM	
AKTİVİTELERİ.....	114
4.9. GENOMİK DNA İZOLASYONU VE ANALİZİ.....	115
4.9.1. Genomik DNA Amplifikasyonu.....	116
4.9.2. PZR Ürünlerinin Gözlenmesi.....	116
4.9.3. Primerlere Ait Amplifikasyon Sonuçlarının Değerlendirilmesi....	118
4.9.4. Genetik Uzaklığın Hesaplanması.....	119
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	122
KAYNAKLAR	136
ÖZGEÇMİŞ	157

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.1	:Hidrojen peroksitin regülasyonu, uzaklaştırılması ve hücrel etkileri.....	4
Şekil 1.2	:Bitkilerde ROS'ların uzaklaştırılmasındaki ana hücrel yollar	7
Şekil 2.1	:MAP kinaz sinyalleri	17
Şekil 2.2	:Sürgünlerden Na ⁺ atılmasında karakterize edilmiş olan iyon taşıyıcıları, kanallar ve pompalar	19
Şekil 2.3	:Tuz stresi varlığında iyon dengesinin regülasyonunda SOS yolu.....	20
Şekil 2.4	:Tütün bitkisinde olgunlaşma	26
Şekil 2.5	:İzmir Özbaş tütün (<i>Nicotiana tabacum</i> L.) çeşidine ait bitkilerin yapraklarının genel görünümü.....	28
Şekil 2.6	:İzmir Özbaş (<i>Nicotiana tabacum</i> L.) çeşidine ait tütün bitkisinin genel görünümü.....	28
Şekil 2.7	:Akhisar 97 tütün (<i>Nicotiana tabacum</i> L.) çeşidine ait bitkilerin yapraklarının genel görünümü.....	29
Şekil 2.8	:Akhisar 97 (<i>Nicotiana tabacum</i> L.) çeşidine ait tütün bitkisinin genel görünümü	30
Şekil 3.1	:Gama radyasyonu ile ışınlanan Akhisar 97 ve İzmir Özbaş tütün (<i>Nicotiana tabacum</i> L.) çeşitlerine ait tohumların fide üretimi için yastıklarda çimlendirilmesi	43
Şekil 3.2	:Prolin standart eğrisi.....	51
Şekil 4.1	:Akhisar 97 tütün çeşidine ait fidelerde gama radyasyonun etkisi	61
Şekil 4.2	:İzmir Özbaş tütün çeşidine ait fidelerde gama radyasyonun etkisi	62
Şekil 4.3	:İzmir Özbaş tütün çeşidine uygulanan gama radyasyon dozu ve sağ kalım arasındaki ilişki.....	63
Şekil 4.4	:İzmir Özbaş tütün çeşidine uygulanan gama radyasyon dozu ve yaş ağırlık arasındaki ilişki	63
Şekil 4.5	:İzmir Özbaş tütün çeşidine uygulanan gama radyasyon dozu ve kuru ağırlık arasındaki ilişki	64
Şekil 4.6	:Akhisar 97 tütün çeşidine uygulanan gama radyasyon dozu ve sağ kalım arasındaki ilişki.....	64
Şekil 4.7	:Akhisar 97 tütün çeşidine uygulanan gama radyasyon dozu ve yaş ağırlık arasındaki ilişki	65
Şekil 4.8	:Akhisar 97 tütün çeşidine uygulanan gama radyasyon dozu ve kuru ağırlık arasındaki ilişki	65
Şekil 4.9	:İzmir Özbaş ve Akhisar 97 tütün çeşitlerine ait M ₁ generasyonunda yaşayan fide sayıları	68
Şekil 4.10	:İzmir Özbaş ve Akhisar 97 (<i>Nicotiana tabacum</i> L.) tütün çeşitlerine ait kontrol ve ışınlanmış fidelerin ortalama boyları.....	68
Şekil 4.11	:İzmir Özbaş ve Akhisar 97 (<i>Nicotiana tabacum</i> L.) tütün çeşitlerine ait kontrol ve ışınlanmış fidelerdeki yaprak sayıları	69
Şekil 4.12	:Gama radyasyonu ile ışınlanan Akhisar 97 ve İzmir Özbaş tütün çeşitlerine ait 2. ana ve uç ellere ait yüzde indirgen şeker miktarları.....	70
Şekil 4.13	:Gama radyasyonu ile ışınlanan Akhisar 97 ve İzmir Özbaş tütün çeşitlerine ait 2. ana ve uç ellere ait yüzde nikotin miktarları.....	71
Şekil 4.14	:Akhisar 97 (<i>Nicotiana tabacum</i> L.) tütün çeşidine ait bitkilerin 14. günde tuzlu besiyerlerindeki gelişimleri.....	73

Şekil 4.15	:İzmir Özbaş (<i>Nicotiana tabacum</i> L.) tütün çeşidine ait bitkilerin 14. günde tuzlu besiyerlerindeki gelişimleri74
Şekil 4.16	:İzmir Özbaş ve Akhisar 97 (<i>Nicotiana tabacum</i> L.) tütün çeşitlerine ait bitkilerin çeşitli tuz konsantrasyonlarında NaCl içeren besiyerlerindeki 14. günlerinde elde edilen yaş ağırlıkları 74
Şekil 4.17	:İzmir Özbaş ve Akhisar 97 (<i>Nicotiana tabacum</i> L.) tütün çeşitlerine ait bitkilerin çeşitli tuz konsantrasyonlarında NaCl içeren besiyerlerindeki 14. günlerinde elde edilen sürgün boyları 75
Şekil 4.18	:İzmir Özbaş ve Akhisar 97 (<i>Nicotiana tabacum</i> L.) tütün çeşitlerine ait bitkilerin çeşitli tuz konsantrasyonlarında NaCl içeren besiyerlerindeki 14. günlerinde elde edilen kök boyları 76
Şekil 4.19	:Akhisar 97 ve İzmir Özbaş (<i>Nicotiana tabacum</i> L.) tütün çeşitlerine ait kontrol ve çeşitli konsantrasyonlarda <i>in vitro</i> tuz stresine maruz kalan fidelerin yapraklarındaki total protein miktarları.....81
Şekil 4.20	:Akhisar 97 ve İzmir Özbaş (<i>Nicotiana tabacum</i> L.) tütün çeşitlerine ait kontrol ve çeşitli konsantrasyonlarda <i>in vitro</i> tuz stresine maruz kalan fidelerin yapraklarındaki lipid peroksidasyon miktarları 82
Şekil 4.21	:Akhisar 97 ve İzmir Özbaş (<i>Nicotiana tabacum</i> L.) tütün çeşitlerine ait kontrol ve çeşitli konsantrasyonlarda <i>in vitro</i> tuz stresine maruz kalan fidelerin yapraklarındaki askorbat peroksidaz enzim aktivitesi 84
Şekil 4.22	:Akhisar 97 ve İzmir Özbaş (<i>Nicotiana tabacum</i> L.) tütün çeşitlerine ait kontrol ve çeşitli konsantrasyonlarda <i>in vitro</i> tuz stresine maruz kalan fidelerin yapraklarındaki guaiakol peroksidaz enzim aktiviteleri86
Şekil 4.23	:Akhisar 97 ve İzmir Özbaş (<i>Nicotiana tabacum</i> L.) tütün çeşitlerine ait kontrol ve çeşitli konsantrasyonlarda <i>in vitro</i> tuz stresine maruz kalan fidelerin yapraklarındaki glutatyon redüktaz enzim aktiviteleri87
Şekil 4.24	:Akhisar 97 ve İzmir Özbaş (<i>Nicotiana tabacum</i> L.) tütün çeşitlerine ait kontrol ve çeşitli konsantrasyonlarda <i>in vitro</i> tuz stresine maruz kalan fidelerin yapraklarındaki süperoksit dismutaz enzim aktiviteleri 89
Şekil 4.25	:Akhisar 97 ve İzmir Özbaş (<i>Nicotiana tabacum</i> L.) tütün çeşitlerine ait kontrol ve çeşitli konsantrasyonlarda <i>in vitro</i> tuz stresine maruz kalan fidelerin yapraklarındaki katalaz enzim aktiviteleri..... 90
Şekil 4.26	:Akhisar 97 ve İzmir Özbaş (<i>Nicotiana tabacum</i> L.) tütün çeşitlerine ait kontrol ve çeşitli konsantrasyonlarda <i>in vivo</i> tuz stresine maruz kalan fidelerin yapraklarındaki total protein miktarları 94
Şekil 4.27	:Akhisar 97 ve İzmir Özbaş (<i>Nicotiana tabacum</i> L.) tütün çeşitlerine ait kontrol ve çeşitli konsantrasyonlarda <i>in vivo</i> tuz stresine maruz kalan fidelerin yapraklarındaki lipid peroksidasyon miktarları 96
Şekil 4.28	:Akhisar 97 ve İzmir Özbaş (<i>Nicotiana tabacum</i> L.) tütün çeşitlerine ait kontrol ve çeşitli konsantrasyonlarda <i>in vivo</i> tuz stresine maruz kalan fidelerin yapraklarındaki askorbat peroksidaz enzim aktivitesi 97
Şekil 4.29	:Akhisar 97 ve İzmir Özbaş (<i>Nicotiana tabacum</i> L.) tütün çeşitlerine ait kontrol ve çeşitli konsantrasyonlarda <i>in vivo</i> tuz stresine maruz kalan fidelerin yapraklarındaki guaiakol peroksidaz enzim aktiviteleri99
Şekil 4.30	:Akhisar 97 ve İzmir Özbaş (<i>Nicotiana tabacum</i> L.) tütün çeşitlerine ait kontrol ve çeşitli konsantrasyonlarda <i>in vivo</i> tuz stresine maruz kalan fidelerin yapraklarındaki glutatyon redüktaz enzim aktiviteleri100

Şekil 4.31	:Akhisar 97 ve İzmir Özbaş (<i>Nicotiana tabacum</i> L.) tütün çeşitlerine ait kontrol ve çeşitli konsantrasyonlarda <i>in vivo</i> tuz stresine maruz kalan fidelerin yapraklarındaki süperoksit dismutaz enzim aktiviteleri.....102
Şekil 4.32	:Akhisar 97 ve İzmir Özbaş (<i>Nicotiana tabacum</i> L.) tütün çeşitlerine ait kontrol ve çeşitli konsantrasyonlarda <i>in vivo</i> tuz stresine maruz kalan fidelerin yapraklarındaki katalaz enzim aktiviteleri.....103
Şekil 4.33	:Akhisar 97 ve İzmir Özbaş (<i>Nicotiana tabacum</i> L.) tütün çeşitlerine ait kontrol ve çeşitli konsantrasyonlarda <i>in vitro</i> tuz stresine maruz kalan fidelerin yapraklarındaki prolin konsantrasyonları.....105
Şekil 4.34	:Akhisar 97 ve İzmir Özbaş (<i>Nicotiana tabacum</i> L.) tütün çeşitlerine ait kontrol ve çeşitli konsantrasyonlarda <i>in vivo</i> tuz stresine maruz kalan fidelerin yapraklarındaki prolin konsantrasyonları.....106
Şekil 4.35	:İzmir Özbaş tütün çeşidine air <i>in vitro</i> ve <i>in vivo</i> tuz denemelerindeki glutatyon redüktaz (GR) enzim aktiviteleri arasındaki ilişki.....109
Şekil 4.36	:İzmir Özbaş tütün çeşidine air <i>in vitro</i> ve <i>in vivo</i> tuz denemelerindeki glutatyon redüktaz (GR) enzim aktiviteleri arasındaki ilişki.....110
Şekil 4.37	:İzmir Özbaş çeşidine ait kontrol bitkilerinin 250 mM NaCl içeren ve içermeyen besiyerlerindeki kallus gelişimleri.....113
Şekil 4.38	:1.10 ve 1.11 numaralı Akhisar 97 çeşidine ait 250 mM NaCl'ye toleranslı olarak belirlenen mutant bitkilerin yapraklarından kurulan kallus kültürlerindeki gelişimleri.....113
Şekil 4.39	:3.25 ve 3.26 numaralı İzmir Özbaş çeşidine ait 250 mM NaCl'ye toleranslı olarak belirlenen mutant bitkilerin yapraklarından kurulan kallus kültürlerindeki gelişimleri114
Şekil 4.40	:OPO02 primerine ait amplifikasyonun agaroz jel elektroforez görüntüsü.....116
Şekil 4.41	:OPB05 primerine ait amplifikasyonun agaroz jel elektroforez görüntüsü.....117
Şekil 4.42	:M13 primerine ait amplifikasyonun agaroz jel elektroforez görüntüsü.....117
Şekil 4.43	:A7 primerine ait amplifikasyonun agaroz jel elektroforez görüntüsü .117
Şekil 4.44	:OPB08 primerine ait amplifikasyonun agaroz jel elektroforez görüntüsü.....118
Şekil 4.45	:Akhisar 97 ve İzmir Özbaş tütün (<i>Nicotiana tabacum</i> L.) çeşitlerine ait kontrol ve mutant bitkilerin, RAPD-PZR'de kullanılan primerlerin amplifikasyon sonuçlarına göre oluşturulan dendrogramları.....118

TABLO LİSTESİ

Tablo 3.1	: Tütün tohumlarının çimlenmesi, fidelerin gelişmesi ve kallus oluşumu için kullanılan besiyerleri.....	42
Tablo 3.2	: Hoagland solüsyonunun içeriği.....	46
Tablo 3.3	: RAPD-PZR analizinde kullanılan primerler ve baz dizilişleri.....	54
Tablo 3.4	: PZR içeriği ve kullanılan konsantrasyonlar.....	55
Tablo 3.5	: PZR döngü koşulları.....	55
Tablo 4.1	: İzmir Özbaş ve Akhisar 97 (<i>Nicotiana tabacum</i> L.) tütün çeşitlerine ait kontrol ve ışınlanmış tohumların çimlenme yüzdesi.....	57
Tablo 4.2	: İzmir Özbaş tütün çeşidine ait fidelerin 28. gündeki yaş ve kuru ağırlıkları üzerine gama radyasyonun etkisi.....	59
Tablo 4.3	: Akhisar 97 tütün çeşidine ait fidelerin 28. gündeki yaş ve kuru ağırlıkları üzerine gama radyasyonun etkisi.....	59
Tablo 4.4	: Akhisar 97 ve İzmir Özbaş tütün çeşitlerinin gama radyasyona karşı duyarlılığı.....	60
Tablo 4.5	: M ₁ generasyonunun eldesi için ekimi yapılan tohum sayıları ve hasadı yapılan fide sayıları.....	67
Tablo 4.6	: İzmir Özbaş ve Akhisar 97 tütün (<i>Nicotiana tabacum</i> L.) çeşitlerinin M ₂ generasyonuna ait çüce, dev ve steril bitki sayıları.....	72
Tablo 4.7	: Akhisar 97 tütün çeşidine ait <i>in vitro</i> ortamda tuz stresine maruz bırakılan bitkilerin 14. gündeki klorofil konsantrasyonları.....	77
Tablo 4.8	: İzmir Özbaş tütün çeşidine ait <i>in vitro</i> ortamda tuz stresine maruz bırakılan bitkilerin 14. gündeki klorofil konsantrasyonları.....	78
Tablo 4.9	: Akhisar 97 ve İzmir Özbaş tütün çeşitlerine ait <i>in vitro</i> tuz stresine maruz kalan bitkilerin 14. gündeki karotenoid konsantrasyonları.....	80
Tablo 4.10	: Akhisar 97 ve İzmir özbaş tütün çeşitlerine ait <i>in vitro</i> tuz stresine maruz kalan bitkilerin 14. gündeki total protein konsantrasyonları.....	80
Tablo 4.11	: Akhisar 97 ve İzmir özbaş tütün çeşitlerine ait <i>in vitro</i> tuz stresine maruz kalan bitkilerin 14. gündeki lipid peroksidasyon miktarları.....	82
Tablo 4.12	: Akhisar 97 ve İzmir özbaş tütün çeşitlerine ait <i>in vitro</i> tuz stresine maruz kalan bitkilerin 14. gündeki askorbat peroksidaz aktiviteleri.....	84
Tablo 4.13	: Akhisar 97 ve İzmir özbaş tütün çeşitlerine ait <i>in vitro</i> tuz stresine maruz kalan bitkilerin 14. gündeki guaiakol peroksidaz aktiviteleri.....	85
Tablo 4.14	: Akhisar 97 ve İzmir özbaş tütün çeşitlerine ait <i>in vitro</i> tuz stresine maruz kalan bitkilerin 14. gündeki glutatyon redüktaz aktiviteleri.....	87
Tablo 4.15	: Akhisar 97 ve İzmir özbaş tütün çeşitlerine ait <i>in vitro</i> tuz stresine maruz kalan bitkilerin 14. gündeki süperoksit dismutaz aktiviteleri.....	88

Tablo 4.16	: Akhisar 97 ve İzmir özbaş tütün çeşitlerine ait <i>in vitro</i> tuz stresine maruz kalan bitkilerin 14. gündeki katalaz aktiviteleri.....	90
Tablo 4.17	: Akhisar 97 tütün çeşidine ait <i>in vivo</i> ortamda tuz stresine maruz bırakılan bitkilerin 14. gündeki klorofil konsantrasyonları.....	91
Tablo 4.18	: İzmir Özbaş tütün çeşidine ait <i>in vivo</i> ortamda tuz stresine maruz bırakılan bitkilerin 14. gündeki klorofil konsantrasyonları.....	92
Tablo 4.19	: Akhisar 97 ve İzmir Özbaş tütün çeşitlerine ait <i>in vivo</i> tuz stresine maruz kalan bitkilerin 14. gündeki karotenoid konsantrasyonları.....	93
Tablo 4.20	: Akhisar 97 ve İzmir Özbaş tütün çeşitlerine ait <i>in vivo</i> tuz stresine maruz kalan bitkilerin 14. gündeki total protein konsantrasyonları.....	94
Tablo 4.21	: Akhisar 97 ve İzmir Özbaş tütün çeşitlerine ait <i>in vivo</i> tuz stresine maruz kalan bitkilerin 14. gündeki lipid peroksidasyon miktarları.....	95
Tablo 4.22	: Akhisar 97 ve İzmir Özbaş tütün çeşitlerine ait <i>in vivo</i> tuz stresine maruz kalan bitkilerin 14. gündeki askorbat peroksidaz aktiviteleri.....	97
Tablo 4.23	: Akhisar 97 ve İzmir Özbaş tütün çeşitlerine ait <i>in vivo</i> tuz stresine maruz kalan bitkilerin 14. gündeki guaiakol peroksidaz aktiviteleri.....	98
Tablo 4.24	: Akhisar 97 ve İzmir Özbaş tütün çeşitlerine ait <i>in vivo</i> tuz stresine maruz kalan bitkilerin 14. gündeki glutatyon redüktaz aktiviteleri.....	100
Tablo 4.25	: Akhisar 97 ve İzmir Özbaş tütün çeşitlerine ait <i>in vivo</i> tuz stresine maruz kalan bitkilerin 14. gündeki süperoksit dismutaz aktiviteleri.....	101
Tablo 4.26	: Akhisar 97 ve İzmir Özbaş tütün çeşitlerine ait <i>in vivo</i> tuz stresine maruz kalan bitkilerin 14. gündeki katalaz aktiviteleri.....	103
Tablo 4.27	: Akhisar 97 ve İzmir Özbaş tütün çeşitlerine ait <i>in vitro</i> tuz stresine maruz kalan bitkilerin 14. gündeki prolin miktarları.....	104
Tablo 4.28	: Akhisar 97 ve İzmir Özbaş tütün çeşitlerine ait <i>in vivo</i> tuz stresine maruz kalan bitkilerin 14. gündeki prolin miktarları.....	106
Tablo 4.29	: İzmir Özbaş ve Akhisar 97 tütün çeşitlerine ait <i>in vivo</i> tuz denemesi morfolojik zararlanma verileri.....	111
Tablo 4.30	: Gama radyasyonu ile ışınlanan tütün bitkilerinin M ₃ generasyonunda 250 mM NaCl varlığında kontrole yakın gelişim gösteren mutant bireyler.....	112
Tablo 4.31	: 250 mM NaCl'ye toleranslı olarak seçilen Akhisar 97 ve İzmir Özbaş tütün çeşitlerine ait mutantların glutatyon redüktaz enzim aktiviteleri..	115
Tablo 4.32	: RAPD sonucu oluşan bantlar ve polimorfizm oranları.....	119
Tablo 4.33	: Çalışmamızda kullanılan primerlere göre Akhisar 97 ve İzmir Özbaş tütün (<i>Nicotiana tabacum</i> L.) çeşitlerine ait kontrol ve mutant bitkilerin birbirlerine olan genetik uzaklıkları.....	120

ÖZET

GAMA RADYASYONU İLE TUZA TOLERANSLI TÛTÛN (*Nicotiana tabacum* L.) MUTANTLARININ ELDESİ VE SELEKSİYONU

In vitro teknikler ile mutasyon uygulamalarının birlikte kullanılmasıyla, çeşitli çevresel streslere dirençli veya toleranslı bitki türlerinin eldesi mümkün olmaktadır.

Bu çalışmada Akhisar 97 ve İzmir Özbaş tütün (*Nicotiana tabacum* L.) çeşitlerine ait tohumlar, 0, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 500 ve 600 Gy'lik gama radyasyon dozlarında ışınlanmış ve bu tohumlardan gelişen fidelerin taze ağırlık, sürgün ve kök boylarına göre, çeşitlerin radyasyon hassasiyetleri karşılaştırılmıştır. Akhisar 97 tütün çeşidinin, gama radyasyonuna İzmir Özbaş çeşidine göre daha hassas olduğu belirlenmiştir.

M₁ generasyonu eldesi için 0, 100, 200, 300 ve 400 Gy'lik gama radyasyon dozlarında ışınlanan ve tarlaya ekilen Akhisar 97 ve İzmir Özbaş tütün tohumlarından gelişen fidelerin yaşama oranları, ortalama fide boylarında, uygulanan radyasyon dozlarının artışına paralel olarak bir azalma gözlenmiştir. Tütün bitkisinin yapraklarında indirgen şeker ve nikotin miktarları radyasyondan etkilenmiştir. Bitkinin gelişimine bağlı olarak yaprak kırımına göre 2. ana ellerde indirgen şeker miktarı ve buna bağlı olarak da uç ellerde nikotin miktarı radyasyon uygulamalarında artış göstermiştir.

Her iki çeşidin *in vitro* ve *in vivo* koşullarda 0, 50, 100, 150, 200, 250, 300 ve 350 mM konsantrasyonlarda NaCl içeren ortamlardaki toleransları, klorofil ve karotenoid konsantrasyonu, total protein konsantrasyonu, lipid peroksidasyon, askorbat peroksidaz, guaiakol peroksidaz, glutatyon redüktaz, süperoksit dismutaz ve katalaz enzim aktiviteleri karşılaştırılmış olup, Akhisar 97 çeşidinin tuzluluğa da İzmir Özbaş'a göre daha hassas olduğu belirlenmiştir.

M₃ generasyonuna ait bitkiler 250 mM NaCl içeren ¼ Hoagland solüsyonunda yetiştirilmiş, tuzluluğa gösterdikleri toleransa göre seleksiyonları yapılmış ve 10 adet mutant bitki seçilmiştir.

Çalışmamızda elde edilen kontrol ve mutant bitkiler arasındaki farklılıklar, RAPD-PZR yöntemiyle ortaya konmuştur. Akhisar 97 ve İzmir Özbaş tütün çeşitlerine ait kontrol ve mutant bitkilerin birbirlerine olan genetik uzaklıkları belirlenmiştir. Akhisar 97 ve İzmir Özbaş tütün çeşitlerinde tuza toleranslı olarak seçilen ve en fazla genetik uzaklığa sahip olan iki mutantın 100 Gy'lik gama radyasyon dozu ile ışınlandıkları belirlenmiştir.

Ağustos, 2010

SUMMARY

INDUCE OF SALT TOLERANCE TOBACCO (*Nicotiana tabacum* L.) BY GAMMA RADIATION AND SELECTION OF MUTANTS

It is possible to obtain salt stress tolerant or resistant plant varieties by using the combination of *in vitro* techniques and mutagens.

In this study, the tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) seeds belonging to Akhisar 97 and İzmir Özbaş varieties were irradiated with 0, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 500 and 600 Gy gamma radiation doses and the radiation tolerances were compared according to the fresh weights, shoot and root lengths of regenerated plantlets from irradiated seeds. Akhisar 97 variety was found more sensitive to gamma radiation than İzmir Özbaş variety.

The survival rates, average plantlets' heights of Akhisar 97 and İzmir Özbaş tobacco seedlings irradiated with 0, 100, 200, 300 and 400 Gy to obtain M₁ generation were decreased due to increasing radiation doses. Reducing sugars and nicotine concentrations in tobacco leaves, were affected by gamma radiation treatments. In accordance with plant development, amount of reducing sugars at second leaves and nicotine concentration at top leaves were increased by gamma radiation treatments.

In *in vitro* and *in vivo* conditions, at 0, 50, 100, 150, 200, 250, 300 and 350 mM NaCl concentrations, the salinity tolerance capacities of two tobacco varieties were evaluated due to chlorophyll, carotenoid and total protein concentrations, lipid peroxidation and activities of ascorbate peroxidase, guaiacol peroxidase, glutathione reductase, superoxide dismutase and catalase. Akhisar 97 variety was found more sensitive to salinity than izmir Özbaş variety.

The seedlings belonging to M₃ generations were grown in the ¼ Hoagland solution containing 250 mM NaCl and their salt tolerance selections were performed. 10 mutant plants were selected.

In our study, the differences between control and mutant plants were presented by RT-PCR. The genetic distances between control and mutant plants belonging to Akhisar 97 and İzmir Özbaş were calculated. The two most distant salt tolerant mutants were obtained by 100 Gy gamma radiation treatments in both tobacco varieties.

August, 2010

1. GİRİŞ

Dünya nüfusunun hızla artmasına paralel olarak artan gıda ihtiyacı tarımsal üretimde bir artışta olmasını zorunlu hale getirmekte ve bunun beraberinde getirdiği sorunları çözülmesini gerektirmektedir. Dünya genelinde sanayileşmenin sonucu olarak meydana gelen sera gazlarının artışı, çevre koşullarındaki değişiklikleri tetiklemektedir. Çevre koşullarında meydana gelen değişiklikler de, tarımsal üretimin yetersiz kalmasına ve ürün kayıplarına yol açmaktadır. Çevresel şartlarda meydana gelen tüm olumsuzluklar, bitkilerde strese neden olmaktadır. Toprak tuzluluğu, dünya genelinde tarım alanlarında üretime büyük derecede zarar veren önemli çevresel streslerden biridir. Kurak ve yarı kurak iklim bölgelerinde yetersiz yağış ve yüksek buharlaşma, tuzluluğun oluşumuna sebep olan önemli etmenlerdendir. Yanlış sulama ve drenaj koşullarındaki hatalar da tuzluluğa sebep olabilmektedir (Kanber ve diğ., 1992).

Ülkemizde görülen sıcak ve kurak iklim koşulları, tuzluluk ve kuraklığın oluşumu için uygun ortamı sağlamaktadır. Dünyada çorak topraklar, toplam arazi yüzeyinin yaklaşık %10'unu oluşturmaktadır (Sönmez, 2003) ve her yıl toprak tuz içeriğinin %10 oranında artış eğiliminde olması, sorunun giderek artan bir hızla geliştiğini göstermektedir (Pessarakli, 1999).

Son yıllarda dünya ekilebilir tarım arazilerinde önemli bir sorun haline gelen tuzluluğa karşı araştırmalar hız kazanmıştır. Bitki ıslahçıları, tuzlu topraklarda yetişebilecek tuza toleranslı veya tuza dirençli varyetelerin geliştirilmesine çalışmaktadırlar.

Mutasyon ıslahı, çevresel streslere dirençli veya toleranslı varyetelerin geliştirilmesinde her geçen gün önem kazanmaktadır. Bitkilerde aranılan özellikteki mutasyonların kendiliğinden oluşma ihtimalleri son derece düşüktür. Bu nedenle, kimyasal veya fiziksel mutajenler kullanılmakta ve mutasyon oluşum frekanslarının arttırılması sağlanmakta ve elde edilen çeşitlilik bitki ıslah çalışmalarında kullanılmaktadır (Hewawasam ve diğ., 2004; Ahloowalia ve diğ., 2004). Bitki ıslahı çalışmalarında

fiziksel mutajen olarak genellikle gama radyasyonu tercih edilmekte ve istenilen karakterler açısından yeni varyeteler geliştirilmeye devam edilmektedir (Sigurbjörnsson, 1977; Das ve diğ., 2000).

Hızlı gelişen doku kültürü tekniklerinin, mutasyon ıslahı çalışmalarında kullanılmasıyla kısa sürede çok sayıda mutant bitkinin elde edilebilmesine olanak sağlanmıştır.

Çalışmamızda, İzmir yöresine ait iki tütün (*Nicotiana tabacum* L.) çeşidi model organizma olarak kullanılmış olup, belirli bir doz aralığında gama radyasyonu kullanılarak mutant bireylerin eldesi teşvik edilmiş, bu mutant bireyler arasında *in vivo* ve *in vitro* koşullarda tuz stresine karşı toleransları değerlendirilmiş ve farklılıklar moleküler düzeyde ortaya konulmuştur.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. STRES KAVRAMI

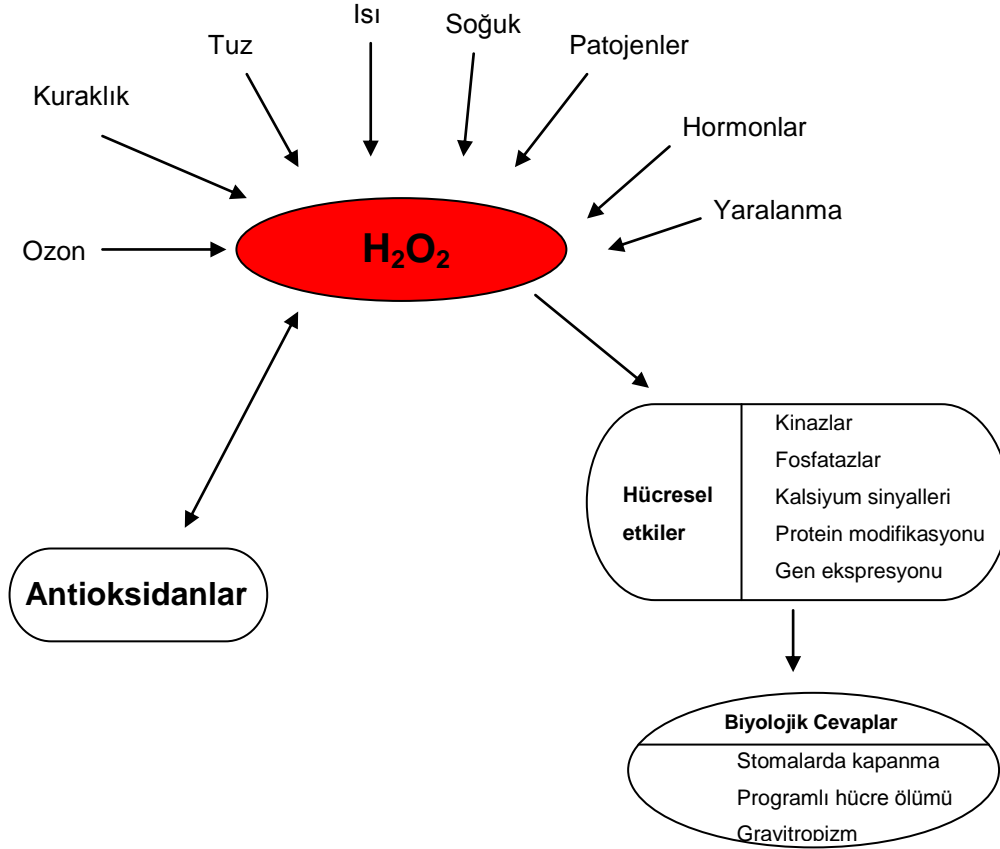
Bitkiler, büyüme ve gelişimlerini etkileyen faktörlere maruz kalmaktadırlar. Bu faktörler, biyotik ve abiyotik faktörler olarak iki grupta tanımlanmaktadır. Biyotik faktörleri, yabancı otlar, zararlı böcekler ve hastalıklar oluştururken, abiyotik faktörleri ısı (sıcak, soğuk, donma), su ve tuzluluk gibi çevresel faktörler oluşturmaktadır. Bu tip stres faktörlerinin varlığında hayatta kalmayı başaran bireyler döllerini devam ettirebilirler. Stres etmeni varlığında, bitkiler hayatta kalmak için çeşitli stratejiler geliştirirler. Ortaya çıkan tüm mekanizmalardaki ortak amaç, biyotik veya abiyotik stres nedeniyle direkt veya indirekt olarak oksidatif stres oluşumuna yol açan serbest radikallerin ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) yok edilmesidir (Slater ve diğ., 2004).

2.2. OKSİDATİF STRES

Bitkiler, tüm aeroblar gibi, son elektron alıcısı olarak O_2 'yi kullanırlar. Moleküler oksijen reaktif değildir. Oksijen, $H\cdot$ gibi bir serbest radikalle reaksiyona girerek radikal reaksiyonları oluşturur ve sonuçta hidrojen peroksit meydana gelmektedir.

Birçok durumda ROS üretimi genetik olarak programlanmıştır. Gelişim aşamalarında ve çevresel koşullardaki değişiklikler sırasında indüklenmektedir. Yüksek bitkiler, bitki gelişimi ve büyümesi esnasında birçok süreçle bağlantılı ikincil mesajcı olarak süperoksit ve H_2O_2 üretirler (Şekil 1) (Hong-bo ve diğ., 2008).

Hem süperoksit hem de H_2O_2 bitkilerde önemli sinyal molekülleridir. H_2O_2 , daha küçük, yüksüz ve hızlıca yok edilebilmektedir. Bu özellikler, bir hücre sinyal molekülü için karakteristiktir. Süperoksit ise, daha kısa yarı ömre sahiptir ve yüklüdür. Etkileri, oluştuğu bölgenin yakınlığı ile kısıtlıdır. Buna rağmen, süperoksit perhidroksil ($HO_2\cdot$) oluşturmak üzere protonlanabilirler ve membrandan geçme potansiyeline sahip olurlar (Jenks ve Hasegawa, 2005).



Şekil 1.1. Hidrojen peroksitin regülasyonu, uzaklaştırılması ve hücresel etkileri
(Hirt ve Shinozaki, 2004)

Oksidatif etki, aktif oksijen türlerinin (süperoksit molekülü (O_2^-), singlet oksijen (1O), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali (OH^\cdot)) oluşumunu içermektedir. Serbest radikaller, eşleşmemiş elektron içeren reaktif moleküllerdir. Biyoradikaller de oksijen ile reaksiyona girerek organik peroksit radikallerini oluşturabilirler. Oluşan radikaller, diğer organik biyolojik moleküller ile çok sayıda reaksiyonlara girerek biyolojik hasarların oluşumu hızlanmaktadır (Badawi ve diğ., 2004; Hirt ve Shinozaki, 2004; Mittler ve diğ., 2004; Edreva, 2005).

- 1) $O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\bullet -}$
- 2) $O_2^{\bullet -} + O_2^{\bullet -} \rightarrow 2H^+ \rightarrow H_2O_2$
- 3) $O_2^{\bullet -} + H^+ \rightarrow HO_2^{\bullet}$
- 4) $H_2O_2 + O_2^{\bullet -} \rightarrow O_2 + OH^- + OH^{\bullet}$
- 5) $O_2^{\bullet -} + NO^{\bullet} \rightarrow OONO^-$

Karotenoidler, fotosentezde temel bir role sahiptirler. Karotenoidler, süperoksitler ve diğer serbest radikaller ile direkt reaksiyona girebilmektedirler. Radikal katyon oluşturarak elektron transferi yapabilmektedirler. Karotenoidler, lipid peroksil radikaller ile reaksiyona girerek, lipid hidroperoksitlerini ve karotenoid radikallerini oluşturmaktadırlar. Oksidize karotenoidlerin biyolojik fonksiyonları ve yıkım ürünleri hakkında çok az bilgi bulunmaktadır. Hayvan sistemlerinde, kanser hücrelerinde antiproliferatif etkileri ve apoptozu indükleyici etkileri bilinmektedir. Bu bileşikler, birçok foto-oksidatif strese hasar indikatörü olarak düşünülmektedir (Sudhir ve Murthy, 2004; Jenks and Hasegawa, 2005).

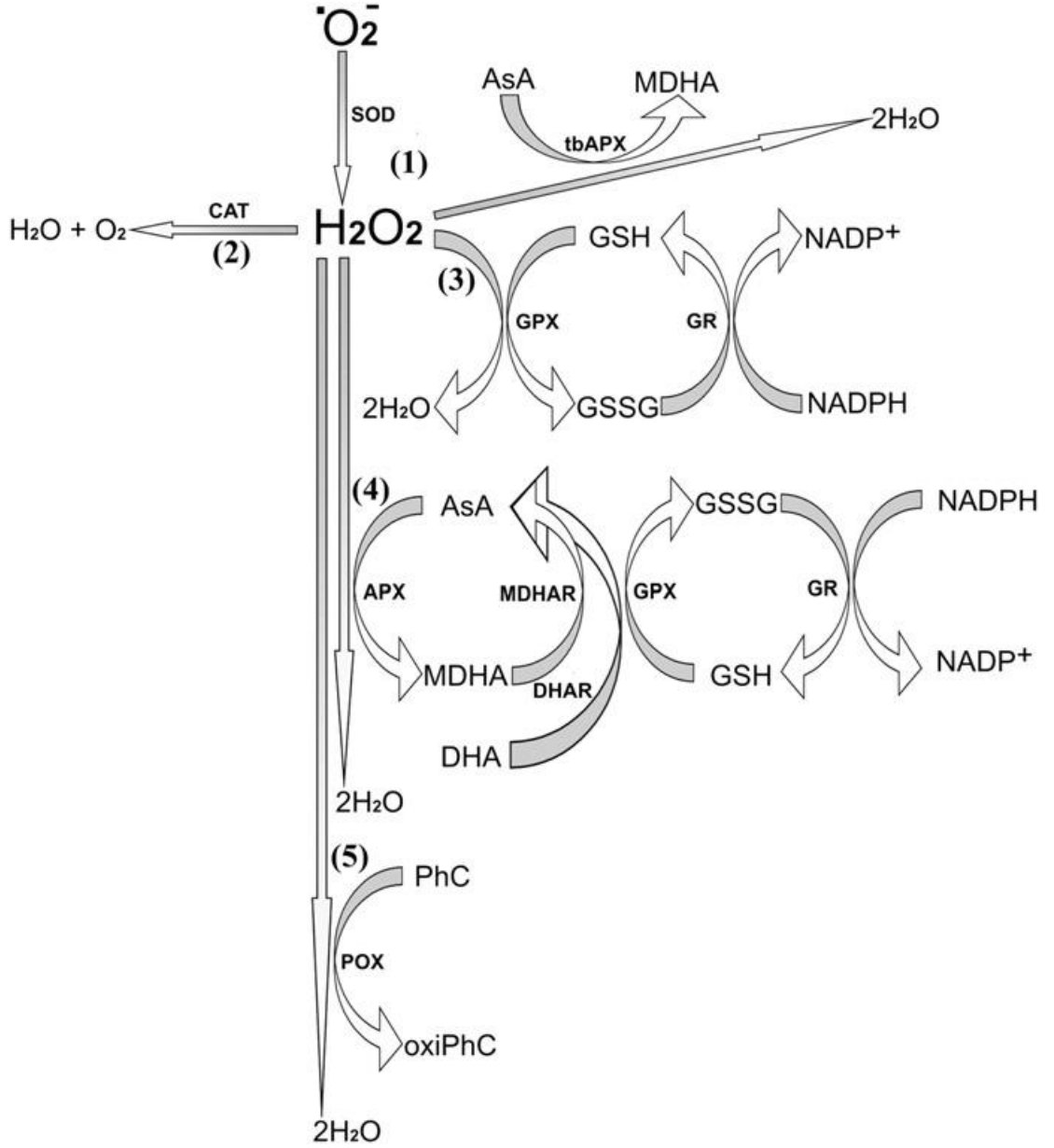
Solunum, fotosentez gibi metabolik süreçler de mitokondri, peroksizom ve kloroplastlarda ROS oluşumuna neden olmaktadır. Farklı ROS tipleri, proteinler, DNA ve lipidler üzerinde oksidatif hasar oluşturmaktadırlar. Bitkiler ayrıca, çeşitli çevresel streslere yanıt olarak bazı oksidazları ve peroksidazları aktive ederek ROS üretmektedirler. ROS konsantrasyonundaki hızlı artışlar oksidatif patlama olarak adlandırılmaktadır (Apel ve Hirt, 2004; Banu ve diğ., 2009).

Optimum büyüme koşullarında ROS üretimi, çeşitli antioksidant enzimler sayesinde hücrel hasar oluşturmayan seviyelerde tutulmaktadır. Buna rağmen çevresel stresler sonucunda hücrel dengeler bozulmakta ve ROS üretimi artmaktadır (Hong-bo ve diğ., 2008). Bitkilerin abiyotik ve biyotik streslere adaptasyonlarında antioksidantlar çok önemli bir rol oynamaktadırlar. Bitkiler tipik olarak, membranlar, organeller ve makromoleküller üzerinde zararlı etkileri olduğu bilinen çeşitli çevresel streslere karşı koruyucu mekanizma olarak görev yapan bir grup antioksidantları üretmektedirler. Süperoksit dismutaz (SOD), askorbat peroksidaz (APX), glutatyon redüktaz (GR) ve

katalaz (CAT) bitkilerde ana savunucu enzimlerdir (Prochazkova ve diğ., 2001; Mittler ve diğ., 2004; Lee ve diğ., 2007; Manchanda ve Garg, 2008).

Oksidatif stres, lipid peroksidasyon ve H_2O_2 içeriği ile değerlendirilmektedir. H_2O_2 , ısı, ışık yoğunluğu, kuraklık, patojen, tuzluluk gibi bitki hormonlarını uyaran abiyotik ve biyotik streslere karşı bitki cevabında yer alan endojen sinyal molekülüdür (Hong-bo ve diğ., 2008). H_2O_2 'nin birikimi ayrıca, lipid peroksidasyon ve membran bozulmasına yol açan hidroksil radikallerinin oluşumu için potansiyeli arttırmaktadır (Jaleel ve diğ., 2007). Lipid peroksidasyon, lipoksigenazlar tarafından enzimatik olarak başlatılabilmektedir. Bu enzim moleküler oksijeni linoleik aside dahil etmektedir ve lipid hidroperoksitler oluşmaktadır (Jaleel ve diğ., 2007; Yang ve diğ., 2009).

Superoksit dismutaz (E.C. 1.15.1.1), O_2 'nin H_2O_2 'ye dönüşümünü katalize etmektedir (Sharma ve Davis, 1997; Badawi ve diğ., 2004). Katalaz enzimi de (EC 1.11.1.6) oluşan H_2O_2 'nin H_2O ve O_2 'ye yıkımını katalizlemektedir. Askorbat peroksidaz (E.C. 1.11.1.11) (APX), askorbatı, H_2O_2 'yi suya indirmek için askorbatı spesifik elektron kaynağı olarak kullanırken beraberinde monodehidroaskorbat (MDHA) oluşmaktadır. MDHA, askorbata MDHA redüktaz ile veya enzimatik olmayan bir şekilde askorbat ve dehidroaskorbata (DHA) dönüşmektedir. DHA, indirgenmiş glutasyonu (GSH) indirgen substrat olarak kullanarak askorbata indirgenmektedir. Bu reaksiyon sonucunda oluşan oksidize glutasyon (GSSG), glutasyon redüktaz (GR) ile katalizlenen bir reaksiyon ile NADPH tarafından tekrar GSH'a indirgenmektedir. GSH, antioksidant gibi davranarak strese bağlı oluşan birçok oksijen radikalinin indirgenmesini sağlayarak H_2O_2 'nin toksik seviyelerde birikmesini önlemektedir (Şekil 1.2) (Sharma ve Davis, 1997; Reddy ve diğ., 2004; Jenks ve Hasegawa, 2005; Song ve ark., 2005; Skopelitis ve diğ., 2006; Hong-bo ve diğ., 2008).



Şekil 1.2. Bitkilerde ROS'ların uzaklaştırılmasındaki ana hüresel yollar:

1) Süperoksit dismutaz; 2) Peroksizomlarda katalaz; 3) Glutatyon peroksidasyonu ve oluşum siklusu; 4) bitkilerin stroma, sitosol, mitokondri ve apoplastlarında askorbat-glutatyon yolu; 5) polifenol oksidasyonu. SOD, süperoksit dismutaz; CAT, katalaz; APX, askorbat peroksidaz; MDHAR, monodehidroaskorbat redüktaz; DHAR, dehidroaskorbat redüktaz; GR, glutatyon redüktaz; GPX, glutatyon peroksidaz; POX, peroksidaz; GSH, indirgenmiş glutatyon; GSSG, oksidize glutatyon; AsA, askorbik asit; MDHA, monodehidroaskorbat; DHA, dehidroaskorbat; PhC, fenolik bileşikler; oxiPhC, oksidize fenolik bileşikler; tbAPX, tilakoide bağlı askorbat peroksidaz (Pinto ve diğ., 2003'ten modifiye edildi).

Bitkilerin oksidatif streslere karşı olan hassasiyetinin, oksidantların oluşumu ve antioksidant kapasitesi arasındaki dengeye bağlı olduğu bilinmektedir (Prochazkova ve diğ., 2001; Wang ve Han, 2009).

2.3. TUZ STRESİ

Tuzluluk; özellikle kurak ve yarı kurak iklim bölgelerinde yağmurlarla ve sulama ile yer altı suyuna karışan çözülebilir tuzların, yüksek taban suyu ile birlikte kapilerite yolu ile toprak yüzeyine çıkması ve buharlaşma sonucu suyun uçmasıyla toprak yüzeyinde birikmesi olayıdır (Kwiatowski, 1998).

Topraklarda tuzluluğun artmasıyla toprakların çoraklaşması, çölleşmeyi hızlandırmakta veya tersi olarak çölleşmenin etkisiyle topraklar çoraklaşmaktadır. Toprakların ve suların tuzlanması, suda çözünebilir tuzların yeraltında, toprakta ve suda birikmesidir.

Diğer taraftan yanlış sulama uygulamaları da özellikle drenaj koşullarının kötü olduğu yerlerde tuzluluğa sebep olabilmektedir.

Türkiye'deki çoraklığın oluşumunda, iklim, drenaj, tarımsal işlemler ve toprak karakteristiklerinin etkili olduğu ve bu faktörlerin birbirlerinden bağımsız değerlendirilemeyeceği belirtilmektedir (Sönmez, 2003).

Tuzluluk, sularda veya topraklarda bulunan çözülmüş mineral tuzların konsantrasyonundan ileri gelmektedir. Çözülmüş mineral tuzları, Na, Ca, Mg ve K kationlarını ve Cl, SO₄, HCO₃, CO₃ ve NO₃ anyonlarını içine alan başlıca çözünebilir maddeleri kapsamaktadır (Ünlükara ve ark, 2006).

Küresel ısınma, tuzluluk, hızlı nüfus artışı ve gittikçe artan insan ihtiyaçları beraberinde büyük problemleri de ortaya çıkarmaktadır. Bu sorunların çözülmesi ve engelleyici önlemlere ilişkin yapılan araştırmalar gittikçe artmaktadır.

2.4. TUZ STRESİNİN BİTKİ BÜYÜME VE GELİŞMESİNE ETKİSİ

Tuzluluğun genel etkisi, büyüme oranını azaltmasıdır. Bu durum bitkide daha ufak yapraklara, daha kısa boya ve bazen de yaprak sayısında azalmalara neden olmaktadır. Tuzluluk miktarının özellikle düşük ölçüdeki konsantrasyonlarında ilk ve ana etkisi sızma etkilerinden ileri gelmektedir. Tuzluluğun bitkide ilk etkilediği organ köklerdir. Köklerde boy ve hacimce azalma görülmektedir. Ayrıca köklerin daha ince veya kalın oldukları da gözlenmektedir. Düşük tuzluluk miktarlarında kök büyümesi, genellikle daha az etkilenmektedir veya bazen sürgün büyümesi ile karşılaştırıldığında tuzluluk miktarı tarafından teşvik edilmiş bile sayılabilir (Shannon ve diğ., 1994).

Tuzluluk miktarının etkisiyle büyümenin ne oranda etkilendiği türlere göre büyük farklılık göstermektedir. Nisbi nem, ısı, radyasyon ve hava kirliliği gibi çevresel etkileşimler de tuzluluk miktarına gösterilen tepkinin şiddetini dolaylı olarak etkilemektedir (Shannon ve diğ., 1994).

Bitki büyümesinde osmotik stresin iyonik stresten daha etkili olduğu kaydedilmiştir (Hayashi ve Murata, 1998). Yüksek tuz konsantrasyonlarında aşırı miktarda biriken Na^+ , K^+ alınımını engellerken, Cl^- ise özellikle NO_3^- alınımını önleyerek bitkilerde iyon dengesizliği ortaya çıkmasına sebep olmaktadır.

Tuz stresinin bitki büyüme ve verimi üzerindeki sınırlayıcı etkisini meydana getiren mekanizmalardan birisi osmotik etki ile ilgilidir. Yaşamını devam ettirmek için suyu topraktan almak zorunda olan bitkilerin yetişme ortamında bulunan yüksek konsantrasyonlardaki tuz, toprak su potansiyelini azaltarak fizyolojik kuraklığa neden olmaktadır. Böyle bir durumda, toprakta yeterli su bulunsa dahi bitki bu suyu yeterince alamamaktadır (Hayashi ve Murata, 1998).

Tuzlu koşullarda bitki büyümesinde meydana gelen azalma, düşük su potansiyelinden ileri gelen fizyolojik kuraklık, bitkideki düşük su potansiyeli ile düşük oransal turgor basıncı ve hücrelerde iyon konsantrasyonunun artması sonucunda, bitkiler osmotik düzenlemelere ihtiyaç duymaktadırlar. Bütün bu değişiklikler sonucunda hormonlarda

dengelesizlikler, stoma açılması, CO₂ alımının azalması, transpirasyon kaybı ve kloroz ortaya çıkarak bitki büyümesini azaltır (Dardeniz ve diğ., 2006).

Tuzluluk miktarının sızma etkileri büyüme oranının azalmasına, yaprak rengindeki değişikliklere, kök/sürgün oranları ve olgunlaşma hızı gibi gelişim özelliklerinde değişiklikler yapmaktadır. Tuzluluk bitkilerde hiperiyonik ve hiperozmotik etkilere neden olabilmektedir. İyonik etkiler genellikle yapraklarda ve meristem dokusunda veya beslenme düzensizliklerinin tipik belirtileri olarak kendini göstermektedir. Bu nedenle, yapraklarda yüksek konsantrasyonlarda Na⁺ ve Cl⁻ iyonları birikebilir ve bu durum yaprakların zararlanmasına neden olmaktadır (Jaleel ve diğ., 2007).

Tuz stresi altında Na⁺ ve Cl⁻ gibi iyonlar, proteinlerin hidrasyon tabakalarına girerler ve aminoasitler ile kovalent olmayan bağlarla etkileşirler. Bu durumda, proteinlerde konformasyonel değişiklikler ve fonksiyon kaybı meydana gelmektedir (Hirt ve Shinozaki, 2004).

Tuz stresinin bitkilerin büyümesi üzerindeki etkisi, tuzluluğun tipine, uygulama süresine, uygulama şiddetine, bitki türüne ve özellikle stres meydana geldiği zamandaki bitkinin gelişme dönemine bağlı olarak değişmektedir (Li ve diğ., 2003).

Yüksek tuz konsantrasyonu altında bitkilerde meydana gelen önemli fizyolojik değişiklikler arasında yapraklarda klorofil ve karotenoid içeriğinin azalması, fotosentezin indirgenmesi, stomaların kapanıp transpirasyonunun azalması yer almaktadır (Jenks ve Hasegawa, 2005). Ayrıca tuzluluk, bitkilerde çimlenme, büyüme, fotosentez, protein sentezi, enerji ve lipid metabolizması, yaprakta klorosis ve senesens gibi tüm önemli olayları etkilemektedir (Munns, 2002; Munns ve diğ., 2006). Tuzluluk ile yaprakta vakuolleşmeler, endoplazmik retikulumda kısmi şişkinlik, hücrelerarası alanda, mitokondri kristallerinde, kloroplast ve stoma sayılarında azalmaların meydana geldiği görülmektedir (Parida ve Das, 2004a).

Bitkilerin tuza en fazla duyarlı oldukları dönem çimlenme evresidir. Daha sonraki gelişme ve büyüme evrelerinde tuza karşı dayanıklılık artmaktadır (Song ve diğ., 2005; Li ve diğ., 2003). Tuz stresi varlığında, ortamdaki suyun osmotik potansiyelinin artarak

tohumun su alıp şişmesi ile çimlenme ile ilgili fizyolojik olayların başlaması engellenmektedir (Saleki ve diğ., 1993). Tuzluluk ile çimlenmenin inhibisyonunda başlıca kotiledondaki karbonhidrat ve protein depolarının aktifleşmesinde görev alan bazı enzimlerin (α -amilaz, proteaz ve RNaz) aktivitelerinin inhibe olduğu, solunumun engellendiği ve zar permeabilitesinin etkilendiği ileri sürülmüştür (Gomes ve Sodek, 1998).

Çimlenmeyi takiben, bitkinin büyüme evrelerinde kök, gövde ve yaprak gibi bitkinin vejetatif organlarının, tuz uygulamasından sonraki dönemlerde değişik oranlarda etkilendikleri bilinmektedir. Tuzluluğun meydana getirdiği toksik etki, yaşlı yapraklarda genç yapraklardan daha fazla gözlenmektedir (Munns, 2002).

Tuzluluk miktarı çoğu kez gelişim süresini etkilemektedir. Soğanlarda çiçeklenme tuz stresi altında iken daha erken ortaya çıkmaktadır; fakat tuzluluk stresi domatesin çiçeklenmesini geciktirmektedir (Munns, 2002).

Yapılan çalışmalarda NaCl konsantrasyonlarının artışıyla vejetatif büyümenin azaldığı ve yapraklarda zararlanmaların arttığı belirlenmiştir (Dardeniz ve diğ., 2006).

Tuzluluk miktarı, çoğunlukla bitkinin kök bölgesinden alınan doymuş toprak çamuru örneğinde elektriksel iletkenliği (EC) birimi cinsinden hesaplanmakta, zaman ve derinlik bakımından ortalama değeri olarak da verilmektedir. Elektriksel iletkenlik, elektriksel direncin karşılığıdır. Ölçü birimi, decismens/metre yada millimhos/santrimetre'dir. İyonik konsantrasyon artarken elektriksel iletkenlik de artar. 25 °C'de 4 dS/m ve üzeri iletkenlikteki toprak, tuzlu kabul edilir. Tuzun varlığı, toprağın su tutma kapasitesini düşürmektedir (Shannon ve ark, 1994).

2.5. TUZ TOLERANSI

İyonik ve hiperozmotik stresler, bitkilerin hayatta kalmak, tekrar büyümeye devam edebilmek ve gelişebilmek için mücadele etmek zorunda oldukları sekonder metabolik etkilere yol açmaktadırlar (Jenks ve Hasegawa, 2005).

Fizyolojik ve biyokimyasal araştırmalar, halofitlerde tuz toleransının, iyon dağılımı, ozmolit birikimi, çimlenme cevapları, ozmotik adaptasyon, suyu tutma, seçici taşınma ve iyon alımı, enzim cevapları, tuz salınması ve genetik kontrolü içeren bir takım adaptasyonlara dayandığını göstermektedir. Bitkinin tuz toleransı veya direnci bitkinin kök bölgesinde veya yaprakları üzerinde bulunan yüksek oranda tuzların etkilerine dayanmaya yönelik ters bir etkisi olmayan kalıtsal bir yetenek olarak düşünölmektedir (Shannon 1996).

Tuz toleransı, bitkilerin yüksek oranda suda çözülebilir tuz konsantrasyonu içeren bir toprakta büyüyüp kendi yaşam sürelerini tamamlama becerileridir. Rizosferdeki yüksek tuz konsantrasyonlarında yaşayabilen ve iyi büyüyen bitkilere halofitler denir. 200 mM'ın altındaki tuz konsantrasyonlarında zarar gören bitkiler ise halofit olmayan bitkiler olarak tanımlanmaktadır. Halofit olmayan bitkilerin bir kısmı, 200 mM NaCl konsantrasyonunda büyümeye devam edebilirler. Bu bitkiler tuza toleranslı olarak kabul edilmektedirler (Öncel ve Keleş, 2002; Parida ve Das, 2004a; Jenks ve Hasegawa, 2005).

2.6. TUZ TOLERANSINI ARTTIRAN BİYOKİMYASAL VE MOLEKÜLER STRATEJİLER

Bir bitkinin tuz toleransının olabilmesi için iyonik ve ozmotik homeostasin sağlanması gerekmektedir (Jenks ve Hasegawa, 2005). Bitkiler, tuz stresi ile başa çıkabilmek için biyokimyasal ve moleküler mekanizmalar geliştirmektedirler. Tuz toleransını arttıran biyokimyasal stratejiler; iyonların seçici birikmesi (Munns ve Rawson, 1999) veya atılması (Nakamura ve diğ., 2002), iyonların kökler tarafından alınıp yapraklara gönderilmesinin kontrolü, iyonların hücresel veya tüm bitki seviyelerinde bölüştürölmesi, ozmotik düzenleyicilerin sentezi, fotosentez yolundaki değişim, zar

yapısındaki değişim, antioksidatif enzimlerin indüksiyonu ve bitki hormonlarının indüksiyonu şeklindedir (Nakamura ve diğ., 2002; Parida ve Das, 2004b).

Tuz toleransı mekanizmaları ya düşük yada yüksek karmaşıklık mekanizmalarıdır. Düşük karmaşıklık mekanizmaları, birçok biyokimyasal yoldaki değişiklikleri içermektedir. Yüksek karmaşıklık mekanizmaları, fotosentez ve solunum, su kullanım etkinliği gibi büyük prosesleri ve hücre iskeleti, hücre duvarı veya plazma zarı-hücre duvarı etkileşimleri ve kromozom-kromatin yapısı değişiklikleri, yani DNA metillenmesi, poliploidizasyon, spesifik dizilerin amplifikasyonu ve DNA eliminasyonu gibi önemli özellikleri koruyan değişiklikleri içermektedir. Yüksek düzey proseslerin korunması için düşük karmaşıklık mekanizmalarının koordineli olarak indüklendiği düşünülmektedir (Parida ve Das, 2004a).

Tuz toleransını belirleyici genler iki fonksiyonel grupta sınıflandırılmaktadır. Birincisi, stresi yatıştırmak veya strese adaptasyon için gerekli olan işlemlerden sorumlu olan efektörleri kodlayan genlerdir. Bu efektörler, hücreleri yüksek sitoplazmik sodyumdan koruyan taşıyıcılar, çeşitli osmolitlerin biyosentezindeki enzimler, geç embriyonik dönem (LEA) proteinleri, şaperonlar ve detoksifiye edici enzimlerdir. Düzenleyici moleküller ise, transkripsiyon faktörleri ve protein kinazlar benzeri sinyal molekülleridir (Jenks ve Hasegawa, 2005).

Vejetatif dokularda birçok proteinin sentezindeki artış, tuz stresine yanıt olarak oluşmaktadır. Bir çok protein LEA proteinleri ile ilişkilidir. Bu proteinler, osmotik stres sırasında protein yapısını koruyucu şaperonlara benzer özelliklere sahiptirler (Jenks ve Hasegawa, 2005).

Na^+ ve Cl^- iyonları, plazma membran elektrik potansiyelinde değişikliğe yol açarak turgor kaybına sebep olmakta ve hücre hacmi değişir. Yüksek konsantrasyonlarda sodyum, Na^+ spesifik olmayan iyon kanallarından geğer ve membran depolarizasyonuna sebep olur. Membran polarizasyonundaki değişiklik, Ca^{2+} kanallarını aktive etmektedir. Turgor kaybı, hücre hacminde azalmaya ve hücre zarının hücre duvarından içeri çekilmesine sebep olur. Hücre zarının çekilmesi ile, membrana bağlı reseptör kinazlar, iyon taşıyıcı kanallar, hücre duvarı ile ilişkide olan transmembran proteinleri, integrin

benzeri proteinler konformasyonel değişikliğe uğrarlar veya kümelenirler. Böylece de bu proteinler osmotik stres sensörü olarak davranmaktadırlar. İntegrinler ve F-aktin hücre iskeleti, memeli hücrelerinde hücre hacim değişikliklerini algılama ile ilişkilidir. Hücre iskeleti, plazma membranı ve hücrenin farklı organelleri ile bağlantılı olduğundan dolayı, osmotik stres altında hücre hacim değişikliğini algılayabilmekte ve iç Ca^{2+} kanallarına veya sinyal bileşenlerine bunu iletebilmektedir.

Tuz stresi, bitki stres hormonu olan ABA'nın biyosentezini ve birikimini indüklemektedir. Kalsiyum derişimindeki değişiklikler, bitki hücrelerinde stresin tipine, stres gelişim oranına ve doku tipine göre değişiklik göstermektedir. Hücrelerarası veya hücre dışı Ca^{2+} depolarından oluşan sitosolik Ca^{2+} değişiklikleri kuraklık, soğuk ve tuz streslerinde sekonder mesajcı olarak davranmaktadır. Bu dalgalanmalar, tuz stresinin ilk 5-10 saniyesinde oluşmaktadır ve 1-10 dakikaya kadar sürebilmektedir. Bu nedenle de, tuz sinyallerinde en erken olanlardan biri olarak düşünölmektedir (Hirt ve Shinozaki, 2004; Ma ve Wu, 2007).

ABA, çimlenmeden tohum gelişimine kadar bitki büyüme ve gelişiminin birçok evresinde önemli bir role sahiptir. Tuz stresi, ABA birikimini ve doku tipine bağlı olarak da artışı indüklemektedir. Tuz stresi indöklü ABA birikimi, yapraklarda sadece osmotik strese bağlı olsa da, köklerde hem iyonik hem de osmotik strese bağlıdır. Osmotik stres ile turgorun kaybı ABA sentez ve birikimine yol açmaktadır. ABA, ozmolit biyosentezinde yer alan genler ve stomatal regölaşyon vasıtasıyla hücre su dengesini regöle etmektedir. Osmotik stres cevap genleri ve iyon taşıyıcıları tuz stresi altında ABA ile regöle olmaktadır. Tuz stresi ve ABA vakuolar Na^+/H^+ zıt yönlü taşıyıcısını pozitif yönde regöle etmektedir (Hirt ve Shinozaki, 2004).

Sitosolik Ca^{2+} , hücreye giren ve çıkan kalsiyumun net sonucudur. Kalsiyumun dışarı çıkışı, Ca^{2+} ATPazlar H^+/Ca^{2+} zıt yönlü taşıyıcılar vasıtasıyla, içeri girişı ise Ca^{2+} geçirgen iyon kanalları tarafından kontrol edilerek gerçekleşmektedir. Bitkilerde inositol (1,4,5) trifosfat (IP_3) ve siklik adenozin 5'-difosfat riboz (cADPR)- Ca^{2+} kanalları, vakuolar ve endoplazmik retikulum membranlarında ve nikotinik asit adenin dinökleotid fosfat (NAADP)- Ca^{2+} kanalları da endoplazmik retikulum membranında bulunmaktadır.

Cl⁻ sitotoksik olabilmektedirler. Bitki plazma membranları -120 ve 200 mV arasında içsel negatif potansiyele sahiptirler. Sodyumun pasif girişi, sitosolde iyonu apoplasta göre 10³ kattan fazla konsantre edebilmektedir. 100 mM'dan fazla sitosolik Na⁺ konsantrasyonları, hücrenin normal fonksiyonlarını bozmaktadır. Bitkiler ancak sitosoldeki 100 mM'dan küçük Na⁺ konsantrasyonlarına adapte olabilmektedirler. Na⁺'un hücreye girişini önlemek ve azaltmak, sitosolde iyon birikimini önlemekte ve böylece bitkinin tuz toleransı artmaktadır. Hücrede enerji bağımlı Na⁺ akışı, sitoplazmada düşük Na⁺ konsantrasyonu sağlamak için gereklidir. Na⁺ akışı, plazma membran H⁺-ATPaz tarafından oluşturulan H⁺ motive kuvvetini kullanan sekonder aktif plazma membran Na⁺/H⁺ zıt yönlü taşıyıcı ile de oluşmaktadır. Bitkiler ister glükofit ister halofit olsun, sitoplazmalarındaki yüksek miktarda tuzu tolere edemezler. Bu nedenle tuzlu koşullarda fazla tuzu vakuollerde biriktirirler (Parida ve Das, 2004b; Jenks ve Hasegawa, 2005).

Bitkilerde sodyumu potasyuma oranla tamamen dışarı atan taşıyıcı sistemlerin neden gelişmediği sorusunun cevabı, tuzlu koşullarda vakuolar ozmolit olarak sodyuma ihtiyaç duyulmasıdır (Mahajan ve diğ., 2008; Rejili ve diğ., 2008).

Tuz stresi altında iken bitkiler sitosolde yüksek K⁺ konsantrasyonu ve düşük Na⁺ konsantrasyonuna sahiptirler. Bunu, taşıma için itici güç üreten H⁺ pompalarının ve K⁺ ve Na⁺ taşıyıcılarının aktivitesini ve ekspresyonunu düzenleyerek yaparlar (Rejili ve diğ., 2008).

H⁺ pompası, vakuolar tip H⁺-ATPaz (V-ATPaz) ve vakuolar pirofosfat bitkilerin sekresyon yollarının zarlarında beraber bulunurlar. V-ATPaz, çoğu bitki hücresinin endomembranlarındaki dominant H⁺ pompasıdır. Sekonder taşımayı harekete geçirmek, çözücü homeostasisini sağlamak nedeniyle normal koşullarda bitkinin büyümesi açısından vazgeçilmezdir. Tuzluluk, kuraklık, soğuk, asit stresi, oksijen azlığı ve toprakta ağır metallerin fazla olması gibi stres koşulları altında, hücrelerin sağ kalması V-ATPaz'ın aktivitesinin ayarlamasına bağlıdır (Gaxiola ve ark, 2001; Parida ve Das, 2004 b).

Fizyolojik veriler, ana proteinler ile taşınan katyonlar olduklarından dolayı Na^+ 'un hücrelerarası akışta K^+ ile yarıştığını göstermektedir (Mahajan ve diğ., 2008; Rejili ve diğ., 2008).

Bitkinin hücrelerarası K^+/Na^+ dengesini koruması da tuz toleransı için oldukça kritiktir. Na^+ , hücrelerarası alanda K^+ ile düşük ve yüksek affinite taşıyıcı sistemleri ile yarışmakta ve Ca^{2+} , K^+/Na^+ seçici birikimini kolaylaştırmaktadır. Ca^{2+} -yüksek affinite sistemlerinde potasyumun sodyuma oranla daha çok alımı artmaktadır. Ca^{2+} , tuz yüksek hassasiyeti 1 (salt overly sensitive, SOS1) zıt yönlü taşıyıcısının aktivitesini kontrol ederek plazma membranı boyunca net Na^+ akışını regüle eden SOS sinyal yolunu aktive etmektedir (Jenks ve Hasegawa, 2005). K^+ , birçok enzim için kofaktör iken, Na^+ 'un böyle bir görevi yoktur.

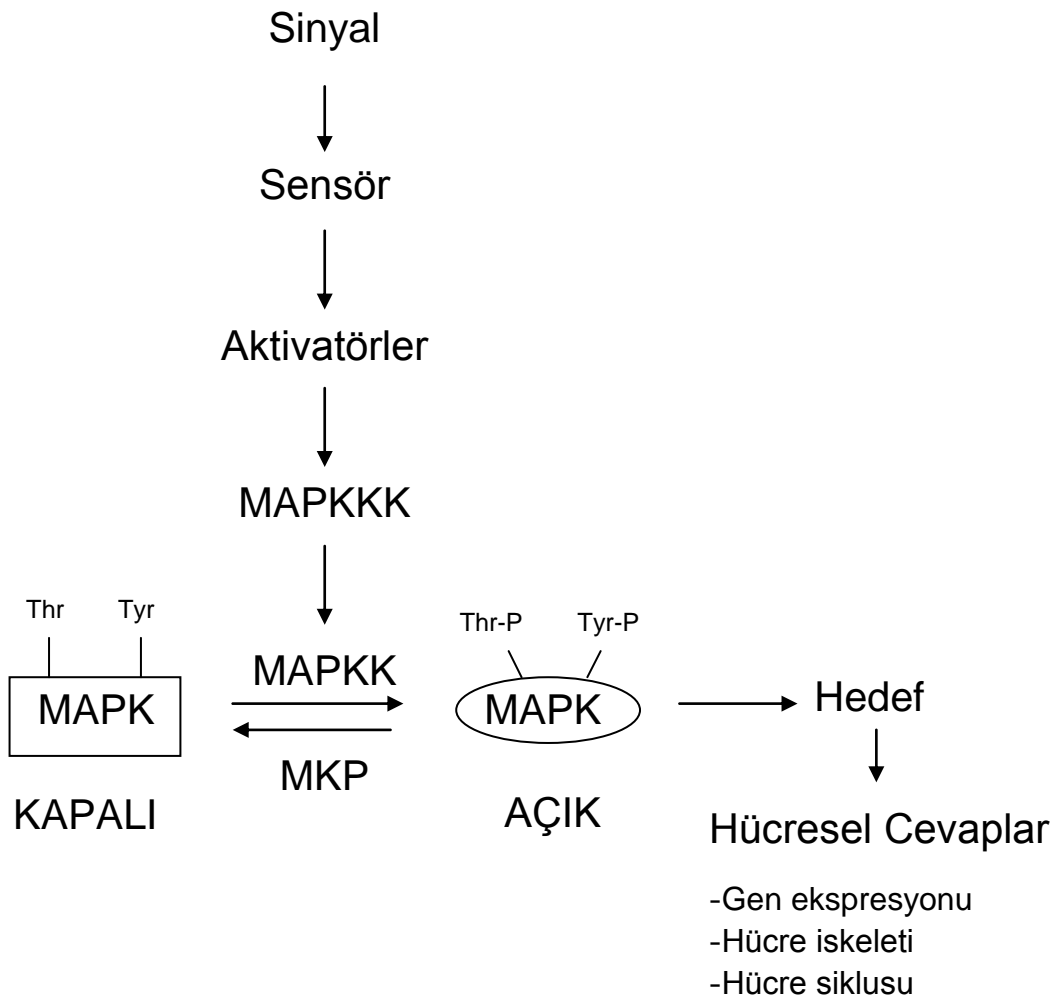
Hücre dışı fazla Na^+ , yüksek bağlanma kuvveti olan potasyum taşıyıcısı (high-affinity potassium transporter, HKT1) ile hücreye girebilmektedir. Genelde bitkilerde, HKT1 hücreye Na^+ girişine düşük affinite göstermektedir. Kök hücrelerine Na^+ girişi, K^+/Na^+ taşıyıcı HKT1 ve seçici olmayan katyon kanallarının veya kök gelişiminde rol alan genlerin regülasyonundan etkilenmektedir (Hirt ve Shinozaki, 2004).

Genetik ve fizyolojik deliller, HKT1'in plazma membranından Na^+ akışını yönlendirdiğini göstermektedir. İndirgenmiş TaHKT1 (*Triticum aestivum* HKT1) aktivitesine sahip antisens buğday hatlarında, artmış tuz toleransı göstermiş ve köklere Na^+ alımında bir azalmanın olduğu belirtilmiştir. Bitkilerde HKT proteinlerinin Na^+ dengesini kontrol ettiği bilinse de, fonksiyonları henüz tam olarak tanımlanamamıştır (Jenks ve Hasegawa, 2005). Ancak yapılan çalışmalarda, HKT1'in, sodyum alımını tuzlu koşullarda yönlendirdiği ve tuz toleransının HKT1 ekspresyonunun azaltılarak düzenlenmesi ile geliştirilebildiği gösterilmiştir (Hirt ve Shinozaki, 2004).

Na^+ konsantrasyonundaki artış, reaktif oksijen türlerinin üretilmesini redüklemektedir (Mahajan ve diğ., 2008; Rejili ve diğ., 2008). Çalışmalar, tuz stresi altında, ROS tarafından oluşturulan sinyallerin Mitojen aktive protein kinaz (MAPK) vasıtasıyla olduğunu göstermektedir. MAPK modülü, mitojen aktive protein kinaz kinaz kinazların (MAPKKK) fosforillenmesi ve aktive edilmesi, defosforillenmesi ve deaktive edici

fosfatazlar arasındaki denge tarafından regüle edilmektedir. Bu negatif regülatörler, serin-treonin fosfatazları, tirozin fosfatazları ve MAP kinaz fosfatazlarından (MPK) oluşmaktadır. MPK ailesinin üyeleri aktivasyon bölgelerindeki Thr-x-Tyr motifindeki hem treonin hem de tirozinin MAPK defosforilasyonu için spesifik inaktivatörlerdir.

Bitki MAPK'ları sinyal oluşumunda, hücre bölünmesinde hormonlar, biyotik ve abiyotik streslerle ilişkilidir. Tuz stresinin alfaalfa, tütün ve Arabidopsis'te MAPK'ları 5-10 dakika gibi kısa bir sürede aktive ettiği gösterilmiştir. H_2O_2 , bekçi hücrelerde ABA sinyalinde bir aracı olarak görünmektedir. Proteinlerin sistidin bakiyelerinin H_2O_2 indüklü oksidasyonu, sinyal araçlarında konformasyonel değişiklikleri beraberinde getirmektedir (Şekil 2.1).



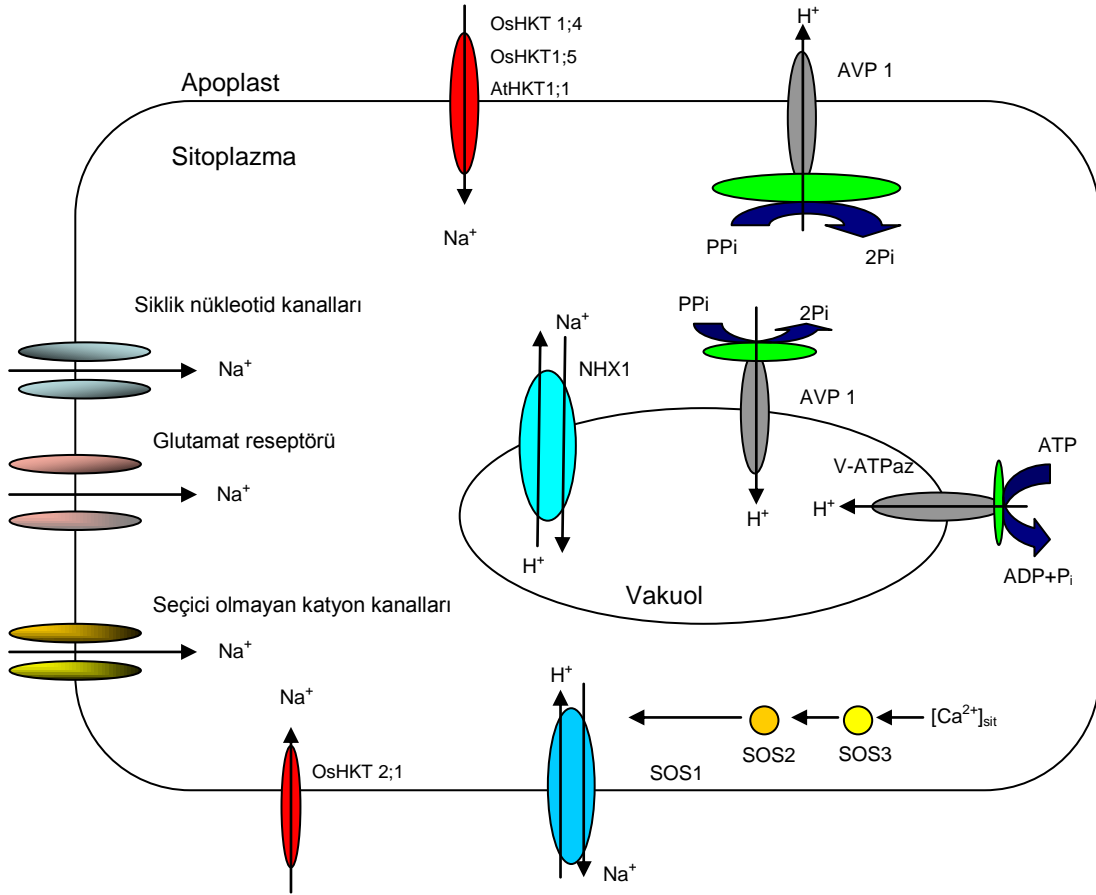
Şekil 2.1. MAP kinaz sinyalleri (Hirt ve Shinozaki, 2004)

Köklerden giren Na^+ yapraklara taşınmaktadır ve sitoplazmada proteinler için toksik olan seviyelere ulaşmadan vakuollerde birikmektedir. Sodyumun vakuollerde biriktirilmesi, sitosolde biyokimyasal reaksiyon bölgelerinde düşük konsantrasyonda Na^+ bulunmasını sağlamak ve osmotik potansiyeli düşük tutmak amacıyla oldukça önemlidir (Hirt ve Sinozaki, 2004).

Sitoplazmadaki tuzun atılması veya vakuollere bölüştürülmesi tuz uyarıcı enzim Na^+/H^+ zıt yönlü taşıyıcı tarafından yapılır (Chen ve diğ., 2007). Na^+ 'un vakuole taşınması kation kation/ H^+ zıt yönlü taşıyıcı ile vakuolar H^+ yerdeğiştirici enzimler, H^+ -ATPaz ve H^+ pirofosfataz ile oluşturulan H^+ elektrokimyasal gradient ile yürütülmektedir (Jenks ve Hasegawa, 2005). Bu birikim, vakuolar Na^+/H^+ zıt yönlü taşıyıcıları (NHX) tarafından yönlendirmektedir. Bu zıt yönlü taşıyıcılar, H^+ değişimi ile vakuole Na^+ girişini gerçekleştirmektedir. Bu giriş, SOS sinyal yolu ile de regüle edilebilmektedir (Jenks ve Wood, 2010).

Arabidopsis'teki NHX zıt yönlü taşıyıcıları, 8 üyesi olan bir gen ailesi tarafından kodlanmaktadır. Bunlardan sadece 1, 7 ve 8 fonksiyonel göreve sahiptirler. NHX7, SOS1 olarak da bilinmektedir; NHX8, Li^+/H^+ zıt yönlü taşıyıcısıdır. Tonoplasttaki NHX zıt yönlü taşıyıcıları, H^+ pompaları, V-tipi ATPaz'lar ve pirofosfatazlar tarafından oluşturulan H^+ elektrokimyasal gradientinden yararlanmaktadır (Chen ve diğ., 2007; Jenks ve Wood, 2010).

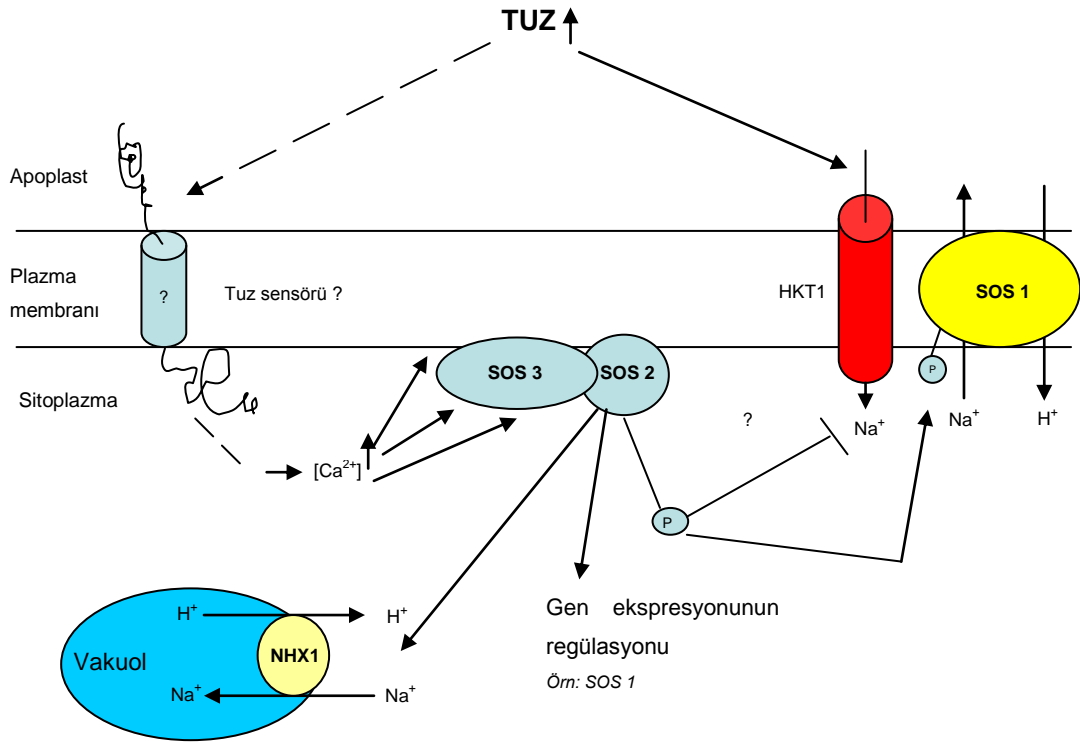
Vakuolar H^+ -pirofosfataz 1 (AVP1) 'in fazla miktarda anlatım yapmasının Na^+ birikimini ve tuz toleransını arttırdığı gösterilmiştir (Gaxiola ve diğ., 2001). Fukuda ve diğ. (2004), arpada vakuolar H^+ -pirofosfataz AVP1'in ve vakuolar Na^+/H^+ zıt yönlü taşıyıcısı NHX1'in tuz stresi altında aynı şekilde artış yönünde regüle olduklarını göstermişlerdir. Bu genlerin kendiliğinden ekspresyonlarının da tuz toleransını arttırdıkları bildirilmiştir (Shi ve Zhu, 2002; Jenks ve Wood, 2010) (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Sürgünlerden Na^+ atılmasında karakterize edilmiş olan iyon taşıyıcıları, kanallar ve pompalar. Hücelere Na^+ girişinden sorumlu olan siklik-nükleotid kanalları glutamat reseptörleri, seçici olmayan katyon kanalları ve HKT taşıyıcıları (OsHKT1;4 (*Oryza sativum* HKT1), OsHKT 1;5, AtHKT1;1 (*Arabidopsis thaliana* HKT1), OsHKT 2;1). Hücreden Na^+ çıkışından sorumlu Na^+/H^+ antitaşıyıcı (SOS1), serin/treonin protein kinaz (SOS2) ile etkileşir. SOS2'de, $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{sit}}$ ile aktive olan kalsiyum bağlayan protein (SOS3) ile etkileşir. Sodyumun vakuolar birikimi, vakuolar Na^+/H^+ zıt yönlü taşıyıcısı (NHX1) tarafından yönlendirilir. Proton gradienti, vakuolar H^+ -pirofosfataz (AVP1) ve vakuolar H^+ -ATPaz tarafından sağlanır (Jenk ve Wood, 2010).

SOS1, Arabidopsis'te tuza hassas mutantlarda tanımlanan ilk lokustur ve plazma membranından enerjiye bağımlı olarak Na^+ taşınmasını yönlendiren Na^+/H^+ zıt yönlü taşıyıcısı SOS1'i kodlamaktadır. SOS1 ekspresyonu, mRNA stabilitesini içeren süreçte NaCl stresi ile regüle olmaktadır. SOS1, P-tipi H^+ -ATPaz'lar tarafından üretilen H^+ elektrokimyasal gradientini plazma membranında taşıma için kullanmaktadır. SOS3, Ca^{2+} bağılı proteini kodlamaktadır. Bu protein, hayvan nöronal kalsiyum sensörlerine ve maya kalsinörünü (kalsiyum ve kalmodulini bağlayan engelleyici protein) düzenleyici alt

ünitesine homologdur. SOS3 tarafından kodlanan miristollenmiş kalsiyum bağlayıcı protein, tuz ile oluşan kalsiyum sinyalini algılar ve bunu cevaplara indirgemektedir. SOS3'ün membran lokalizasyonu, hedef iyon taşıyıcıların regülasyonuna yardımcı olabilmektedir. SOS3, N-terminal kinaz katalitik domaini ve c-terminal düzenleyici bölgeye sahip serin/treonin protein kinaz olan SOS2 ile etkileşir ve onu aktive etmektedir. SOS2 ve SOS3, SOS1'in ekspresyon seviyesini regüle etmektedir. SOS1'in taşıyıcı aktivitesinin aktivasyonu için SOS2 ve SOS3'e ihtiyaç vardır. Tuz stresi varlığında, kök hücrelerinden Na^+ çıkışı ve bitkide uzun mesafe taşınması SOS3-SOS2 kinaz kompleks tarafından regüle edilen SOS1 ile düzenlenmektedir. SOS3 ve SOS2'nin koekspresyonunun, SOS1 ile birlikte tuz toleransını arttırdığı bildirilmiştir (Zhu, 2001; Hirt ve Shinozaki, 2004; Jenks ve Hasegawa, 2005; Cheong ve Yun, 2007; Mahajan ve diğ., 2008) (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Tuz stresi varlığında iyon dengesinin regülasyonunda SOS yolu. Tuz stresi tarafından indüklenen Ca^{2+} sinyali SOS3 tarafından algılanır ve SOS2 kinaz aktif hale gelir. Aktifleşen SOS2 kinaz, SOS1 Na^+/H^+ zıt yönlü taşıyıcısını fosforile eder ve Na^+ , sitosol dışına pompalanır. SOS3-SOS2 kinaz kompleksi ayrıca, SOS1 ve diğer genlerin anlatımını düzenler. Bu kompleks, NHX1'i aktive ederek Na^+ 'un dağılımını regüle ederek, plazma membran Na^+ taşıyıcısı HKT1'in aktivitesini inhibe ederek sitosole sodyum girişini kısıtlar (Hirt ve Shinozaki, 2004).

2.6.1. Tuz Regülasyonunun Diğer Mekanizmaları

Tuz regülasyonunun diğer mekanizmaları; tuz sekresyonu ve seçici tuz birikmesi yada tuzun atılmasıdır. Tuz sekresyonu tuz salgı bezleri adı verilen temel hücrel yapıların geliştirilmesi yoluyla oluşmaktadır. Tuzun atılması ise birçok halofitte yapraklarındaki tuz içeriğini düzenlemek için kökler yolu ile oluşmaktadır. İyonların veya çözücülerin seçici birikimi bitkilerin kütle aksiyonu yolu ile oluşan osmotik ayarlamalar yapabilmelerini sağlamaktadır ve daha fazla su tutulması ve/veya tuzun atılması ile sonuçlanmaktadır (Shannon ve Grieve, 1999; Parida ve Das, 2004a).

Tuza dirençli organizmaların tuz stresine (uzun ve kısa dönemli) hücrel cevabı, osmoprotektan bileşiklerin sentezi ve birikimidir. Bunlar, küçük, toksik olmayan bileşiklerdir; proteinleri ve hücrel yapıları stabilize edebilirler ve hücrenin osmotik basıncını arttırmaktadırlar. Bu cevap, hücre su durumu ve protein bütünlüğü için homeostatiktir. Osmotik olarak aktif bileşiklerin sitosolde birikimi, osmotik potansiyeli arttırmaktadır (Apse ve Blumwald, 2002; Hirt ve Shinozaki, 2004).

Bitkiler özellikle tuz stresi altında osmoregülasyonda görev alan başlıca Na^+ , K^+ gibi inorganik iyonlar ile prolin (amino asit), glisin betain (kuaterner amonyum bileşiği) gibi bazı organik maddeleri yapılarında biriktirirler (Ashraf ve Bashir, 2003; Parida ve Das, 2004a). Ayrıca bitkilerin gliserol, şekerler (glukoz, fruktoz, sukroz), organik asitler ile aminoasitler (glisin, alanin, arginin, sein, lösin, valin, sitrulin ve ornitin), amidler (glutamin, asparagin), imino asitler, proteinler, dehidrinler gibi azot içeren bileşikleri ve poliaminleri biriktirdikleri bilinmektedir (Shannon ve Grieve, 1999; Ashraf, 2004, Umezawa ve diğ., 2006). Tuz stresine maruz kalmış bitkilerde en fazla biriken amino asidin prolin ve osmotik regülasyonda görev alan en önemli maddenin ise glisin betain olduğu bilinmektedir (Hasegawa ve diğ., 2000; Yang ve diğ., 2003; Umezawa ve diğ., 2006).

2.6.2. Prolin

Prolin, kuraklık ve tuz stresi koşullarında birikimi artan, hücrel ozmotik düzenlemede uygun çözünen madde olarak kabul edilmektedir. Prolin, sitoplazmik enzimler için koruyucu bir ajan, hücre içi asiditeyi azaltıcı, stres sonrası büyüme için nitrojen ve

karbon kaynağı, makromolekülleri denatürasyona karşı koruyucu fonksiyonlara sahip bir ozmolittir (Martinez ve diğ., 1996; Liu ve Zhu, 1997; Hmida-Syari ve diğ., 2005; Misra ve Gupta, 2005; Silva-Ortega ve diğ., 2008). Prolin birikimi ile bitkilerin tuz toleransları arasında negatif korelasyonlar da bildirilmektedir. Prolin birikimi, tuz stresi sonucunda oluşabildiği gibi, bitkilerin tuz toleranslarının temelini de oluşturabilmektedir (Jaleel ve diğ., 2007; Banu ve diğ., 2009; Wang ve Han, 2009).

Prolin sentezinin tuzluluğa ve susuzluğa karşı bitki adaptasyonlarından biri olduğu bilinmektedir. Prolin birikimi, tuz stres toleransının seleksiyonunda bir parametre olarak kullanılmaktadır. Her ne kadar prolin birikimi, tuz toleransı için bir markır olarak kabul edilmese de, ısı, kuraklık ve açlık gibi çeşitli stres koşullarında biriktiği gibi bazı tuz stresine maruz kalan bitkilerde miktarının azaldığı da gözlenmiştir (Misra ve Gupta, 2005; Yang ve diğ., 2009). Bazı bitkilerde ise stres sonucunda prolin birikiminde anlamlı bir artış gözlenmediği de rapor edilmiştir. Prolin birikiminin tuz stres hasarının bir reaksiyonu olarak oluştuğu; tuz toleransı ile ilgili bir bitki cevabı olmadığı görüşleri de bildirilmiştir (Misra ve Gupta, 2005).

Yüksek bitkilerde prolin biyosentezi için glutamat veya ornitin kullanılmaktadır. Ozmotik stres altında prolin birikimi, glutamattan *de novo* sentez sonucu oluşmaktadır (Liu ve Zhu, 1997; Jaleel ve diğ., 2007). Delta 1-pirolin-5-karboksilat sentetaz (P5CS), bitkilerde glutamattan prolin biyosentezinin ilk 2 basamağını katalizlemektedir (Silva-Ortega ve diğ., 2008). Bitkiler ayrıca ornitinden ornitin- δ -aminotransferaz (OAT) ile katalizlenen bir reaksiyonla prolin sentezleyebilmektedirler. Bitkilerde OAT, ornitini direkt olarak amino grubu transferi ile glutamik- γ -semialdehit (GSA)'e dönüştürür ve bu da prolin-5-karboksilat (P5C) aracılığıyla proline dönüşmektedir (Yang ve diğ., 2009).

Bitkilerde stres altında prolin birikimi, 2 biyokimyasal yolun karşılıklı regülasyonu P5CS, prolin-5-karboksilat redüktaz (P5CR) ve prolin yıkımının baskılanmış aktivitesi sonucunda oluşmaktadır. Prolin katabolizması, pirolin-5-karboksilat dehidrogenaz ve bir mitokondrial enzim olan prolin dehidrogenaz (PDH) ile katalizlenmektedir. Bu enzimin aktivitesinin tuz stresi sırasında azaldığı gösterilmiştir (Hmida-Sayari ve diğ., 2005; Jaleel ve diğ., 2007; Yang ve diğ., 2009).

2.7. TÜTÜN

Bitki sistematğinde Solanaceae familyası “*Nicotiana*” cinsi içerisinde yer alan bir yıllık ve çift çenekli bir bitki olan tütün hem ülkemizde, hem de dünyanın diğer ülkelerinde ekonomik ve tarımsal öneme sahiptir.

48 kromozomlu olan tütün bitkisinin dizi analizi, genom projesi kapsamında yapılmış olup genomu 4500 mbp büyüklüğündedir (NCBI).

Keyif verici yaprakları için yetiştirilen tütünün anavatanı Orta ve Güney Amerika’dır. 16. yüzyılda Avrupa’ya getirilen tütün, önceleri süs bitkisi sonraları ise şifa bitkisi olarak kullanılmıştır. Yaklaşık 400 yıl kadar önce (1600–1605), büyük yapraklı ve kaba dokulu ilkel biçimde bir bitki olarak ülkemize girmiş bulunan tütünün genel üreticileri Çin, ABD, Hindistan, Brezilya, İtalya, Yunanistan ve Türkiye’dir. Çeşitli iklim ve toprak koşullarına rahatlıkla uyum sağlama yeteneğine sahip olan tütün bitkisi, Anadolu yarımadasının bilhassa tütün üretim bölgelerinde bulunduğu uygun toprak ve iklim koşullarının, belirgin farklar göstermesi sonucu, her bölgede birbirinden değişik özelliklerle ayrılan ve kalite değerleri yüksek olan çeşitli hatların oluşmasına neden olmuştur (Peksüslü ve Gencer, 2002).

Haziran-Ağustos ayları arasında çiçek açan ve 0.75-1.5 m boylarında olan tütün bitkisinin, gövdeleri dik, silindir şeklinde, tüylü ve yapışkanlıdır. Yapraklar sapsız veya kısa saplı, büyük oval, tüylü ve yapışkan, özel kokulu ve acı lezzetlidir. Çiçekler tepede salkım durumunda bulunurlar. Tüp şeklinde, pembemsi-kırmızı renkli, tüylü ve beş sivri dişli çiçeklere sahiptir. Meyveleri uzunca ve oval şekilli küçük tohumludur.

Tütün kazık köklü bir bitki olup, Türk tütünlerinin boyu 100 cm civarındadır. Yaprak, tütün bitkisinin en önemli ve kullanılan kısmıdır. Tütün yapraklarının şekil ve büyüklükleri çok çeşitli ve farklıdır.

Tütün yapraklarında tanen, zank, nişasta, reçine ve alkaloitler bulunur. Bu alkaloitler içinde miktarı en fazla olan nikotin alkaloididir ve kötü kokuludur. Tohumlarda nikotin bulunmaz. Nikotin miktarı, bitkinin yaşı ile artar. Yapraklar %2-8 oranında nikotini malat ve sitratla kombine olarak içerirler. Olgun bitkide nikotin dağılımı değişiklik göstermekle birlikte genellikle yapraklarda total nikotinin %64'ü, gövdede % 18'i, kökte %13'ü ve çiçeklerde de %5 oranında bulunmaktadır.

Dünyada oryantal tip tütün üreten ülkeler arasında hem kalite değerleri hem de üretim miktarları yönünden Türkiye daima ilk sırayı almıştır.

Türkiye'de Ege bölgesinde İzmir tütünleri, Karadeniz bölgesinde Samsun, Bafra, Alaçam, Sinop, Taşova, Basma, Trabzon, Artvin ve Pazar tütünleri, Marmara bölgesinde Bursa, İzmit, Düzce, Hendek, Balıkesir ve Edirne tütünleri, Doğu ve Güneydoğu bölgesinde ise Yayladağ, Bitlis, Adıyaman ve diğer Doğu ve Güneydoğu tütünleri bulunmaktadır.

İzmir Tütünleri, Ege çevresinin İzmir, Manisa, Muğla, Aydın, Denizli ile Balıkesir, Uşak, Isparta ve Kütahya'nın bazı ilçelerinde üretilmektedir.

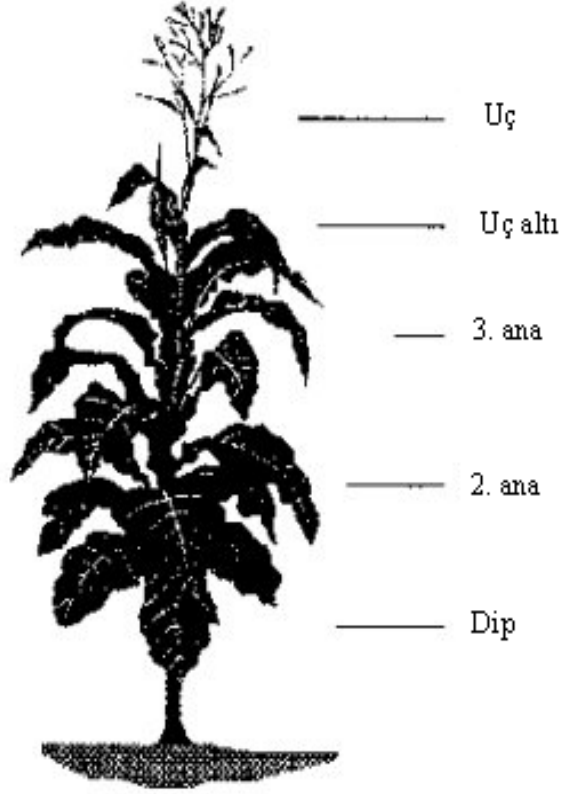
İzmir tütünleri arasında az çok kalite farkları varsa da diğer bölgelere göre en yeknesak bölgedir. İzmir tütünün kökeni "Yenice Basması" olmakla beraber Ege toprak ve iklim koşullarına uymuş ve aslı olan Yenice Basmasından endüstriyel nitelikleri daha üstün olan bugünkü İzmir tütünü meydana gelmiştir. İzmir tütünlerinin yaprakları genellikle küçük boyda, sapsız, formu geniş elips biçiminde olup Basma tütünlerine benzemektedir. Renkleri açık sarı, sarı ve bunlar yeşilimsi ve kırmızımsı arasında değişmektedir. Bazı üst el yapraklarında olgunluğa ve pişkinliğe işaret sayılan koyu kahverengi benekler vardır. Yetiştigi ortamın toprak ve iklim koşullarının etkisiyle dokunun sık dizilmiş küçük ve dolgun hücrelerden oluşmuş olması sebebiyle higroskopisite nitelikleri iyidir.

En kokulu tütünler, Akhisar ve Gavurköy ekim alanlarında yetişir. Sındırgı, Soma Kırkağaç ve Manisa'nın bir çok yerlerinde de kokulu tütünler yetişmektedir. İzmir'in yakınlarındaki yetişen tütünlerin renkleri daha açık, dokuları daha ince ve yaprakları daha büyüktür.

İçim özelliklerini, fizyolojik etki gücünü çok yavaş, lezzetini çok tatlı ve aromatik kokulu olarak tanımlayabiliriz. Çok yavaş ve çok tatlı içim niteliği ancak İzmir tütünleri için doğru ve geçerli olabilir.

İzmir tütünleri kimyasal yapısında nikotin ve proteinli maddeler miktarının çok düşük buna karşılık seker miktarının yüksek olması ile tanınmışlardır. Ortalama nikotin oranı %0.70'in altında olup nikotini %0.25'e kadar düşük örneklere rastlanır. Protein azotu miktarı %0.90–1.30, total indirgen madde miktarı %15–20 arasında değişmektedir.

Tütün, bitkisi üzerinde birbirine en yakın olan, aynı zamanda olgunluk derecesine erişen ve toplanan 3-4 tane yapraktan oluşan yaprak gruplarına *el* denir. Eller, dip, dip üstü, 1. ana, 2. ana, 3. ana, uç altı ve uç gibi terimlerle adlandırılmaktadır. Tütün bitkisinde olgunlaşma alt yapraklardan yukarıya doğru olmaktadır (Şekil 2.4). Kırım işlemi yapraklar teknik olgunluğa geldiğinde yapılmaktadır. Bitkinin teknik olgunluğa ulaştığı, büyümenin durması, yaprak kenarlarının sararması, yaprak yüzeyi tüylü olan çeşitlerde tüylerin düşmesi ile anlaşılmaktadır.



Şekil 2.4 Tütün bitkisinde olgunlaşma

(<http://www.alpinelink.com.au/tobaccoproduction/index.shtml>)

Tütün bitkisinde nikotin, en az sapta, sıra ile çiçek, primer kök ve sekonder köklerde bulunmaktadır. En yüksek seviyesi yapraklarda gözlenmektedir. Saptan uca ve orta damardan kenara doğru gittikçe nikotin miktarı azalmaktadır. Bitkide olgunluk, nikotin oranını artırıcı bir etkidir. Tütün bitkisinde nikotin miktarı kırımlara göre, dipten uca doğru gidildikçe artış göstermektedir (Xi ve diğ., 2005; Shi ve diğ., 2006).

Tütün kimyası tarifinde karbonhidratlar terimi statik ve dinamik olarak ayrılmaktadır. Tütün kimyasında sadece karbonhidratlar demekle dinamik olanlar kast edilir. Bunların başlıcaları şekerler, nişasta ve dekstrindir. Tütün yapraklarında indirgen şeker oranı kırımlara göre, 2. ve 3. ana ellerde artış gösterirken uç ve uç altında azalma göstermektedir (Sarıoğlu, 1976).

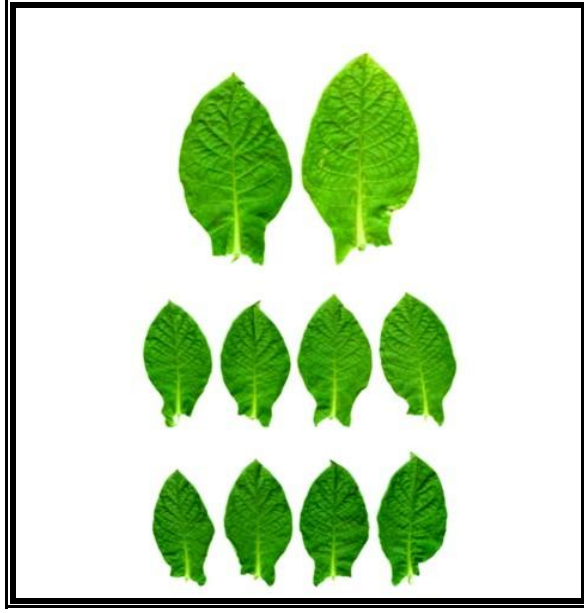
Tütün bitkisi sahip olduğu çeşit bolluğu, görünür özelliklerin zenginliği, çaprazlamasının kolay olması, kendine döllendir bir bitki olması, çok fazla sayıda tohum alımına imkan vermesi ve tohumların uzun yıllar çimlenme yeteneklerini muhafaza etmeleri, doku kültüründe hızlı rejenrasyon yeteneğine sahip olması ile ekonomik öneminin yanısıra moleküler biyoloji çalışmalarında model organizma haline gelmiştir.

Çalışmamızda model olarak 2 çeşit İzmir tütünü kullanılmıştır. Bunlar Akhisar 97 ve İzmir Özbaş çeşitleridir.

2.7.1. İzmir Özbaş

İzmir Özbaş tütün çeşidi orta-uzun boylu, sık yapraklı (26-48, ortalama 42) olup, yaprak şekli; yaşmaklı, karınlı ve küt uçludur. Yaprak yüzeyi hafif kabarcıklı ve açık yeşil renktedir, yaprak dokusu Karabağlar çeşidine göre daha kalındır. Çiçek salkımı toplu ve açık pembe renktedir (Şekil 2.5 ve 2.6). Bu çeşit, mavi küfe dayanıklı, kuraklığa oldukça dayanıklıdır. Orta erkencidir. Verim ve kalitesi iyidir. Verimi toprak ve iklim koşullarına göre değişir (80-150 kg/da). Kuru yaprak rengi yeşilimsi-sarı renkte, yanması orta, elastikiyet ve randımanı iyi, tatlı ve yavaş içimlidir (Peksüslü ve Gencer, 2002).

Bu tütün çeşidi, özellikle tınlı-kumlu tipte arazide çok iyi netice vermiştir. Killi, kökü sıkkan bünyeye sahip topraklarda verimde düşüş söz konusudur. Mavi küfe dayanıklı olduğu için erken dikimde yarar vardır. Geç dikimde ve yağışın olmadığı durumlarda ilk dönemde bir sulama yapılması gerekebilir. Hasatta olgunlaşan yaprakları uzun süre yanmadan tarlada kalabilmektedir. Yaprak diziliş ve turgorunu uzun süre koruması nedeniyle kırımı kolaydır.



Şekil 2.5 İzmir Özbaş tütün (*Nicotiana tabacum* L.) çeşidine ait bitkilerin yapraklarının genel görünümü

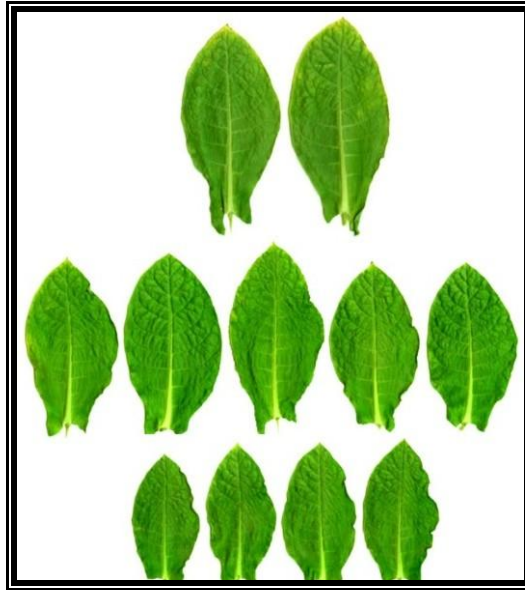


Şekil 2.6 İzmir Özbaş tütün (*Nicotiana tabacum* L.) çeşidine ait tütün bitkisinin görünümü

2.7.2. Akhisar 97

Akhisar 97 tütün çeşidi, orta-uzun boyludur. Bitki boyu uzadığı halde, yaprak boyu fazla uzamaz. Sık yapraklı (30-50, ortalama 45), yaprak rengi açık sarımsı-yeşildir (Şekil 2.7 ve 2.8). Mavi küfe ve kuraklığa oldukça dayanıklı olan Akhisar 97 çeşidi orta erkenci (İzmir Özbaş'a göre biraz geççi) bir çeşittir. Verim ve kalitesi iyidir. Verimi toprak ve iklim koşuluna göre değişir (85-150 kg/da, standart çeşide göre % 10-20 daha fazla).

Mavi küfe dayanıklı olduğu için erken dikimde yarar vardır. Geç dikimde ve yağışın olmadığı durumlarda ilk dönemde bir sulama yapılması gerekebilir. Hasatta olgunlaşan yaprakları uzun süre yanmadan tarlada kalabilmektedir.



Şekil 2.7 Akhisar 97 tütün (*Nicotiana tabacum* L.) çeşidine ait bitkilerin yapraklarının genel görünümü



Şekil 2.8 Akhisar 97 tütün (*Nicotiana tabacum* L.) çeşidine ait bitkinin genel görünümü

2.8. MUTAJENİK RADYASYON

Bitkilerde genetik çeşitliliğin artırılmasında rol oynayan etkenler arasında en çok kullanılanlar hibridizasyon, rekombinasyon, spontan veya teşvik edilen mutasyonlardır. Spontan mutasyonların meydana gelme oranı çok düşüktür. Mutajenler ile teşvik edilen mutasyon uygulamaları ile istenen özellik yönünden mutasyon oranının artırılması amaçlanmaktadır. Mutajenler, canlı **organizmaların DNA** veya **RNA** moleküllerinin zincirlerinin **moleküler** yapısını değiştirerek söz konusu organizmanın doğal olarak beklenen seviyenin çok üzerinde **mutasyona** uğramasına sebep olan **fiziksel** veya **kimyasal** etmenlerdir. Fiziksel mutajenlerle mutasyon oluşturma çalışmaları ABD'li genetikçi Müller'in (1927), *Drosophila melanogaster* ve 1928 yılında Stadler'in mısır ve arpa bitkisi üzerinde X ışınları ile çeşitli mutasyonları elde etmesiyle başlamıştır. İyonize edici radyasyonların kullanılmasıyla birçok kültür bitkisinde çeşitli özelliklerin geliştirilmesi sağlanmıştır.

İyonlaştırıcı radyasyonların canlı sistemlerde meydana getirdikleri fizikokimyasal değişiklikler ile bunları takiben canlıda gelişen biyolojik sonuçların incelenmesi son derece önemli olmuştur. Çünkü, iyonize radyasyonların neden olduğu iyonizasyon ve uyarılma sonucunda ortaya çıkan reaksiyonlar, DNA yapısında hem baz değişikliklerine

hem de DNA iskeletinde kırılmalara neden olur (Briggs and Constantin, 1977; Özalpan, 2001).

X ve gama ışınları, α ve β partikülleri, protonlar ve nötronlar iyonize radyasyon tiplerini oluşturmaktadır (Briggs and Constantin, 1977; Özalpan, 2001). X ve gama ışınları, elektromanyetik radyasyonlar olarak adlandırılır. Radyasyonların madde ile etkileşimleri açısından birbirlerine benzemektedirler ancak meydana geliş şekilleri farklılık göstermektedir. X ışınları çekirdek dışında oluşan elektron kaynaklı ışınlardır. Gama ışınları ise, atom çekirdeğinin içinde oluşur (Conger ve diğ., 1977; Özalpan, 2001).

Gama ışınları, radyoaktif bir çekirdeğin bozunarak daha kararlı bir hale geçmesi sırasında açığa çıkan enerjinin çekirdekten dışarı atılması sonucunda oluşmaktadır. Gama ışınları kısa dalga boyuna sahiptirler ve böylece fotonlarda X ışınlarından daha fazla enerji bulundurmaktadır. Kobalt 60 (^{60}Co) ve Sezyum 137 (^{137}Cs) gama radyasyonu uygulamalarında en çok kullanılan kaynaklardır. ^{137}Cs , ^{60}Co 'a göre daha uzun bir yarı ömre sahip olması nedeniyle birçok uygulamada tercih edilmektedir (Briggs ve Constantin, 1977; Özalpan, 2001).

Radyasyonun canlı sistemlerde meydana getirdikleri etkileri, direkt veya indirekt olarak sınıflandırılmaktadır. Radyasyonun etkisinin ilk kademesi fiziksel kademe olarak adlandırılır. Bu kademedede maddenin moleküllerinde iyonlaşma yada uyarılmalar meydana gelir. Bu iyonlaşmalar sonucunda oluşan serbest elektronlar komşu atomlarda iyonlaşmalara yol açarak zincirleme iyonlaşma olayları meydana gelir. İlk reaksiyonlarda oluşan ürünler kararsızdır ve ikincil reaksiyonlar meydana gelir. Bu ikinci aşamaya, kimyasal kademe denir. Bu evrede, iyonize radyasyonların, atom ve moleküllerle etkileşmesi sonucunda hücrelerde serbest radikaller oluşur. Serbest radikaller, iyonların veya uyarılmış moleküllerin ayrılmaları sonucunda oluşan, dış yörüngelerinde eşleşmemiş bir elektrona sahip ve genellikle elektriksel açıdan yüksüz atom ya da moleküllerdir. Serbest radikaller, oldukça reaktiflerdir ve diğer atom veya moleküllerle reaksiyona kolaylıkla girebilirler.

Serbest radikaller önemli hücre bileşenleri ile reaksiyona girerek bitki hücrelerinde hasara yol açmaktadırlar. Oluşan değişikliklerin ışınlama derecesine bağlı olarak bitkilerin morfolojisini, anatomisini, biyokimyasını veya fizyolojisini etkiledikleri bildirilmiştir. Bu etkiler, tilakoid membranlarda genişleme, fotosentezin değişmesi, antioksidatif sistemin düzenlenmesi ve fenolik bileşiklerin birikmesi gibi bitki hücre yapısında ve metabolizmasındaki değişiklikleri içermektedir (Özalpan, 2001; Wi ve diğ., 2007; Al-Rumaih ve Al-Rumaih, 2008).

Canlıların, büyük oranda su içermeleri nedeniyle ışınlama esnasında, radyasyon enerjisinin büyük bir kısmı su molekülleri tarafından absorblanmaktadır. Bu kademe üçüncü aşama olan biyolojik kademelerin başlamasına sebep olur. Biyolojik hasarlar açısından değerlendirildiğinde, canlı maddenin su içeriğinin fazla olması nedeniyle, radyasyonun indirekt etkileri, direkt etkilerinden daha önemlidir (Conger ve diğ., 1977; Özalpan, 2001; Wi ve diğ., 2007).

Hücrelerin %70-80 oranında su içermesi nedeniyle radyasyon, su moleküllerini etkileyecektir. Sonuçta hidrojen peroksit (H_2O_2), süperoksit anyonu (O_2^-), hidroksil radikalleri (OH) ve singlet oksijen gibi reaktif oksijen türleri (ROS) oluşmaktadır. Bütün ROS'lar, normal bitki büyüme koşullarında hücrelerde bulunan normal bir metabolittir ve belli bir konsantrasyonda belirgin toksisitesi yoktur. Ancak, çevresel stresler veya iyonize radyasyon ile konsantrasyonu artınca, hücre ölümüne yol açmaktadır. İyonize radyasyonun organizmalardaki en baskın etkisi olan suyun hidrolizinin bahsedildiği şekilde ROS oluşumunu indüklediği belirtilmiştir. Oluşan ROS'ların zararları etkilerini önlemek amacıyla antioksidant sistemde görevli enzimler, hücresel korumayı sağlamaktadırlar (Riley, 1994; Wi ve diğ., 2007; Al-Rumaih ve diğ., 2008; Constantinovici ve diğ., 2009; Vandenhove ve diğ., 2009). Ancak, burada radyasyonun dozu çok önemlidir.

Biyolojik kademedeki reaksiyonlar ile başlayan olaylar, DNA molekülünde hasar oluşumlarıyla devam eder. Radyasyon DNA molekülünde yapısal hasarlara neden olur. Baz hasarları, zincir kırılmaları, baz kayıpları, çapraz bağlanmalar meydana gelebilir. Zincir kırılmaları en önemli hasarlardandır. Bu hasarlar tek zincir ve çift zincir kırılmaları şeklinde oluşabilmektedir. DNA iskeletinin kırılması sonucunda oluşan

anormallikler eğer uygulanan radyasyon, kromozom replikasyonundan önce yani G₁ fazında ise, kromozom tipi anormallikleri, sentez fazının sonunda yani G₂ fazında uygulanırsa kromatid tipi anormallikleri oluşturur. Bu anormallikler sonucunda disentrik kromozomlar, anafaz köprüleri, halka kromozomlar, parça değiş-tokuşları ve asentrik kromozom parçaları ortaya çıkar. Bu olay sonucunda da kromozom yapı ve sayı değişimleri meydana gelir (Conger ve diğ., 1977; Alikamanoğlu, 1999; Özalpan, 2001).

Radyasyonun DNA molekülünde oluşturduğu yapısal hasarların bir sonucu olarak fonksiyonlarında da kayıplara uğramaktadır. Radyasyon uygulaması ile en önemli fonksiyonları olan kendini eşleme (replikasyon) ve mRNA sentezi (transkripsiyon) olaylarında kalıp özelliğinde kayıplar olduğu gösterilmiştir (Briggs ve Constatin, 1977; Özalpan, 2001).

Radyasyonun DNA molekülü üzerindeki etkilerinin giderilmesi için onarım mekanizmaları devreye girmektedir. Normal koşullarda DNA sentezinin yapılmadığı G₁ ve G₂ evrelerinde de hasar onarımı söz konusudur. Ancak çift zincirde kırılma meydana gelmişse bunun onarılması son derece güçleşir (Conger ve diğ., 1977; Özalpan, 2001).

Gama radyasyonlarının bitki gelişimi üzerine etkileri birçok çalışma ile ortaya konmuştur. Farklı radyasyon dozlarında ışınlanmış bitkilerde çimlenmede, sürgün büyümesinde ve diğer fizyolojik olaylardaki etkileri gözlenirken, belirli dozların üzerinde canlılığa ölümle sınır koymaktadır (Özbek ve Atak, 1984; Özbek ve diğ., 1990; Atak, 1991; Alikamanoğlu ve Atak, 1994; Conger ve diğ., 1997; Montalván ve Ando, 1998; Atak ve diğ., 1999; Ahloowalia ve Maluszynski, 2001; Wi ve diğ., 2007).

Witjaksono ve Litz (2004), avokado embriyo kültürlerinde *in vitro* koşullarda gama radyasyonu kullanmışlar ve çalışmada 0, 1, 5, 10, 25 ve 50 Gy gama radyasyon dozlarında ışınlanan embriyonik kültürlerde çimlenme, sürgün gelişimlerinde farklılıklar gözlemlendiği bildirilmiştir.

Başer ve diğ. (2007), iki farklı makarnalık buğday çeşidinde gama radyasyonunda ⁶⁰Co kaynağından 100, 200, 300, 400, 500 ve 600 Gy dozlarda ışınlama yapılmış ve çeşitlerin

genel kalite özellikleri korunarak, kısa boylu genotipleri elde etmeyi planlamışlardır. Uygulanan radyasyon dozunun artmasıyla tohumların çimlenme oranlarında azalma görüldüğü bildirilmiştir.

Berenschot ve diğ. (2008), petunya bitkisinde fiziksel ve kimyasal ajanların mutant popülasyonu yaratmadaki etkinliklerini karşılaştırmışlardır. 0, 20, 40, 60, 80 ve 100 Gy dozlarda gama radyasyonu ile % 0, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, ve 0.25 etil metan sülfonat ile tohumları muamele etmişlerdir. Yüksek mutajen dozlarının yaşayan bitki sayısını azalttığını bildirilmiştir.

2.8.1. Mutasyon İslahı

Tarım alanında verim potansiyeli yüksek yeni varyetelerin geliştirilmesi ve bu varyetelerin ıslahı çok önemli bir yere sahiptir.

Bitki ıslahında uygulanan yöntemleri klasik ve modern ıslah metodları olmak üzere ikiye ayırabiliriz. Klasik ıslah metodları, uzun zaman gerektirmeleri, çok sayıda iş gücüne ve çok sayıda bitki materyaline ihtiyaç duymaları ve çalışılan materyalin mevcut genetik varyetelerle sınırlı kalması nedeniyle, yeni metodların geliştirilmesine ihtiyaç duyulmuştur.

Bitki ıslahı çalışmalarında amaç, çeşitli teknikleri kullanarak bitki türlerinde varyasyon çeşitliliği yaratmak ve bu çeşitlilik içinden ıslahçının amacına uygun nitelik ve niceliklere sahip bitkilerin seçilip geliştirilmesidir. Ziraat alanında geliştirilmesine ihtiyaç duyulan özellikler arasında yüksek verim, hastalıklara, pestisitlere, kuraklığa, tuzluluğa, zararlılara dayanıklı, yağ ve protein içeriği bakımından zenginlik sayılabilmektedir. Kültür bitkilerinde istenilen özelliklerin kazandırılmasında, kalıtsal yapıda mutasyon oluşturacak yöntemlerin kullanılması, kısa zamanda yeni çeşitleri ortaya çıkarmaktadır. Bu amaçla çeşitli mutasyon oluşturucu ajanlar (Mutajenler) kullanılmaktadır (Predieri ve Virgilio, 2007; Sayed ve diğ., 2007).

Yapılan araştırmalar, kültür bitkilerinde mutajenlerin uygun doz ve srelerde kullanılmalarıyla istenilen karakterler açısından faydalı bireylerin oluşturulmasında önemli adımlar atılabileceğini göstermişlerdir (Das ve diğ., 2000).

Bitki geliştirilmesinde amaca uygun genetik etkiye sahip uygulamalar tercih edilmektedir. Mümkün olduğunca az fizyolojik zararlanma oluşturması ancak buna karşılık yüksek oranda genetik varyasyon yaratması istenmektedir. Her ikisinin de artması sonucunda bitki yaşamını devam ettirememektedir. Bu nedenle doz sınırlarının doğru bir şekilde belirlenebilmesi son derece önemlidir. GR₅₀ dozu, fide boyunu kontrol bitkisine göre %50 azaltan mutajen dozudur. Bu değer her bitki için farklıdır ve n denemelerle belirlenmelidir. Bitki ışlah çalışmalarında tercih edilen dozlar, GR₃₀ ile GR₅₀ arasındaki dozlardır (Conger ve diğ., 1977; Atak ve diğ., 1999; zalpan, 2001; Durovi ve diğ., 2004; Dardeniz ve diğ., 2006).

Fiziksel ve kimyasal mutajenler, mutasyon frekansını arttırmak üzere *in vivo* ve *in vitro* tekniklerle beraber kullanılmaktadır.

Fiziksel mutajen olarak gama radyasyonunun kullanılmasıyla birçok bitkide iyileştirilmiş özelliklere sahip yeni çeşitler elde edilmiştir. Uluslararası Atom Enerji Ajansı (IAEA)'nın 2009 senesinde yayınlanan raporlarına göre, dünya genelinde 60'dan fazla ülkede 170 farklı bitki türünde 2700 mutant varyete bulunmaktadır. Geliştirilen varyetelerin %88'i fiziksel, % 10'u kimyasal mutajen kullanılarak geliştirildiği belirtilmiştir. Bunlar arasında, in'de tuzluluğa dirençli pirinç, Hindistan'da sıcağa toleranslı buğday, Pakistan'da verimi yüksek pamuk, Küba ve Kosta Rika'da hastalığa dirençli muz, lahana bitkisinde erkencilik, krizantem bitkisinde iek rengi, susam bitkisinde yağ, protein ve verim kalitesi gibi özellikleri taşıyan bireyler geliştirilmiştir (Alikamanoğlu, 1999; Ahloowalia ve Maluszynski, 2001; IAEA, 2009).

zbek ve diğ. (1990), soya bitkisinin verim ve yağ içeriğini arttırmak üzere yaptıkları çalışmada, ⁶⁰Co kaynağında 50, 100, 150, 200 ve 250 Gy ile ışınladıkları soya hatlarında, elde edilen mutant bireylerin kontrol bitkilerine göre yağ miktarlarında ve verimlerinde artış gözlendiği bildirilmiştir.

Beltagi ve diğ.(2006), fasülye tohumlarını 0, 20 ve 320 Gy gama radyasyonuna ve 0, 1000, 2000 ve 3000 ppm NaCl'e maruz bırakmışlardır. En yüksek tuz konsantrasyonunda, sürgün boyunda önemli bir azalma görüldüğü, kök boyunun ise tüm tuz uygulamalarında inhibe olduğu bildirilmiştir.

Sayed ve diğ.(2007), 2 farklı buğday çeşidine ait tohumlardan gelişen embriyonik kallusların farklı dozlarda gama radyasyonu ile ışlandıktan sonra % 0, 0.9 ve 1.2 NaCl içeren ortamlarda tuz toleransları karşılaştırılmıştır. 120 Gy ile ışlanan ve %1.2 NaCl içeren ortamda gelişen kallusların prolin içeriğinin en yüksek düzeyde olduğu gözlenmiştir.

Sorgum tohumları ⁶⁰Co kaynağında 0, 450, 500, 600 Gy'lik gama radyasyon dozlarında ışlandıktan 15 gün sonra 0, 15 ve 30 dS m⁻¹ konsantrasyonlarında tuz stresine maruz bırakılmışlardır. 500 ve 600 Gy radyasyon doz uygulamalarında tüm bireylerin öldüğü belirtilmiştir. Tuzluluğa dirençli sorgum genotiplerinin seleksiyonu içinde 14-26 dS m⁻¹ olarak belirlenmiştir (Tabosa ve diğ., 2007).

Lee ve diğ. (2003), 0, 30, 50, 70 ve 90 Gy gama radyasyon dozları ile ışladıkları pirinç bitkisinden gelişen kallusları %1.5 NaCl içeren besin ortamında kültüre almışlardır. Tuz toleranslı kallusların, 0-50 Gy dozlarının kullanılmasıyla elde edildikleri bildirilmiştir.

Şeker kamışına ait embriyonik kallus kültürleri 0, 10, 20, 30, 40 ve 50 Gy gama radyasyon dozlarına maruz bırakılmışlardır. Kallus kültürleri, farklı dozlarda NaCl ve PEG-8000 ile muamele edilmişlerdir. Elde edilen mutant bireylerin aralarındaki farklılıklar RAPD analizi ile ortaya konmuştur (Patade ve diğ., 2006).

Radyasyonun biyolojik yapılar üzerindeki etkilerini değiştiren çok sayıda biyolojik, çevresel ve kimyasal faktör bulunmaktadır. Bu faktörler doz başına oluşan mutasyon oranını etkiledikleri gibi, kromozom kırıklarına yol açan mutasyon oranlarını da etkilemektedir.

İyonize edici radyasyonlarla yapılan çalışmalarda, çalışmanın amacına göre bitkilerin çeşitli kısımları kullanılabilir (Briggs ve Constantin, 1977; Atak ve diğ., 1999). Tohumlar, birçok farklı fiziksel çevrede ışınlanabilmektedirler. Tohumlar kuru iken hemen hemen biyolojik aktivitesi minimum olduğundan radyasyonun zararlı etkisi çok fazla görülmez. Ancak yeterli genetik etkiyi oluşturabilmek için, diğer bitki kısımlarına göre daha yüksek radyasyon dozları kullanılmasını gerektirmektedir. Bu nedenlerle tohumlar, mutasyon çalışmalarında genellikle tercih edilmektedir. Tohum ışınlanmasında en önemli iki faktör, oksijen ve su içeriğidir (Conger ve diğ., 1977).

Yüksek bitkilerin hücrelerinin fiziksel ve kimyasal mutajenlere cevapları çeşitli biyolojik, çevresel ve kimyasal faktörler tarafından etkilenmektedir. Bu faktörler mutajenin verimliliğini ve etkinliğini modifiye etmektedirler. Su ve oksijen oranı, tohumun radyasyona karşı duyarlılığının değişmesinde oldukça büyük bir öneme sahiptirler. Aktif olarak büyüyen bir bitkinin ışınlanmasında ise, DNA ile ilgili sentez safhaları ve kullanılacak olan doz daha da önem kazanmaktadır (Conger ve diğ., 1977; Özalpan, 2001).

Mutasyon ıslahı çalışmalarında, istenilen karakterlere sahip bitkilerin geliştirilmesi hedeflenmektedir. Ancak önemli olan istenilen özellik için seleksiyon yapılırken, ana bitkinin özelliklerinin de korunması gerekmektedir. Bu aşamada, moleküler analizler önem kazanmaktadır. Seçilen mutant bitkilerin kontrol bitkilerde olan farklılıkları genetik markırlar kullanılarak görüntülenebilmektedir (Ahloowalia ve Maluszynski, 2001; Patade ve diğ., 2006).

2.9. GENETİK MARKIRLAR

Genetik markırlar, genom analizleri için, kromozomda bulunan spesifik bölgelerdir. Genetik markırlar, morfolojik ve moleküler olmak üzere temelde 2 gruba ayrılmaktadır.

2.9.1.Morfolojik Markırlar

Bu markırların kalıtımı, özel biyokimyasal veya moleküler teknikler kullanılmadan gözle görülür biçimde saptanabilmektedir. Tek lokus ile kontrol edilen morfolojik özellikler genetik markır olarak kullanılabilirler. Bu genlerin ekspresyonları çeşitli ortamlarda tekrarlanabilmektedirler. Çevrenin yanında, böyle markırların ekspresyonları epistatik veya pleiotropik etkileşimlerle değişebilmektedir. Morfolojik markırların sayıları oldukça sınırlıdır. Allelleri dominant-resesif prensibi ile etkileşirler ve böylece de heterozigot bireyleri homozigot bireylerden ayırt etmek imkansız hale gelmektedir (Kumar, 1999).

2.9.2. Moleküler Markırlar

Protein seviyesinde polimorfizmi ortaya koyan markırlar biyokimyasal markırlar, DNA seviyesinde polimorfizmi gösteren markırlar ise DNA markırları olarak bilinmektedir.

Biyokimyasal markırlar proteinlerdir ve gen ekspresyonunun sonucunda oluşmaktadırlar. Allelleri tanımlamak üzere elektroforez ile ayrımları yapılmaktadır. En çok kullanılan protein markırlar, aynı enzimin çeşitli formları olan izozimlerdir. Protein markırlar, gen dizisindeki farklılıkları göstermektedirler ve ko-dominant markırlar olarak görev yapmaktadırlar. Ancak kullanımları ürün türlerindeki sınırlı sayılarına bağlı olarak oldukça sınırlıdır ve ayrıca translasyon sonrası modifikasyonlara uğramaktadırlar (Kumar, 1999).

DNA markırları, polimorfizmin gerçekleşme yöntemine bağlı olarak 2 kategoride incelenmektedir: 1) Hibridizasyon temelli polimorfizm 2) Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)-temelli polimorfizm

Birçok bitki türünde DNA hasarlarının, fenotipik akrabalıkların ve genetik çeşitliliğin sayısal değerinin belirlenmesinde DNA markırları yaygın olarak kullanılmaktadır

(Callejas ve Ochando, 2002; Danylchenko ve Sorochninsky, 2005; Kulkarni ve Deshpande, 2006).

Hibridizasyon, tekli nükleik asit polimer zincirlerinin sıcaklıkla erime ve tekrar birleşme ile çiftli polimer zinciri oluşturmaktır. Bu eşlemede zincirlerin birbirini tamamlayan (komplementer) nükleotidlerden oluşması gerekmektedir. Bu işlem, bitki tür ve çeşitlerinin birbirleri ile yakınlık ve farklılık oranlarının tesbit edilmesinde kullanılmaktadır (Kumar, 1999; Ahlowaalia ve Maluszynski, 2001; Farooq ve Azam, 2002; Gaafar ve Saker, 2006).

PZR temelli polimorfizm rastlantısal veya spesifik olabilmektedir. Bu polimorfizm, kullanılan primerlerin tiplerine, PZR koşulları ve fragment ayırım metodlarına bağlıdır. RAPD (rastlantısal çoğaltılmış polimorfik DNA), çoğaltılmış fragment uzunluk polimorfizmi (AFLP) ve restriksiyon bölgelerinin farklılığına dayanan RFLP metodlarından oluşmaktadır. Tüm bu teknolojilerde, hedef olan ancak genomda yeri bilinmeyen dizilere göre isteğe bağlı bir veya daha fazla oligonükleotid primer olarak kullanılmaktadır. Ancak primer boyutlarında, amplifikasyon koşullarında ve DNA kalıplarının çözülmesi ve saptanmasında kullanılan tekniklerde farklılıklar göstermektedirler (Kumar, 1999; Callejas ve Ochando, 2003; Farooq ve Azam, 2002; Khan ve diğ., 2004; Gostimsky ve diğ., 2005).

Welsh ve McClelland (1990) ve Williams ve diğerleri (1990) tarafından geliştirilen RAPD, insan, bakteri, mantar ve bitkiler gibi çok çeşitli türlerde genetik marker olarak kullanılmaktadır (Ferreira ve Keim, 1997).

RAPD markerları, 10 baz çiftlik rastlantısal genomik bölgelere göre PZR ile sentezlenmiş polimorfik DNA fragmentleridir. Rastlantısal nükleotid dizilerinin tek primeri, agaroz jel elektroforez sisteminde farklı hareket hızlarıyla kompleks bir genomdaki bireyler arasındaki polimorfizmi saptayabilmektedirler. RAPD marker tekniği ile birçok bitkide genetik benzerliklerin ve farklılıkların başarıyla saptanabilmesine, ıslah çalışmalarında genetik varyasyonların gözlemlenmesine, somaklonal varyasyonların DNA seviyesinde değerlendirilmesine, germplazmın kategorize edilebilmesine olanak verdiği bildirilmiştir (Vilarinhos ve diğ., 1994;

Giménez ve diğ., 2001; Kuznetsova, ve diğ., 2005; Vollman ve diğ., 2005; Venkatachalam ve diğ., 2007). Fragmentlerin sayıları ve boyutları, kullanılan primerin nükleotid dizisine ve kalıp DNA'ya bağlıdır. RAPD fragmentlerindeki polimorfizm, kromozomlardaki yeniden düzenlenmeden veya primerin bağlanma bölgesindeki nokta mutasyonlardan kaynaklanmaktadır (Ferreira ve Keim, 1997).

RAPD tekniği ile yapılan genetik analizlerde ön genetik bilgiye gerek yoktur; basit olması, hızlı olması, ekonomik olması, nanogram (ng) mertebesinde DNA'ya ihtiyaç duyulması, primerlerin tesadüfi olarak seçilmesi ve bu nedenle belli bir dizi bilgisine ihtiyaç duyulmaması, diğer DNA markır tekniklerine göre daha az zahmetli bir teknik olması; radyoaktif izotop veya hibridizasyon prosedürlerine ihtiyaç duymaması gibi avantajları vardır (Gübbük ve Pekmezci, 2001; Khan ve diğ., 2009).

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. IŞINLAMA ÖN ÇALIŞMALARI

3.1.1. Gama Işınları ile LD₃₀, LD₅₀, GR₃₀ ve GR₅₀ Dozlarının Belirlenmesi

3.1.1.1. Tohumların Nem İçeriğinin Belirlenmesi

Her iki çeşide ait tütün tohumlarından birer gramlık örnekler alındı ve ısıya dayanıklı kaplara konuldu. 130 °C'deki etüvde 1 saat bırakıldı. Etüvden çıkarılan kaplar içinde CaO bulunan desikatörde soğumaya bırakıldı. Örnekler tartılmış ve aşağıda verilen formüle göre nem oranları hesaplanmıştır:

$$\%Nem\ İçeriği: \frac{\text{Taze Tohum Ağırlığı} - \text{Kuru Tohum Ağırlığı}}{\text{Taze Tohum Ağırlığı}} \times 100$$

Bu tartımlar sonucunda Akhisar 97 tütün çeşidinin %9, İzmir Özbaş tütün çeşidinin ise %10 nem içerdiği saptandı (Briggs ve Constantin, 1977).

3.1.1.2. Işınlama

Çalışmada kullanılacak radyasyon dozunu belirlemek amacıyla Akhisar 97 ve İzmir Özbaş tütün çeşitlerine ait 60'ar adet tohum, İ.Ü. Çapa Tıp Fakültesi, Bizim Lösemili Çocuklar Vakfı Kan Işınlama Ünitesinde Sezyum-137 (Cs137) kaynağında 50, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500 ve 600 Gy dozlarında gama radyasyonu ile ışınladı. Cs-137 kaynağının doz hızı 0.09Gy/sn'dir.

3.1.1.3. Tohumların In Vitro Çimlendirilmesi

3.1.1.3.1. Yüzey Sterilizasyonu

Akhisar 97 ve İzmir Özbaş çeşitlerine ait tütün (*Nicotiana tabacum* L.) tohumları önce %70 alkolde 1 dakika, sonra %20'lik sodyum hipoklorid solüsyonunda 10 dakika

bekletildi. Sodyum hipoklorid solüsyonundan çıkarılan tohumlar 3 kere steril distile su ile yıkanıp steril filtre kağıdında kurutuldu.

3.1.1.3.2. Tütün Tohumlarının Çimlenmesi İçin Kullanılan Besiyeri

Tohumlar çimlemeleri için, içinde besiyeri bulunan petri kaplarına ekildiler (Li ve diğ., 2003). Bitkilerin çimlenip gelişebilmesi için kullanılan besiyerleri Tablo 3.1’de belirtilmiştir. A besiyerine ekilen tohumlar 27°C ’de 16 saat ışık / 8 saat karanlık gün periyodunda büyüme kabinine yerleştirildi. 28 gün süre ile bitki gelişmeleri kontrol edildi.

Tablo 3.1. Tütün tohumlarının çimlenmesi, fidelerin gelişmesi ve kallus oluşumu için kullanılan besiyerleri

A (Çimlenme Besiyeri)	MS tuzları+Modifiye MS vitamin (piridoksin HCl 0.5 mg/l, tiamin 0.4 mg/l)+30 g/l sükröz +8 g/l agar
B (Büyüme Besiyeri)	A + 0.2 mg/l IAA + 2 mg/l Kinetin
C (Kallus Besiyeri)	A+ 2 mg/l IAA+ 0.2 mg/l Kinetin

3.2. GAMA RADYASYONU İLE TOHURLARIN IŞINLANMASI VE M₁ VE M₂ GENERASYONUNUN ELDESİ

3.2.1. Tohumların Işınlanması ve Denemenin Kurulması

Bölüm 3.1.1.2’de yapılan ışınlama sonuçlarına göre gama radyasyonu ışınlama dozları kontrol, 100 Gy, 200 Gy, 300 Gy ve 400 Gy (doz hızı 0,09 Gy/sn) olarak belirlenmiş olup, Akhisar 97 ve İzmir Özbaş çeşitlerine ait tütün (*Nicotiana tabacum* L.) tohumları her gruptan 1000’er adet olacak şekilde yukarıda belirtilen dozlarda ışınlanarak Manisa Akhisar Tekel Yaprak Tütün İşletmeleri Merkezi’ne ait fide üretiminin yapıldığı yastıklara Şubat ayında ekildi (Şekil 3.1).

3.2.2. Tarla Denemesi

Tohum yastıklarında gelişen 15-20 cm uzunluğundaki fideler Mayıs ayında 821 m²’lik deneme tarlasına şaşırtılarak M₁ tarla denemesi kuruldu. Tarla denemesinde fideler sıra

üzeri 0.15 m, sıra arası 0.40 m, parsel uzunluğu 20 m olacak şekilde deneme tarlasına ekilmişlerdir. Her muamele için uygulanan parsel alanı 16 m²'dir.



Şekil 3.1 Gama radyasyonu ile ışınlanan Akhisar 97 ve İzmir Özbaş tütün (*Nicotiana tabacum* L.) çeşitlerine ait tohumların fide üretimi için yastıklarda çimlenmesi

3.2.3. Tütün Yapraklarının Kırımı

Haziran ayının ikinci yarısından itibaren tütün yapraklarının kırımı başladı. Her kırımında toplanan yaprak örnekleri gölgelik bir alanda tütün dizme iğneleriyle damarlarından dizildiler. Dizilen yapraklar pamuk ipine sıyrıldı. Toplanan yapraklar 2. kırım, 3. kırım, 4. kırım ve uç yapraklarıdır. İplere dizilen yapraklar, kurumaları için salaç vagonu denen sistemlere asıldı.

3.3. ŞEKER VE NİKOTİN MİKTARLARININ TAYİNİ

3.3.1. Tütünde İndirgen Şeker Miktarının Ölçülmesi

0.5 g öğütülmüş yaprak tozu, ekstraksiyon kabına alındı. 100 ml ekstraksiyon solüsyonu (200 ml isopropanol, 3 ml sülfürik asit) ilave edilerek ve 30 dakika karıştırıldı. Sonra süzme işlemi yapıldı. Örneklerdeki indirgen şeker miktarları, 10g/l glukozdan hazırlanan standartlara göre Bran Luebbe Auto Analyzer 3 sisteminde 420 nm'de belirlendi (Sarioğlu, 1976).

3.3.2. Tütünde Nikotin Miktarının Ölçülmesi

Öğütülen tütün örneklerinin nem tayini yapıldı. 250 mg tütün 50 ml'lik kuru konikal kapta tartıldı. 25 ml distile su ilave edildi. 30 dakika karıştırıldı. Ekstraksiyon 2.35 g sodyum klorür, 7.6 g sodyum tetraborat dekahidrat, 1 ml %30 Brij 35 içeren tampon ile gerçekleştirildi. Ekstrakt Whatman No.40 dan süzüldü. İlk birkaç ml'lik filtrat alınmadı. Geri kalan filtrat analiz kabında biriktirildi. Örneklerin nikotin miktarları, sülfanilik asit ve siyanojen klorür ile reaksiyonuna göre, Bran Luebbe Auto Analyzer 3 cihazında, 1.6 g/l nikotin içeren stok solüsyona göre 460 nm'de kolorimetrik olarak yapıldı (Xi ve diğ., 2005; Shi ve diğ., 2006).

Nikotin Yüzdesinin Kuru Ağırlık Üzerinden Hesaplanması:

$$\% \text{Nikotin} = \frac{C_x V_x 100}{m} \times \frac{100}{100-M}$$

c: Nikotin konsantrasyonu, mg/ml olarak belirtilir ve kalibrasyon eğrisinden elde edilir.

V: Hacim, hazırlanan ekstraktın ml cinsinden hacmidir.

m: Kütle, örneğin mg cinsinden miktarıdır.

M: Nem içeriği, tütünün kütle üzerinden hesaplanan yüzde nem içeriği

3.4. M₁ GENERASYONUNDA HASAT VE M₂ GENERASYONU İÇİN HAZIRLIK

M₂ generasyonunun elde edilmesi amacıyla, farklı dozlarda ışınlanan her iki tütün çeşidine ait tohumlardan gelişen M₁ bitkilerine ait tohumlar toplandı ve M₂ generasyonu eldesi için karıştırılarak bir sonraki ekim sezonunda tarlaya ekilmek üzere hazırlandılar.

3.5. M₂ GENERASYONUNUN TARLAYA EKİMİ

Her iki çeşide ait ışınlanmış bitkilerden hasat edilen tütün tohumları Şubat ayında tohum yataklarına ve daha sonra da Manisa Akhisar Tekel Yaprak Tütün İşletmeleri Merkezi'ne ait tarlaya şaşırtıldı ve sonbaharda tohumlar tek bitki hasadı yapılarak toplandı.

3.6. *İN VİTRO* VE *İN VİVO* TUZLULUK ÇALIŞMALARI

3.6.1. *İN vitro* Tuzluluk Denemesinin Kurulması

Her iki çeşide ait 600'er tohum, %70 alkolde 1 dakika bekletildikten sonra %20 sodyum hipoklorid solüsyonunda 10 dakika bekletildikten sonra 3 kere steril distile su ile yıkandı. Steril filtre kağıdı üzerinde kurutulmuş tohumlar her bir petride 10'ar tohum olacak şekilde A besiyerine ekildi. Çimlenen tohumlardan gelişen bitkicikler 2 hafta sonra 0, 50, 100, 150, 200, 250, 300 ve 350 mM konsantrasyonlarında NaCl içeren MS besiyerlerini içeren kültür kaplarına her bir tür için her bir muamelede 30'ar bitki olacak şekilde ekildi. Ekilen bitkilerin 7. ve 14. günlerdeki gelişimleri izlendi ve 14. gün sonunda tüm bitkilerin yaş ağırlıkları tartılarak sürgün boyları ve kök boyları ölçüldü. Elde edilen bu veriler değerlendirilerek tuz seleksiyonunda kullanılacak olan NaCl konsantrasyonu belirlendi. Her bir muameleye ait bitkilerin yaprakları toplanarak -80 °C'ye kaldırıldı (Hossain ve diğ., 2006).

3.6.2. *In vivo* Tuzluluk Denemesinin Kurulması

Akhisar 97 ve İzmir Özbaş tütün çeşitlerine ait 600'er tohum, steril edildikten sonra her bir petride 10'ar tohum olacak şekilde A besiyerine ekildi. Çimlenen fideler, B besiyerine alınarak 30 gün süreyle yetiştirildi (Li ve diğ., 2003; Dhaliwal ve diğ., 2004). 30 gün sonra, elde edilen fidelerle bir bitki büyütme odasında optimum koşullarda (16 saat ışık/8 saat karanlık, 25 °C/18 °C) perlit ortamına alınarak Hoagland solüsyonu (Tablo 3.2) ile gün aşırı sulanarak gelişmeleri sağlandı. Süre sonunda, tuz denemesi kuruldu. Elde edilen fideler 0, 50, 100, 200, 250, 300 ve 350 mM konsantrasyonlarında NaCl içeren Hoagland solüsyonu ile gün aşırı sulandı. Bitkilerin tuzluluğa verdiği cevaplar gözlemlendi. Tuz denemeleri 14 gün süreyle devam ettirildi (Hossain ve diğ., 2006; Yazıcı ve diğ., 2007).

Tablo 3.2 Hoagland Solüsyonunun İçeriği

Element	Bileşikler	mg/L
N	Üre	150
P	H ₃ PO ₄	50
K	KNO ₃	150
Ca	Ca(NO ₃) ₂	150
Mg	MgSO ₄ .H ₂ O	50
Fe	FeSO ₄ 7H ₂ O	5
Mn	MnSO ₄ .H ₂ O	0.5
Cu	CuSO ₄ .5H ₂ O	0.03
Zn	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.05
B	H ₃ BO ₃	0.5
Mo	(NH ₄) ₆ .Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	0.02

3.6.3. Morfolojik Zararların Belirlenmesi

Fidelerde morfolojik olarak ortaya çıkan zararlanma derecesini belirleyebilmek amacıyla bir skala değerlendirmesi yapıldı ve 0-5 skalası oluşturuldu. Bunun için her iki çeşit için, her uygulamadan rastgele seçilen 10'ar fideye, zararlanma derecelerine göre 0-5 arasında bir puan verildi (Kuşvuran ve diğ., 2007).

Yapılan değerlendirmede göz önünde bulundurulan kriterler ve skala değerleri aşağıda belirtildi:

- 0:Bitkinin tuz stresinden hiç etkilenmemesi
- 1:Büyümede yavaŐlama, yapraklarda lokal sararma ve kırılma
- 2:Yapraklarda sararma ve %25 oranında nekrotik lekelenmeler
- 3:Yapraklarda %25-50 arasında nekrotik leke görülmesi ve dökülmesi
- 4:Yapraklarda %50-75 arasında nekroz ve ölüm görülmesi
- 5:Yapraklarda %75-100 arasında Őiddetli nekroz görülmesi veya bitkinin tamamen ölmesi

3.7. BİYOKİMYASAL ANALİZLER

0, 50, 100, 150, 200, 250, 300 ve 350 mM NaCl konsantrasyonlarında tuz stresine *in vitro* ve *in vivo* ortamda maruz bırakılan bitkilerin yaprakları hasat edilerek, total klorofil, total karotenoid, total protein ve antioksidan enzim aktiviteleri (süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), askorbat peroksidaz (APX), glutatyon peroksidaz (GPX), glutatyon redüktaz (GR)) belirlenmiştir.

3.7.1. Fotosentetik Pigmentlerin Miktarlarının Belirlenmesi

In vitro ve *in vivo* tuz denemelerinden 14. günde hasat edilen bitki yapraklarından 0.5'er gram tartılarak ve havanda 15 ml %80 aseton ile ekstrakte edildi. Karışım, filtre kâğıdından süzülerek temiz tüplere alındı. Ekstrakt hacimleri ölçüldü. Ekstrenin klorofil içeriğini belirlemek için 645 ve 663 nm'de, karotenoid içeriğini belirlemek için ise 470 nm'deki absorbansları ölçüldü (Arnon, 1949).

3.7.2. Lipid Peroksidasyon Miktarının Belirlenmesi

Lipid peroksidasyonu, tiobarbuturik asit (TBA) reaksiyonu ile oluşan malondialdehit (MDA) miktarının ölçülmesiyle belirlendi (Madhava Rao ve Stresty, 2000). Ham ekstrakt, eŐit hacimde %0.5 TBA solüsyonu ile (%20 (w/v) TBA içeren) karıştırıldı. Karışım, 95°C'de 30 dakika ısıtılmış ve buz banyosunda hızlıca soğutuldu. Karışım 3000 g'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatantın 532 ve 600 nm'deki absorbans

değerleri alındı. MDA konsantrasyonu $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ olan ekstinksiyon katsayısından yararlanılarak aşağıdaki formüle göre hesaplandı:

$$\text{MDA} = \frac{(A532-A600) \times \text{Ekstrakt Hacmi (ml)}}{155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1} \times \text{Örnek Miktarı (mg)}}$$

Sonuçlar, $\mu\text{mol MDA g}^{-1} \text{ TA}$ olarak ifade edildi (Boughanmi ve diğ., 2005; Neto ve diğ., 2006).

3.7.3. Antioksidant Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi

3.7.3.1. Enzim Ekstraktlarının Hazırlanması

Antioksidant enzimlerin ekstraksiyonu için derin dondurucuda saklanmış olan yapraklar, soğutulmuş havanda %2 (w/v) polivinilpolipirolidon (PVPP) ve 1 mM EDTA içeren 0.05 M sodyum fosfat tamponuyla (pH 6.8) homojenize edildi. Homojenat 4°C 'de 13.000 g'de 40 dakika santrifüj edilerek oluşan süpernatant enzim aktivitelerinin tayininde kullanıldı. Enzim ekstraktlarının hazırlanmasında tüm işlemler 4°C 'de gerçekleştirildi.

3.7.3.2. Total Protein Miktarının Belirlenmesi

Enzim ekstraktlarındaki total protein içeriği, Bradford (1976) yöntemine göre standart olarak sığır serum albumin (BSA) kullanılarak saptandı. Protein standart eğrisi için, 96 kuyucuklu plakaya 0.1, 0.2, 0.25, 0.5, 0.75, 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ BSA içeren çözeltiler hazırlandı. Süpernatantlara 290 μl Bradford belirteci içeren reaksiyon karışımı eklendi. Elde edilen karışım oda sıcaklığında 10 dakika karanlıkta bekletildikten sonra Elisa Okuyucu'da 595 nm'de okundu. Protein konsantrasyonuna karşı ölçülen absorbans değerlerine göre grafik çizildive determinasyon katsayısı hesaplandı.

3.7.3.3. Süperoksit Dismutaz (SOD; EC 1.15.1.1) Enziminin Aktivitesinin Belirlenmesi
Yapraklardaki süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi, temeli nitroblue tetrazolium tuzu (NBT)'nin fotokimyasal olarak indirgenmesinin inhibe edilmesine dayanan, Beauchamp ve Fridovich (1971)'un protokolüne göre yapıldı (Yazıcı ve diğ., 2007). SOD analizi için hazırlanan reaksiyon karışımı, 50 mM Sodyum fosfat tamponu (pH 7.8), 33 µM Nitroblue tetrazolium (NBT), 10 mM L-metionin, 0.66 mM EDTA, Na₂, 0.0033 mM riboflavin içermektedir. Her bir tüp için reaksiyon karışımının hacmi toplam 3 ml'dir.

Reaksiyon, karışıma 50 µl enzim ekstraktı eklenmesiyle başladı. Tüpler, 300 µmol m⁻² s⁻¹ ışık şiddeti altında 10 dakika bekletildikten sonra reaksiyonun durması için 15 dakika karanlıkta bekletildi. Amersham Biosciences marka spektrofotometrede 560 nm'de absorbans değerleri ölçüldü. 100% inhibisyon değerleri aşağıdaki formüle göre hesaplandı:

$$\% \text{ İnhibisyon Değeri} = 100 - [(\text{absorbans} \times 100) / \text{blank}]$$

Spesifik enzim aktivitesi, enzim U mg⁻¹ TA olarak belirtildi.

3.7.3.4. Katalaz (CAT; EC 1.11.1.6) Enziminin Aktivitesinin Belirlenmesi

Katalaz enziminin belirlenmesi Bergmeyer (1970)'in metoduna göre gerçekleştirildi. 240 nm'de 3 dakika süre ile H₂O₂ miktarında oluşan azalma izlendi. Reaksiyon karışımı; 1 mM EDTA, 0.05 mM Sodyum fosfat tamponu (pH 7.0), dH₂O ve %3 H₂O₂ içermektedir. Dakikada tüketilen µmol H₂O₂ miktarı 1 enzim ünitesi olarak saptandı. Spesifik enzim aktivitesi, enzim U mg⁻¹ TA olarak ifade edildi (Yazıcı ve diğ., 2007).

3.7.3.5. Guaiakol Peroksidaz (POX; EC 1.11.1.7) Enziminin Aktivitesinin Belirlenmesi

Yaprak örneklerinde peroksidaz aktivite tayini Scabba ve diğ. (2001)'e göre yapıldı. Reaksiyon karışımında (2.0 ml), 100 mM Sodyum fosfat tamponu (pH 7.0), 0.1 mM EDTA, 5 mM guaiakol, 15 mM H₂O₂ ve 50 µl enzim ekstraktı bulunur. Enzim ekstraktının eklenmesiyle reaksiyon başladı ve 470 nm'deki 1 dakikalık süredeki artış kaydedildi. Enzim aktivitesi oluşan tetraguaiakol miktarı ile onun molar ekstinksiyon katsayısı (26.6 mM⁻¹cm⁻¹) ile hesaplandı (Neto ve diğ., 2006). Sonuçlar, µmol H₂O₂

$\text{min}^{-1}\text{g}^{-1}$ TA olarak ifade edildi. 4 mol H_2O_2 , 1 mol tetraguaiakol üretmek üzere indirgenir.

3.7.3.6. Askorbat Peroksidaz (APX; EC 1.11.1.11) Enziminin Aktivitesinin Belirlenmesi

Askorbat peroksidaz (APX) enziminin aktivite tayini Nakano ve Asada (1981) yöntemine göre gerçekleştirildi. Yöntemin esası, örnekteki enzim tarafından okside edilen askorbatın 290 nm'deki absorbansında oluşan azalmanın spektrofotometrik olarak belirlenmesine dayanmaktadır. 1.5 ml reaksiyon karışımı, 50 mM Sodyum fosfat tamponu (pH 6.0), 0.1 mM EDTA, 0.5 mM askorbat, 1.0 mM H_2O_2 ve 50 μl enzim ekstaktını içermektedir. Reaksiyon, H_2O_2 'nin konulmasıyla başlar ve askorbat oksidasyonu 290 nm'de 1 dakika süreyle ölçüldü. Enzim aktivitesi, molar ekstinksiyon katsayısı ($2.8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) kullanılarak hesaplandı ve sonuçlar $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1}\text{g}^{-1}$ TA olarak değerlendirildi. 1 mol H_2O_2 'nin redüksiyonu için 2 mol askorbat gereklidir (Hossain ve diğ., 2006; Neto ve diğ., 2006).

3.7.3.7. Glutasyon Redüktaz (GR; EC 1.6.4.2) Enziminin Aktivitesinin Belirlenmesi

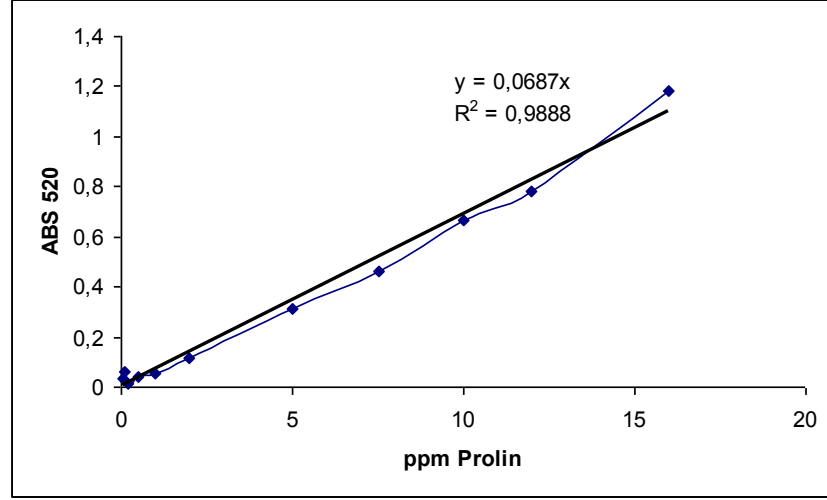
Glutasyon redüktaz enziminin aktivitesi, Foyer ve Halliwell (1976) metoduna göre belirlendi. NADPH varlığında okside glutasyon miktarındaki azalma, 1 dakika süre ile 340 nm'deki absorbansın azalmasından yola çıkılarak hesaplandı. Glutasyon redüktaz enziminin ekstinksiyon katsayısı ($6.2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) kullanılarak indirgen glutasyon (GSSG) düzeyi hesaplandı. 1 enzim ünitesi, dakikada okside olan glutasyon ($\mu\text{mol ml}^{-1}$) miktarıdır. 1 ml'lik reaksiyon karışımı, 100 mM fosfat tamponu (pH:7.8), 0.1 mM EDTA, 0.05 mM NADPH, 3 mM GSSG ve 50 μl enzim ekstraktı ile hazırlanmaktadır. Spesifik enzim aktivitesi, $\mu\text{mol NADPH min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ TA olarak belirtildi (Neto ve diğ., 2006; Yazıcı ve diğ., 2007).

3.7.3.8. Prolin Analizi

3.7.3.8.1. Standart Eğri Oluşturulması

L-prolinden 100 ppm stok hazırlanarak 0.05-16 ppm aralığında 11 farklı konsantrasyonda prolin serileri hazırlandı (Bates ve diğ.,1973). Bu serilerin herbiri için 1 ml örnek, 1 ml asid ninhidrin ve 1 ml glasiyal asetik asit ilave edilerek 1 saat

100°C’de reaksiyona bırakıldı. Reaksiyon buzda sonlandırıldıktan sonra 2 ml toluen ile herbirinin ekstraksiyonu gerçekleştirildi. Renkli kısım alınarak toluene karşı 520 nm’de absorbanları okundu. Deneme 3 tekerrürlü olarak gerçekleştirildi. Prolin konsantrasyonlarına göre elde edilen absorbanlar değerlendirilerek standart eğri çizildi (Şekil 3.2).



Şekil 3.2 Prolin Standart Eğrisi

3.7.3.8.2. Serbest Prolin Miktarının Ölçülmesi

Serbest prolin içeriğinin belirlenmesi Bates ve diğ.’larına (1973) göre yapıldı. 0.5 g bitki materyali 10 ml %3 sulu sülfosalisilik asit ile homojenize edildi. Filtrat Whatman No.2 filtre kağıdı ile süzüldü. 2 ml filtrat, 2ml asit ninhidrin ve 2 ml glasiyal asetik asit ile bir test tüpünde 1 saat 100°C’de reaksiyona bırakıldı. Reaksiyon, süre sonunda buz banyosunda sonlandırıldı. Reaksiyon karışımı 4 ml toluen ile ekstrakte edildi ve 15-20 sn. test tüpü dikkatlice karıştırıldı. Tolueni içeren kromofor, sulu fazdan alınarak oda ısısına getirildi. Toluene referans olarak kullanılarak 520 nm’deki absorban okundu. Prolin konsantrasyonu, standart eğriye göre belirlendi ve taze ağırlık cinsinden şu formüle göre hesaplandı:

$$[(\mu\text{g prolin/ml}) \times \text{ml toluen}] / 115.5 \mu\text{g} / \mu\text{mol} / [(\text{g örnek}) / 5] = \mu\text{mol prolin/g taze ağırlık}$$

3.8. TUZA TOLERANSLI FİDELERİN M₃ SELEKSİYONU

3.8.1. *In vivo* Seleksiyon

In vivo ve *in vitro* tuzluluk denemelerinin sonucuna göre, 250 mM NaCl tuz konsantrasyonu, tuzluluğa toleranslı bitkilerin seçimi için kullanıldı.

Akhisar 97 ve İzmir Özbaş tütün çeşitlerinin M₃ generasyonuna ait fideler *in vivo* koşullarda 250 mM NaCl tuz konsantrasyonunda ve perlit ortamında tuzluluğa toleranslılık gösteren fidelerin belirlenmesi için seleksiyona tabi tutuldular.

Tütün çeşitlerine ait tohumlar, yüzey sterilizasyonu yapıldıktan sonra her bir bitki için 10'ar adet olacak şekilde steril filtre kağıdı üzerinde kurutulan tohumlar her bir petride 10'ar tohum olacak şekilde büyüme besiyerine ekildi. 30 gün sonra, elde edilen fideler, bitki büyütme odasında optimum koşullarda (16 saat ışık/8 saat karanlık, 25 °C/18 °C) perlit ortamına alınarak Hoagland solüsyonu ile gün aşırı sulandı ve 30 gün boyunca yetiştirildi. ¼ Hoagland solüsyonu ile 30 gün boyunca sulanan fidelerde tuz seleksiyonu yapıldı. Tuz seleksiyonu için fideler 250 mM NaCl içeren Hoagland solüsyonu ile gün aşırı sulandı. Tuz denemeleri 14 gün süreyle devam ettirildi.

Seleksiyon sonucunda bitkilerin tuzluluğa verdikleri cevaplar kontrol bitkileri ile karşılaştırılarak, toleranslı bireyler belirlendi ve bitkiler, temiz perlite alınarak ¼ Hoagland solüsyonu ile sulanarak yetiştirildi (Yazıcı, 2007).

3.9. TUZA TOLERANSLI OLARAK BELİRLENEN MUTANT BİTKİLERİN *İN VİTRO* KOŞULLARDA KONTROLÜ

Perlit ortamında yetiştirilen İzmir Özbaş ve Akhisar 97 varyetelerine ait 250 mM NaCl'ye toleranslı mutant bitkilerden alınan yapraklardan yüzey sterilizasyonu yapılarak 1x1 cm² boyutunda kesilen eksplantlar, 250 mM NaCl içeren kallus oluşumunu indükleyici C besiyerine ekildi. 45 gün süreyle kallus oluşumları gözlemlendi. Denemede, kontrol bitkilerine ait eksplantlar pozitif ve negatif kontrol oluşturmak üzere

250 mM NaCl içeren ve içermeyen MS besiyerlerine ekilerek çalışma sonuçları değerlendirildi (Trivedi ve diğ., 1991; Omar ve diğ., 1993; Hossain ve diğ., 2007).

3.10.MUTANT BİTKİLERİN GLUTATYON REDÜKTAZ ENZİM AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ

250 mM NaCl'e karşı toleranslı olarak belirlenen mutant bitkilerin glutatyon redüktaz enzim aktiviteleri 3.7.3.7'de belirtildiği şekilde saptandı.

3.11. MOLEKÜLER ANALİZLER

Çalışmamızda İzmir bölgesine ait olan Akhisar 97 ve İzmir Özbaş çeşitlerine ait kontrol ve tuz seleksiyon çalışması sonucunda belirlenen mutant bireyler arasındaki farklılıklar DNA düzeyinde, rastlantısal primerler kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonuna dayanan RAPD-PZR tekniği kullanılarak gösterildi.

3.11.1. Bitki Materyalinin Eldesi

Bitki büyütme odasında yetiştirilen kontrol ve 250 mM NaCl'ye toleranslı tütün bitkilerine ait yaprak örnekleri toplanarak genomik DNA izolasyonu için -80 °C'de saklandı.

3.11.2. Genomik DNA İzolasyonu

Bitki materyalinden genomik DNA izolasyonu Doyle & Doyle (1987)'in CTAB metoduna göre yapıldı. Çalışmamızda kontrol ve mutant bitkilere ait 40'ar mg yaprak örnekleri sıvı azotta toz haline getirildi ve ependorfa kondu. Üzerlerine 1 ml 65°C'ye ısıtılmış 1XCTAB ekstraksiyon tamponu ilave edildi. Ependorflar 65°C'de 90 dakika süreyle inkübe edildi. Daha sonra üzerlerine 500 µl kloroform: izoamil alkol (24:1) karışımından ilave edildi. Tüpler alt üst edilerek karıştırıldıktan sonra 5 dakika süreyle 10.000 rpm'de +4 °C'de santrifüj edildi. Üst faz temiz bir ependorf tüpe alındıktan sonra üzerlerine 600 µl izopropanol ilave edildi ve alt üst edilerek karıştırıldı. Oda ısısında 40 dakika bekletilen tüpler süre sonunda 5000 rpm'de 3 dakika santrifüjlendi. Santrifüj sonrasında süpernatantlar uzaklaştırıldı. Pelletlerin üzerine 1 ml %76'luk soğuk alkol ilave edildi ve 20 dakika buzda bekletildi. 5000 rpm'de 3 dakikalık santrifüjün ardından süpernatantlar atıldı ve pelletler 1 ml %70 soğuk alkol ilave edildi ve 5000 rpm'de 3

dakika daha santrifüj yapıldı. Süre sonunda süpernatantlar atıldı ve tüpler kurutulularak 100 µl TE tamponu içerisinde çözüldükten sonra -20 °C’de saklandı.

3.11.3. Genomik DNA Analizi

3.11.3.1. Spektral Analiz

Akhisar 97 ve İzmir Özbaş tütün çeşitlerine ait kontrol ve mutant bireylerden izole edilen genomik DNA’ların miktar ve saflık tayinleri Nanodrop cihazı kullanılarak 260 ve 280 nm’deki absorbans değerlerine göre gerçekleştirildi.

3.11.3.2. RAPD Analizinde Kullanılan Primerler ve Özellikleri

Çalışmamızda, %60 GC oranına sahip, 10 baz uzunluğundaki IDT marka 13 adet oligonükleotid primerler kullanıldı (Tablo 3.3).

Tablo 3.3 RAPD-PZR analizinde kullanılan primerler ve baz dizilişleri

Primer İsmi	Primer Dizisi (5’.....3’)
M13	5’-GAGGGTGGCGGTTCT-3’
B18	5’-CCACAGCAGT-3’
A1	5’-CAGGCCCTTC-3’
A2	5’-TGCCGAGCTG-3’
A7	5’-GAAACGGGTG-3’
OPB 02	5’-TGATCCCTGG-3’
OPB 05	5’-TGCGCCCTTC-3’
OPB 06	5’-TGCTCTGCCC-3’
OPB 08	5’-GTCCACACGG-3’
OPB 10	5’-CTGCTGGGAC-3’
OPA 11	5’-CAATCGCCGT-3’
OPA 14	5’-TCTGTGCTGG-3’
OPO 04	5’-AAGTCCGCTC-3’

3.11.4. PZR Uygulaması

Genomik DNA izolasyonundan sonra, PZR’da kullanılacak olan içeriklerin miktarları ve PZR döngü koşulları sırasıyla Tablo 3.4 ve 3.5’te verildi. Denemelerde reaksiyon karışımlarının toplam hacmi 100 µl olacak şekilde hazırlandı.

Tablo 3.4 PZR İçeriği ve Kullanılan Konsantrasyonlar

PZR İçeriği	Konsantrasyon
PZR Tamponu (10x)	10 µl
DNA Konsantrasyonu	25 ng
MgCl ₂	25 mM
dNTP karışımı	0.1 mM
Primer Konsantrasyonu	0.2 µM
Taq DNA Polimeraz	0.1 µl

Tablo 3.5 PZR Döngü Koşulları

PZR Döngüleri	Döngü Koşulları
Denatürasyon	96 °C 30 sn
Primer Bağlanması	45 °C 30 sn
Primer Uzaması	72 °C 30 sn
Döngü Sayısı	45

3.11.4.1. Agaroz Jel Elektroforezi ve Görüntüleme

RAPD-PZR çalışması sonucunda elde edilen banların görüntülenmesi amacıyla 100 ml 1xTAE tamponunda 2 gr agaroz kaynatılarak eritildi. Daha sonra 55°C’ye kadar soğutulan agaroz 6 µl etidyum bromid eklenerek karıştırıldı ve jel kasedine döküldü. PZR ürünleri, herbir örnekten 10 µl alınarak 3 µl yükleme tamponu karıştırılarak jeldeki kuyulara yüklendi. PZR ürünleri %2’lik agaroz jel elektrofrezinde 90 Volt akım altında 30 dakika süreyle yürütüldü. Yürütme tamamlandıktan sonra DNA bantları UV translimünatörde görüntülendi.

3.11.4.2. Polimorfizmin Belirlenmesi

Çalışmamızda kontrol ve mutant bitkilere ait RAPD bant analiz sonuçları, amplifiye olan primerlerdeki bantların varlığı ve yokluğuna göre polimorfizm oranı belirlendi. Gözlenen RAPD bantlarına“1”, bulunmayanlara ise “0” olarak sayısal değer verildi.

3.12. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

Akhisar 97 ve İzmir Özbaş tütün (*Nicotiana tabacum* L.) çeşitlerine ait kontrol ve farklı dozlarda gama radyasyonu ile ışınlanmış bitkilerin *in vitro* koşullardaki büyüme parametrelerinden bitki boy uzunluğu, kök uzunluğu ve taze ağırlık ve morfolojik zararlanma değerlendirilmesinden elde edilen veriler ile farklı NaCl konsantrasyonlarına *in vitro* ve *in vivo* koşullarda maruz bırakıldıktan sonraki tüm biyokimyasal analizlerinin (total protein, lipid peroksidasyon, askorbat peroksidaz, guaiakol peroksidaz, süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz ve prolin) değerlendirilmeleri varyans analizi ile gerçekleştirildi. İstatistiksel olarak anlamlı bulunan verilerin karşılaştırılmaları Duncan testi ile gerçekleştirildi. Regresyon analizleri ile her iki çeşide ait *in vitro* ve *in vivo* tuz denemelerine ait biyokimyasal analiz sonuçlarında, çeşitlerin kendi içlerinde doza bağımlı olarak değişimlerinde ve deneme koşuluna göre bir farklılık olup olmadığının istatistiksel değerlendirilmesi yapıldı (Chew, 1976).

Akhisar 97 ve İzmir Özbaş tütün (*Nicotiana tabacum* L.) çeşitlerine ait kontrol ve tuza toleranslı olarak belirlenen mutant bitkilerin birbirlerine olan genetik uzaklıklarına göre hazırlanan dendrogramlar, POPGENE bilgisayar programındaki kümeleme analiz yöntemi kullanılarak çizildi (Nei ve diğ., 1983; Fu, 1996; Yeh ve diğ., 1999).

4. BULGULAR

4.1.TÜTÜN (*Nicotiana tabacum* L.) ÇEŞİTLERİNE GAMA RADYASYONUN ETKİSİ

4.1.1. Radyasyon Hassasiyetinin Belirlenmesi

Akhisar 97 ve İzmir Özbaş (*Nicotiana tabacum* L.) çeşitlerine ait kontrol ve ışınlanmış tohumların *in vitro* çimlenme yüzdeleri Tablo 4.1’de gösterildi.

Tablo 4.1. İzmir Özbaş ve Akhisar 97 (*Nicotiana tabacum* L.) çeşitlerine ait kontrol ve ışınlanmış tohumların çimlenme yüzdeleri

Çeşit	Doz	Işınlanan Tohum Sayısı	Günlere Göre Çimlenme Yüzdesi	
			7. gün	14. gün
İzmir Özbaş	Kontrol	60	73.33	100
	50 Gy	60	51.67	88.33
	100 Gy	60	46.67	78.33
	150 Gy	60	28.33	70
	200 Gy	60	33.33	68.33
	250 Gy	60	20	55
	300 Gy	60	20	48.33
	400 Gy	60	6.67	33.33
	500 Gy	60	5	28.33
	600 Gy	60	0	0
Akhisar 97	Kontrol	60	76.67	100
	50 Gy	60	51.67	80
	100 Gy	60	50	60
	150 Gy	60	48.33	56.67
	200 Gy	60	48.33	51.67
	250 Gy	60	35	43.33
	300 Gy	60	25	33.33
	400 Gy	60	21.67	26.67
	500 Gy	60	15	21.67
	600 Gy	60	0	0

İzmir Özbaş tütün çeşidine ait çimlenme 7. günde %73.33'e, 14. günde ise %100'e yükseldi. Akhisar 97 çeşidinde 7. günde %76.67 iken, 14. günde tüm tohumların çimlendiği görüldü. Her iki çeşide ait tohumların çimlenme yüzdeleri uygulanan gama radyasyon dozu artarken azaldı.

İzmir Özbaş ve Akhisar 97 tütün çeşitlerine ait çimlenen tohumlardan elde edilen sürgünlerin 28. günde yaşayan fide sayısı, yaş ağırlık ve kuru ağırlık değerleri sırasıyla Tablo 4.2 ve 4.3'te verildi. İzmir Özbaş çeşidinde kontrole göre yaşayan fide sayılarında, yaş ve kuru ağırlık değerlerinde bir azalma görüldü. 50 Gy dozunda yaşayan fide yüzdesi % 86.67 iken, 500 Gy uygulamasında bu oran 21.67'ye geriledi. Akhisar 97 çeşidine ait sağ kalım, yaş ve kuru ağırlık değerleri de gama radyasyon dozunun artışıyla ters orantılı olarak azaldı. 50 Gy gama radyasyon uygulamasında yaşayan fide yüzdesi % 88.33 iken, 500 Gy uygulamasında %28.33'e geriledi. Her iki çeşitte de 600 Gy gama radyasyon dozu uygulamasında hayatta kalan bitki olmadığı görüldü. Doza bağlı olarak gözlenen azalışların istatistiksel açıdan anlamlı oldukları belirlendi.

Her iki tütün çeşidinde de uygulanan gama radyasyon dozunun artmasıyla yaş ve kuru ağırlık değerlerinde bir azalma gözlemlendi. Meydana gelen bu azalmanın, istatistiksel açıdan anlamlı olduğu belirlendi ($p<0.05$).

Tablo 4.2 İzmir Özbaş tütün çeşidine ait fidelerin 28. gündeki yaş ve kuru ağırlıkları üzerine gama radyasyonunun etkisi

Çeşit	Doz	Işınlanan Tohum Sayısı	Yaşayan Fide Sayısı	Ortalama Yaş Ağırlık (g)±SD	Ortalama Kuru Ağırlık(g)±SD
İzmir	Kontrol	60	60	0,1750±0,0053 ^a	0,1026±0,0032 ^a
Özbaş	50 Gy	60	52	0,1490±0,0059 ^b	0,0957±0,0054 ^b
	100 Gy	60	37	0,1300±0,0049 ^c	0,0924±0,0046 ^c
	150 Gy	60	36	0,1119±0,0054 ^{dc}	0,0876±0,0028 ^d
	200 Gy	60	31	0,1009±0,0046 ^d	0,0834±0,0045 ^e
	250 Gy	60	26	0,0944±0,0031 ^{de}	0,0768±0,0028 ^f
	300 Gy	60	21	0,0805±0,0094 ^{ef}	0,0624±0,0043 ^g
	400 Gy	60	17	0,0724±0,0082 ^f	0,0537±0,0021 ^h
	500 Gy	60	13	0,0454±0,0041 ^g	0,0356±0,0014 ⁱ

SD: Standart Sapma

Aynı harfler ile gösterilmeyen değerler, Duncan'ın çoklu değişim testine göre anlamlıdır. Her bir deneme 3 tekrarlı yapılmıştır (P<0.05).

Tablo 4.3. Akhisar 97 tütün çeşidine ait fidelerin 28. gündeki yaş ve kuru ağırlıkları üzerine gama radyasyonunun etkisi

Çeşit	Doz	Işınlanan Tohum Sayısı	Yaşayan Fide Sayısı	Ortalama Yaş Ağırlık (g)±SD	Ortalama Kuru Ağırlık(g)±SD
Akhisar	Kontrol	60	60	0,1834±0,0036 ^a	0,1134±0,0025 ^a
97	50 Gy	60	53	0,1781±0,0035 ^a	0,1026±0,0037 ^b
	100 Gy	60	47	0,1693±0,0030 ^{ab}	0,0984±0,0026 ^c
	150 Gy	60	42	0,1594±0,0066 ^{abc}	0,0876±0,0053 ^d
	200 Gy	60	41	0,1495±0,0076 ^{bc}	0,0764±0,0014 ^e
	250 Gy	60	36	0,1379±0,0039 ^c	0,0691±0,0013 ^f
	300 Gy	60	29	0,1118±0,0058 ^d	0,0614±0,0050 ^g
	400 Gy	60	24	0,0874±0,0042 ^e	0,0583±0,0026 ^g
	500 Gy	60	17	0,0657±0,0032 ^e	0,0453±0,0017 ^h

SD: Standart Sapma

Aynı harfler ile gösterilmeyen değerler, Duncan'ın çoklu değişim testine göre anlamlıdır. Her bir deneme 3 tekrarlı yapılmıştır (P<0.05).

Her iki tütün çeşidinde de uygulanan gama radyasyon dozunun artışına paralel olarak, yaşayan fide sayısı, ortalama yaş ve kuru ağırlık değerlerinde bir azalma gözlemlendi. İzmir Özbaş çeşidine ait fidelerde 250 Gy radyasyon dozu uygulamasıyla yaş ağırlık ortalaması %46.04 azalırken, kuru ağırlık değerlerinde %25.25 oranında bir azalma görüldü. Akhisar 97 çeşidinde de aynı dozda yaş ağırlığının %24.80, kuru ağırlığının da %39.06 oranında azaldığı görüldü.

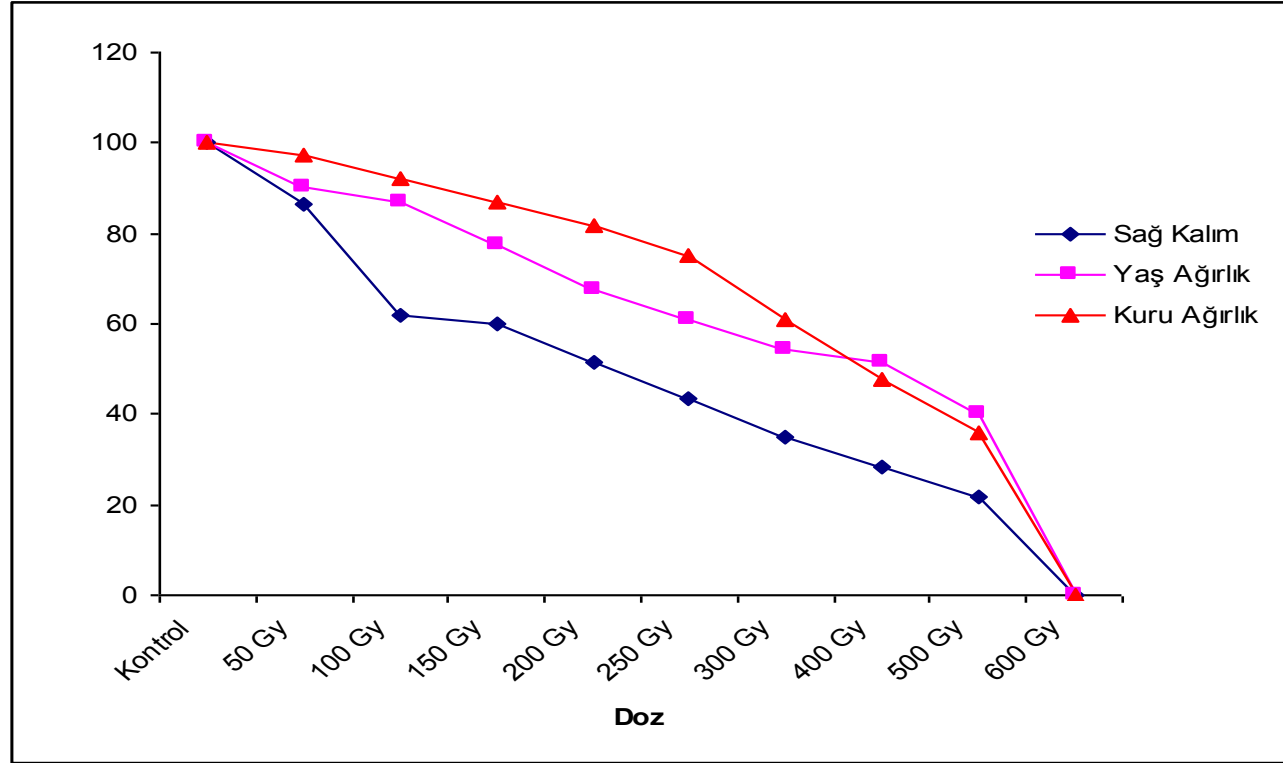
Akhisar 97 ve İzmir Özbaş tütün çeşitlerinin radyasyon hassasiyetleri Şekil 4.1 ve 4.2’de verildi. Elde edilen sonuçların ışığında çalışmada kullanılacak olan ışınlama dozlarının belirlenebilmesi için kontrol bitkisine göre sağ kalımı %30 oranında azaltan radyasyon dozu (LD₃₀) ve kontrol bitkisine göre sağ kalımı %50 oranında azaltan (LD₅₀) radyasyon dozları saptandı. Ayrıca fidelerin yaş ve kuru ağırlıkları belirlenerek kontrol bitkisine göre yaş ve kuru ağırlığı %30 ve %50 oranında azaltan radyasyon dozları (GR₃₀ ve GR₅₀) da belirlendi.

Fidelere ait LD₃₀ ve LD₅₀ dozları ile yaş ve kuru ağırlığa göre GR₃₀ ve GR₅₀ değerleri Tablo 4.4’te gösterildi.

Tablo 4.4 Akhisar 97 ve İzmir Özbaş tütün çeşitlerinin radyasyona karşı duyarlılığı

Çeşit	Sağ Kalım		Yaş Ağırlık		Kuru Ağırlık	
	LD ₃₀	LD ₅₀	GR ₃₀	GR ₅₀	GR ₃₀	GR ₅₀
Akhisar 97	83 Gy	213 Gy	188 Gy	406 Gy	284 Gy	387 Gy
İzmir Özbaş	150 Gy	288 Gy	265 Gy	407 Gy	117 Gy	268 Gy

Tütün çeşitlerinin yaşayan bitki sayıları ile yaş ve kuru ağırlıklarının radyasyon dozları ile aralarındaki ilişki regresyon analizi ile de gösterildi (Şekil 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8).

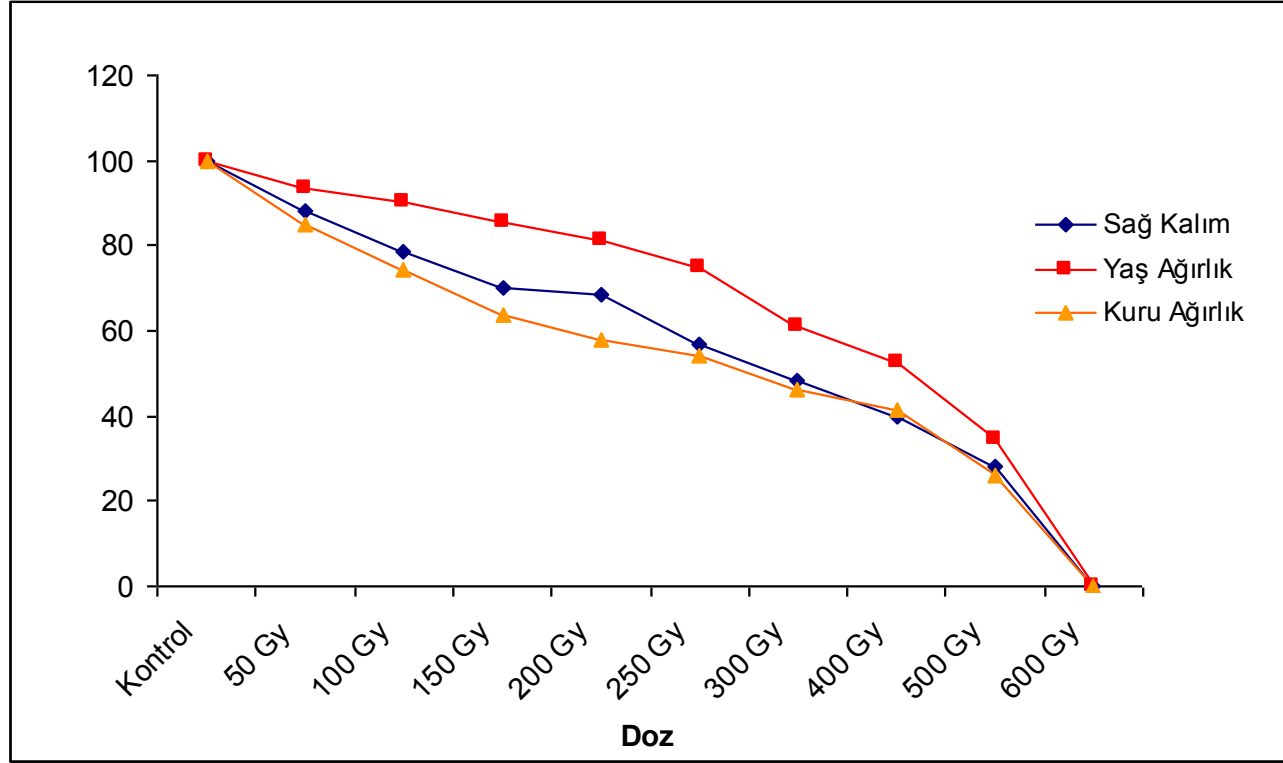


Şekil 4.1 Akhisar 97 tütün çeşidine ait fidelerde gama radyasyonun etkisi

Sağ kalım değerlerine göre LD_{50} dozu: 213 Gy

Yaş Ağırlık değerlerine göre GR_{50} dozu: 406 Gy

Kuru Ağırlık değerlerine göre GR_{50} dozu: 387 Gy

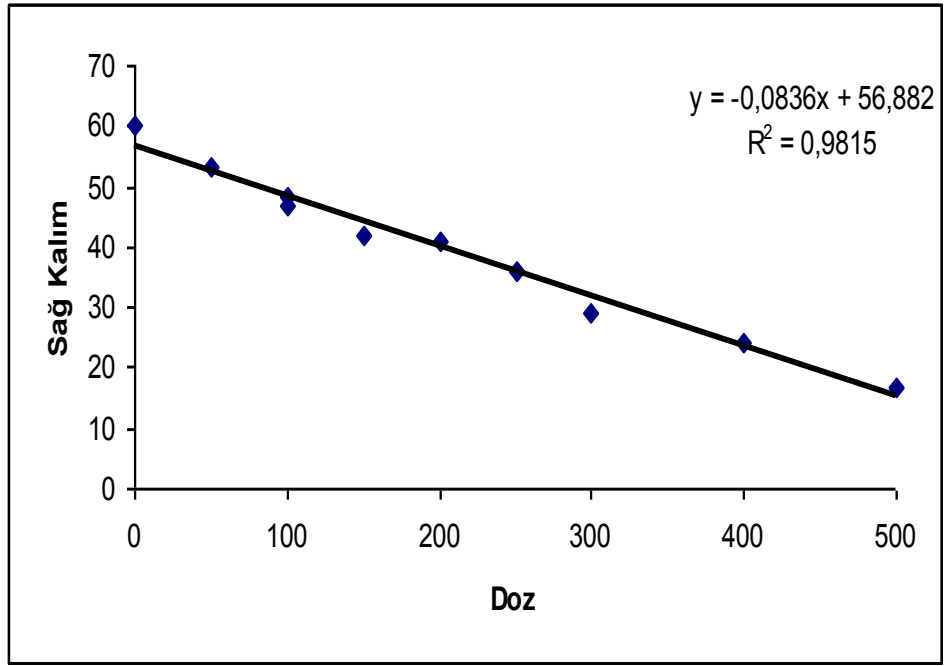


Şekil 4.2 İzmir Özbaş tütün çeşidine ait fidelerde gama radyasyonun etkisi

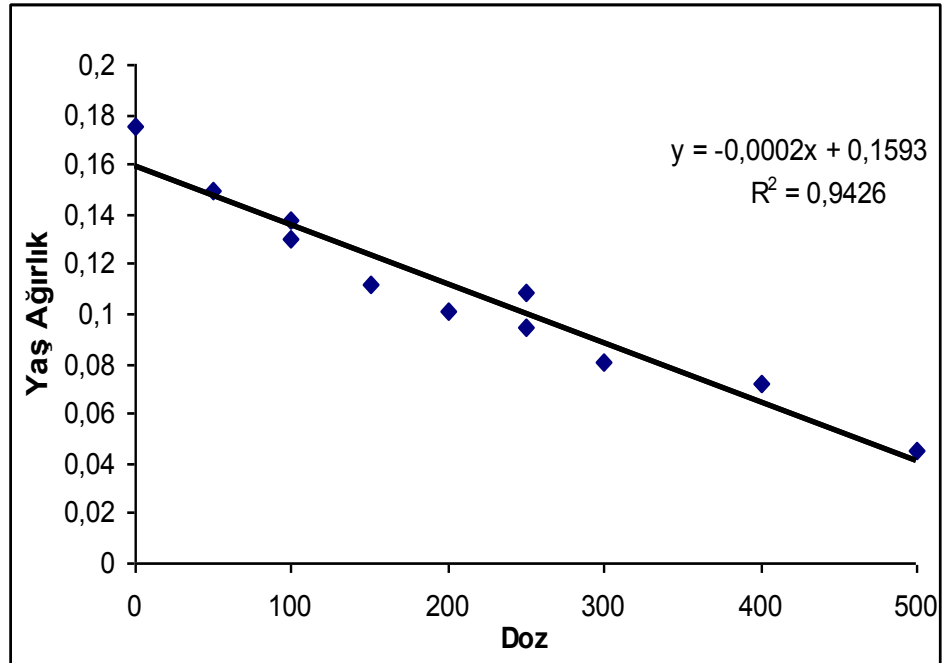
Sağ kalım değerlerine göre LD₅₀ dozu: 288 Gy

Yaş Ağırlık değerlerine göre GR₅₀ dozu: 407 Gy

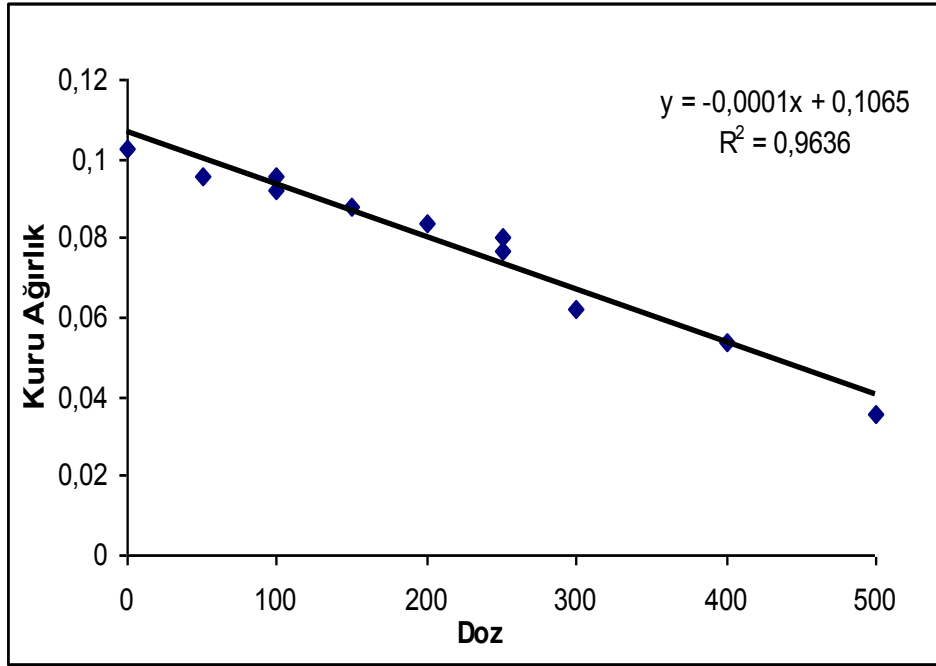
Kuru Ağırlık değerlerine göre GR₅₀ dozu: 268 Gy



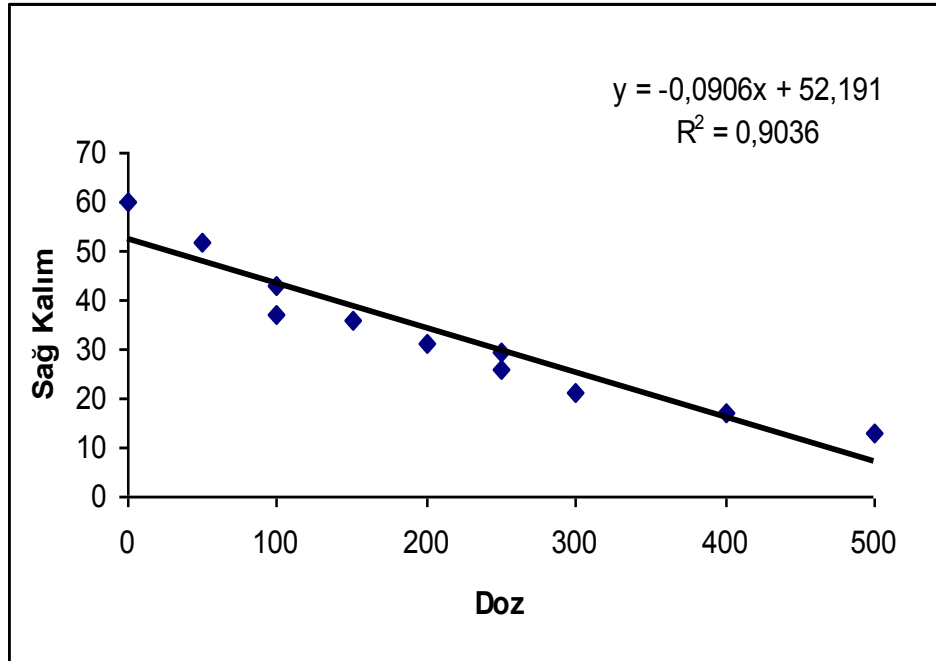
Şekil 4.3 İzmir Özbaş tütün çeşidine uygulanan gama radyasyon dozu ve sağ kalım arasındaki ilişki



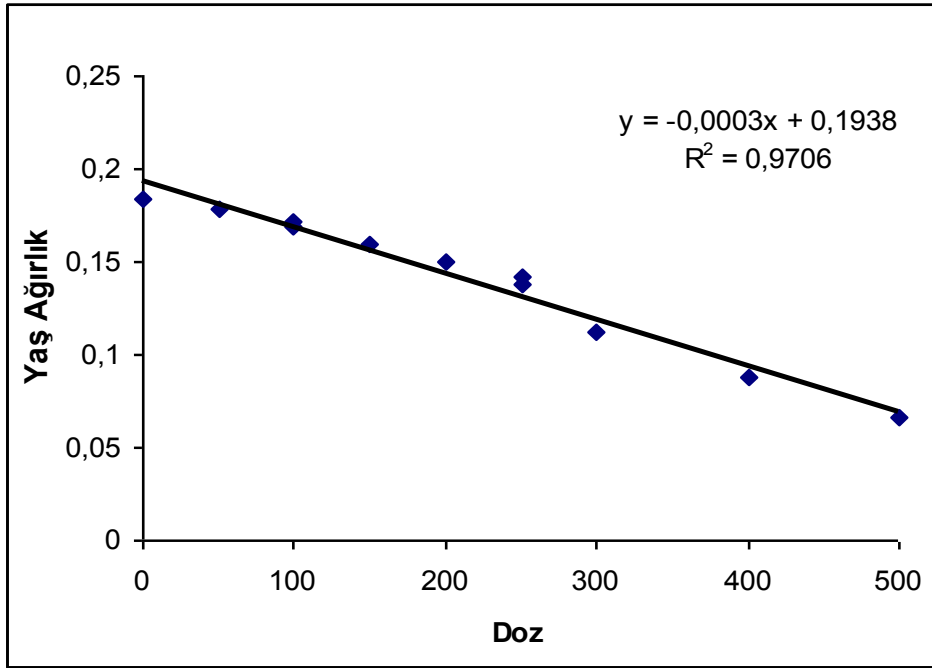
Şekil 4.4 İzmir Özbaş çeşidine uygulanan gama radyasyon dozu ve yaş ağırlık arasındaki ilişki



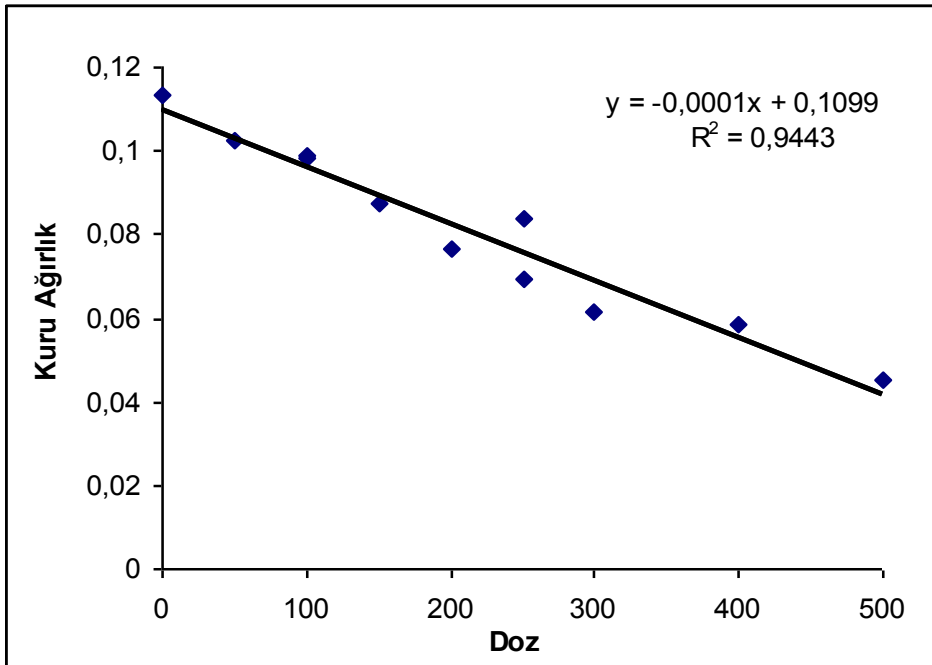
Şeki 4.5 İzmir Özbaşı çeşidine uygulanan gama radyasyon dozu ve kuru ağırlık arasındaki ilişki



Şekil 4.6 Akhisar 97 tütün çeşidine uygulanan gama radyasyon dozu ve sağ kalım arasındaki ilişki



Şekil 4.7 Akhisar 97 çeşidine uygulanan gama radyasyon dozu ve yaş ağırlık arasındaki ilişki



Şekil 4.8 Akhisar 97 çeşidine uygulanan gama radyasyon dozu ve kuru ağırlık arasındaki ilişki

İzmir Özbaş tütün çeşidine uygulanan gama radyasyon dozu ve sağ kalım arasındaki regresyon analizinin sonucunda $y=-0.0836x+56.882$ ve $R^2= 0.9815$ iken Akhisar 97 çeşidinde sağ kalım ve doz arasındaki analiz sonucunda elde edilen eğrinin denklemi $y=-0.0906x+52.191$ ve $R^2= 0.9036$ olarak bulundu. Işınlanan tohumlardaki sağ kalım oranı, radyasyon dozundan etkilenmektedir. İzmir Özbaş ve Akhisar 97 tütün çeşitlerine ait yaş ağırlık değerlerine göre elde edilen regresyon eğrilerinin denklemleri sırasıyla $y=-0.0002x+0.1593$ ve $y=-0.003x+0.1938$ olarak bulundu. Aynı verilere ait R^2 değerleri ise sırasıyla 0.9426 ve 0.9706'dır. Kuru ağırlık verilerinden elde edilen eğrilerin denklemleri ise İzmir Özbaş ve Akhisar 97 çeşitleri için sırasıyla $y=-0.0001x+0.1065$ ve $y=-0.0001x+0.1099$ 'dur. R^2 değerleri ise sırasıyla 0.9636 ve 0.9443 'tür. Regresyon analizi, artan radyasyon dozlarına göre yaş ve kuru ağırlığın da değiştiğini gösterdi.

Akhisar 97 tütün çeşidi, İzmir Özbaş tütün çeşidine göre, radyasyona daha hassas olarak bulundu.

Çalışmada kullanılacak olan ışınlama dozları tütün çeşitlerinin sağ kalım verileri esas alınarak belirlendi. Ön denemede saptanan LD_{30} ve LD_{50} dozlarının alt ve üst dozları seçilerek, 100 Gy, 200 Gy, 300 Gy ve 400 Gy, çalışma dozları olarak belirlendi.

4.1.2.Tarla Denemesi (M₁ Generasyonu)

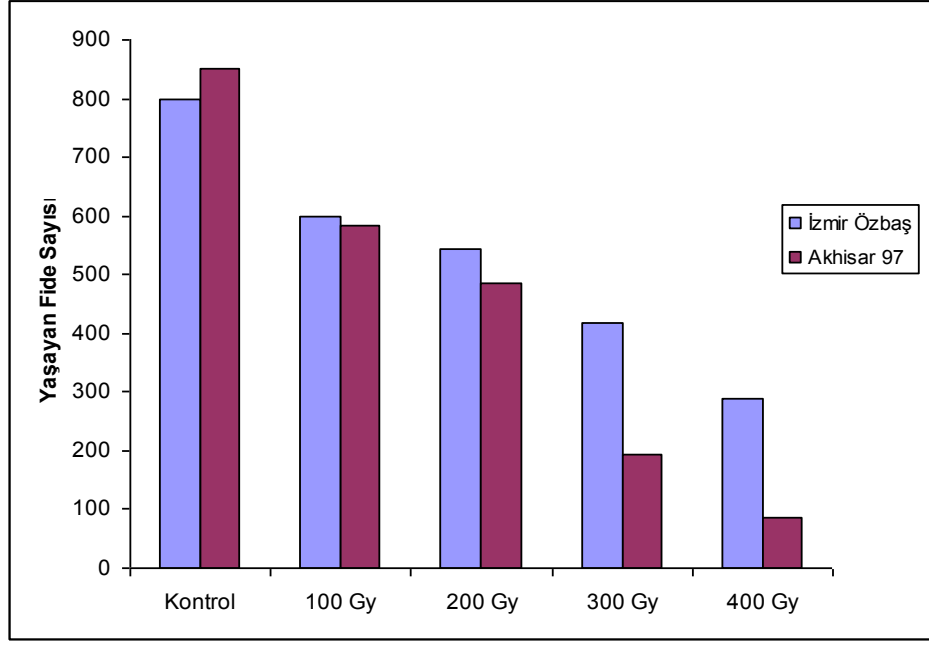
İzmir Özbaş ve Akhisar 97 (*Nicotiana tabacum* L.) tütün çeşitlerine ait Şubat ayında yastıklara ekilen tohum sayıları, tarlaya şaşırtılan ve sonbaharda hasadı yapılan fide sayıları Tablo 4.5'te verildi.

Tablo 4.5 M₁ generasyonu eldesi için ekimi yapılan tohum sayıları ve hasadı yapılan fide sayıları

Çeşit		Ekilen Tohum Sayısı	Tarlaya Şaşırtılan Fide Sayısı	Hasadı yapılan Fide Sayısı
İzmir	Kontrol	1000	875	725
Özbaş	100 Gy	1000	655	570
	200 Gy	1000	570	519
	300 Gy	1000	430	418
	400 Gy	1000	326	290
Akhisar 97	Kontrol	1000	875	850
	100 Gy	1000	616	585
	200 Gy	1000	512	486
	300 Gy	1000	270	195
	400 Gy	1000	250	85

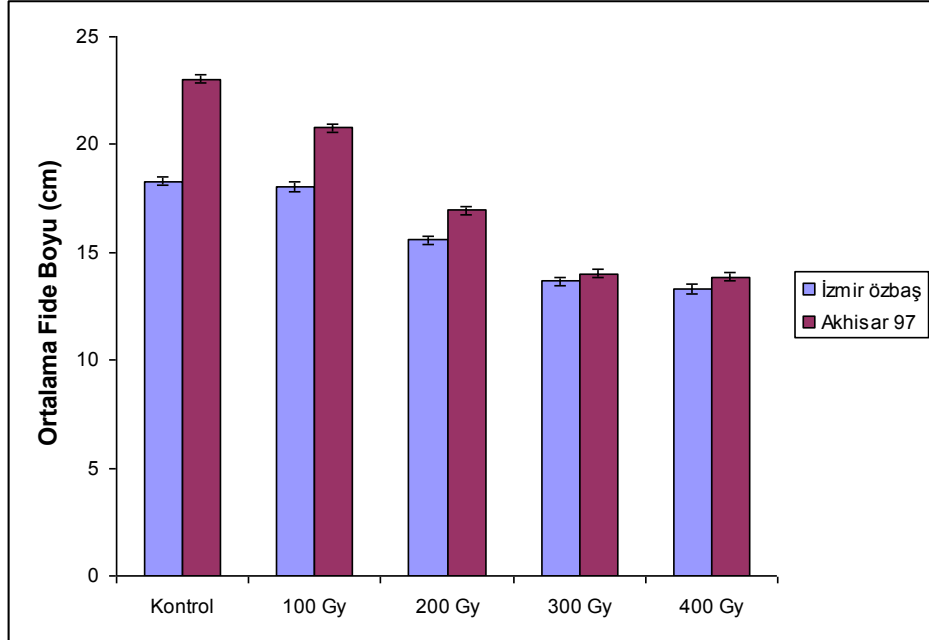
Radyasyona dayanıklı olan İzmir Özbaş tütün çeşidinde 200 Gy radyasyon uygulamasında yastıklara ekilen tohumların %57'si tarlaya şaşırtılırken, 300 ve 400 Gy uygulamalarında sırasıyla ekimi yapılan tohumların %43 ve %33'ü tarlaya şaşırtıldı. Radyasyona hassas olan Akhisar 97 çeşidinde de aynı dozlarda ışınlanarak yastıklara ekilen tohumların sırasıyla %51, %27 ve %25'i tarlaya ekildi. Hasadı yapılan fide sayıları değerlendirildiğinde, her iki çeşitte de, uygulanan gama radyasyon dozunun artışına paralel olarak bir azalma gözlemlendi.

Tütün yastıklarından tarlaya şaşırtılan kontrol ve ışınlanmış 1,5 aylık yaşayan fide sayıları, fidelerin boyları ve bu fidelerden elde edilen yaprak sayıları da Şekil 4.9, 4.10 ve 4.11'de gösterildi. Radyasyonun artan dozlarına paralel olarak şaşırtılan fide boyunda bir azalma belirlendi.



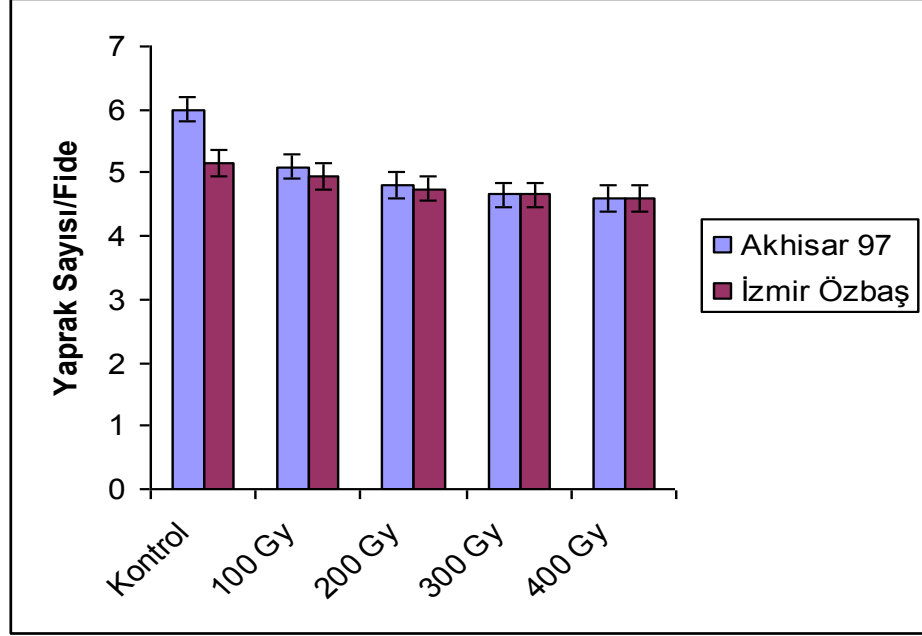
Şekil 4.9 İzmir Özbaş ve Akhisar 97 tütün çeşitlerine ait M₁ generasyonunda yaşayan fide sayıları

İzmir Özbaş ve Akhisar 97 tütün çeşitlerinde, gama radyasyon dozunun artışına paralel olarak, yaşayan fide sayılarında azalma gözlemlendi.



Şekil 4.10 İzmir Özbaş ve Akhisar 97 (*Nicotiana tabacum* L.) tütün çeşitlerine ait kontrol ve ışınlanmış fidelerin ortalama boyları (\pm SD)

Her iki tütün çeşidine ait kontrol ve ışınlanmış fidelerin boylarında, doz artışına bağlı olarak bir azalma gözlemlendi.



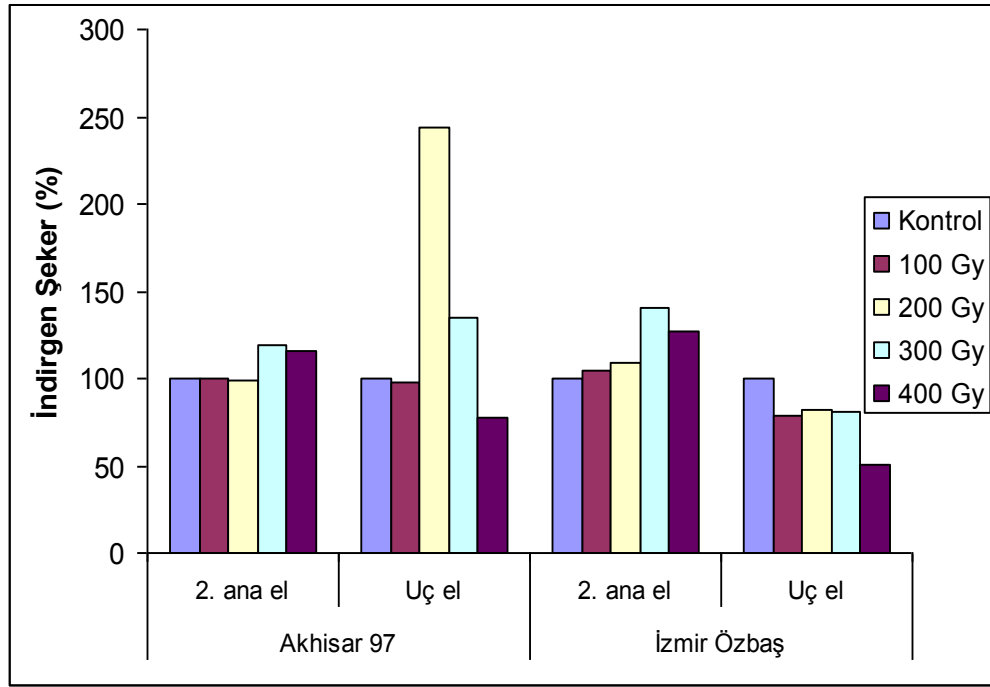
Şekil 4.11 İzmir Özbaş ve Akhisar 97 (*Nicotiana tabacum* L.) tütün çeşitlerine ait kontrol ve ışınlanmış fidelerdeki yaprak sayıları (\pm SD)

Yaprak sayısında kontrole göre her iki çeşit için gama radyasyon dozunun artışına bağlı olarak bir azalma sağlanırken, 200 Gy'den sonra bir değişiklik gözlenmedi. 200 Gy'lik radyasyon dozu uygulamasıyla, Akhisar 97 tütün çeşidinin yaprak sayısında kontrole göre %20'lik bir azalma gözlenirken, İzmir Özbaş çeşidinde %7.77'lik bir azalma gözlemlendi.

Tarla denemesinde de Akhisar 97'nin, İzmir Özbaş çeşidine göre radyasyondan daha fazla etkilendiği görüldü.

4.4.2.1. Kırımı Yapılan Tütün Yapraklarında Şeker ve Nikotin Miktarları

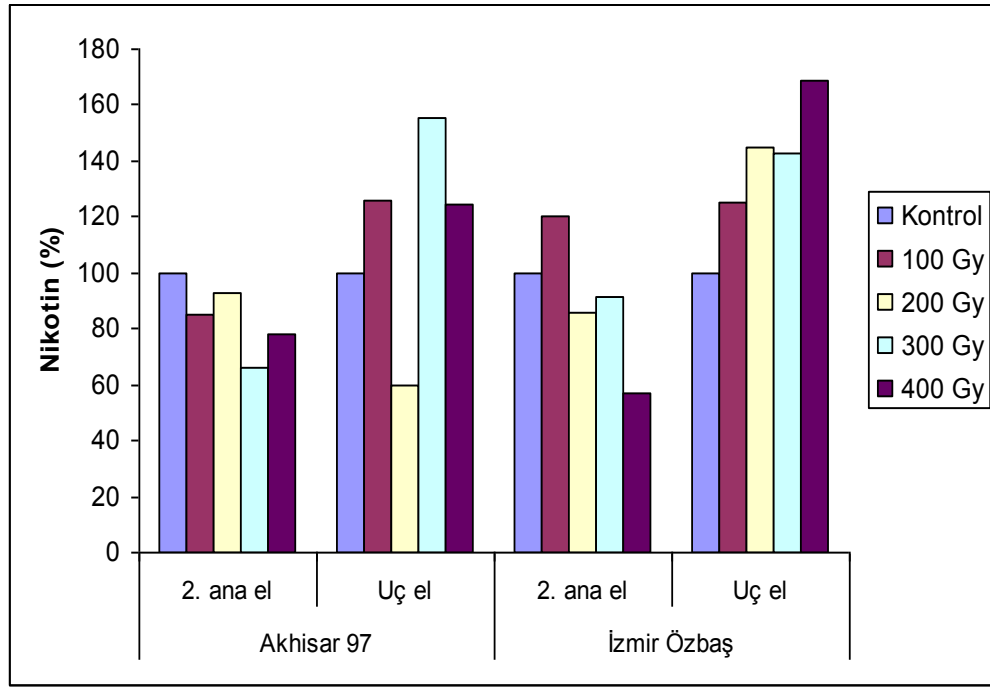
Işınlanmış ve kontrol tütün çeşitlerine ait indirgen şeker miktarları Bölüm 3.3'te anlatıldığı şekilde yapıldı ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.12'de verildi.



Şekil 4.12 Gama radyasyonu ile ışınlanan Akhisar 97 ve İzmir Özbaş tütün çeşitlerine ait 2. ana ve uç ellere ait yüzde indirgen şeker miktarları

Akhisar 97 kontrol bitkisinde 2. ana elde indirgen şeker miktarı 12.13 iken, uç ellerde bu değer 4.40'a geriledi. Akhisar 97 tütün çeşidinde, 2. ana elde, 100 ve 200 Gy uygulamalarında indirgen şeker miktarında önemli bir farklılık görülmezken, 300 ve 400 Gy radyasyon dozu uygulamalarında şeker konsantrasyonunda artış gözlemlendi. Aynı çeşitte uç ellere bakıldığında 200 Gy uygulamasıyla indirgen şeker konsantrasyonunun 4.40'tan 10.72'ye yükseldiği, 400 Gy radyasyon dozu uygulamasıyla 3.42'ye gerilediği gözlemlendi.

İzmir Özbaş tütün çeşidinde ait veriler değerlendirildiğinde, kontrol bitkisinde indirgen şeker miktarı 10.62 iken, uç elde 7.43 olarak hesaplandı. 2. ana elde, 100 ve 200 Gy uygulamasına ait yapraklarda sırasıyla indirgen şeker konsantrasyonları 11.07 ve 11.54 iken, 300 Gy radyasyon uygulamasına ait yapraklarda 14.97, 400 Gy'e ait yapraklarda ise 13.50 olarak bulundu. İzmir Özbaş çeşidinde ait uç ellerde indirgen şeker oranının uygulanan doza bağlı olarak azaldığı gözlemlendi. Her iki tütün çeşidinde ait elde edilen yüzde nikotin miktarları Şekil 4.13'te verildi.



Şekil 4.13 Gama radyasyonu ile ışınlanan İzmir Özbaşı ve Akhisar 97 tütün çeşitlerinin 2. ana ve uç ellere ait yüzde nikotin miktarları

Akhisar 97 tütün çeşidine ait 2. ana ellere ait kontrol bitkisinin yapraklarında saptanan nikotin miktarı 0.41 iken, uç elde 0.85 olarak bulundu. 100 Gy 'de 2. ana elde 0.35 olan nikotin miktarının uç elde 1.07'ye, 200 Gy uygulamasında 0.38'den 0,51'e, 300 Gy ve 400 Gy radyasyon uygulamalarına ait yapraklarda sırasıyla 0.26 ve 0.32'den 1.32 ve 1.06'ya yükseldiği gözlemlendi.

İzmir Özbaşı çeşidine ait kontrol bitkisinde 2. ana ele ait yapraklarda ölçülen nikotin miktarı 0.35'den uç ellerde 0.80'e yükseldi. 100 Gy, 200 Gy, 300 Gy ve 400 Gy radyasyon ile ışınlanmış tütün bitkilerine ait yapraklarda 2. ana ellerde sırasıyla 0.42, 0.30, 0.32 ve 0.20 iken uç ellerde ölçülen nikotin miktarları aynı dozlarda sırasıyla 1.00, 1.16, 1.14 ve 1.35 olarak hesaplandı.

2. ana elde her iki tütün çeşidinde radyasyon dozunun artışıyla, indirgen şeker miktarında bir artış görülürken, bu artışın doz artışıyla direkt bir ilişkisi bulunmadı. Uç ellerde indirgen şeker miktarları, doz artışıyla bir azalış gösterirken, bu değişimlerin de uygulanan radyasyon dozuyla ilişkili olmadığı bulundu.

Nikotin miktarları, her iki çeşitte de 2. ana elde doz artışından bağımsız olarak azalma gösterdi. Uç ellerdeki nikotin miktarındaki artışın da, yapılan istatistiksel analizler sonucunda doz artışından bağımsız olduğu görüldü.

4.2. M₂ GENERASYONUNA AİT BULGULAR

Sonbaharda hasadı yapılan M₁ generasyonuna ait tohumların Şubat ayında karıştırılarak tekrar deneme tarlasına ekimi yapıldıktan sonra elde edilen M₂ generasyonuna ait fidelerin gelişimleri gözlemlendi. Her iki tütün çeşidine ait toplam fide sayıları ile hasat edilen fide sayıları Tablo 4.6'da verildi.

Tablo 4.6 İzmir Özbaş ve Akhisar 97 tütün (*Nicotiana tabacum* L.) çeşitlerinin M₂ generasyonuna ait tarlaya ekilen ve hasat edilen bitki sayıları

Çeşit		Toplam Bitki Sayısı	Hasat Edilen Bitki Sayısı
İzmir Özbaş	Kontrol	700	655
	100 Gy	500	405
	200 Gy	410	300
	300 Gy	365	217
	400 Gy	250	68
Akhisar 97	Kontrol	695	650
	100 Gy	550	455
	200 Gy	440	318
	300 Gy	250	91
	400 Gy	63	18

İzmir Özbaş çeşidi M₂ generasyonuna ait fidelerde, hasat edilen fide sayılarının her iki tütün çeşidinde de gama radyasyonunun artışına paralel olarak azaldığı gözlemlendi. 300 Gy gama radyasyon dozu uygulaması sonucunda İzmir Özbaş tütün çeşidi M₂ generasyonuna ait 217 adet fidenin hasadı yapılırken, 400 Gy ile ışınlanmış 68 adet

fidenin hasadı yapıldı. Akhisar 97 çeşidinde ise, 300 Gy ve 400 Gy gama radyasyon doz uygulamalarında M₂ generasyonunda sırasıyla 91 ve 18 adet fidenin hasadı yapıldı.

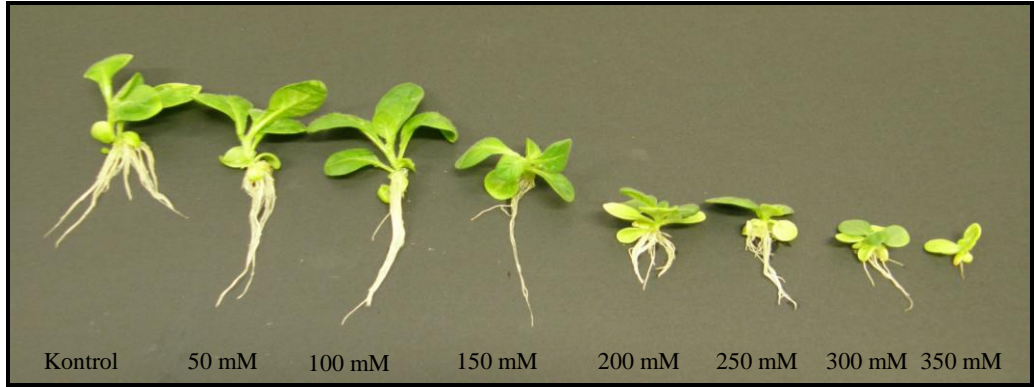
M₂ generasyonuna ait tohumlar, tek bitki hasadı yapılarak toplandı ve toplam 1900 bitkiden tohum alındı. *In vitro* koşullarda tuz stresine toleranslı mutant bireylerin seleksiyonu M₃ generasyonunda yapıldı.

4.3. İN VİTRO TUZ DOZ DENEMESİNDEN ELDE EDİLEN BULGULAR

In vitro tuz doz denemesinde 14 gün süreyle bitkilerin gelişimleri gözlemlendi. Şekil 4.14 ve 4.15'te sırasıyla Akhisar 97 ve İzmir Özbaş tütün çeşitlerine ait bitkilerin *in vitro* koşullarda uygulanan tuz konsantrasyonlarındaki gelişimlerinin, uygulanan konsantrasyonlar arttıkça azaldığı görüldü. Akhisar 97 çeşidinin İzmir Özbaş'a göre tuzluluğa daha hassas olduğu görüldü.

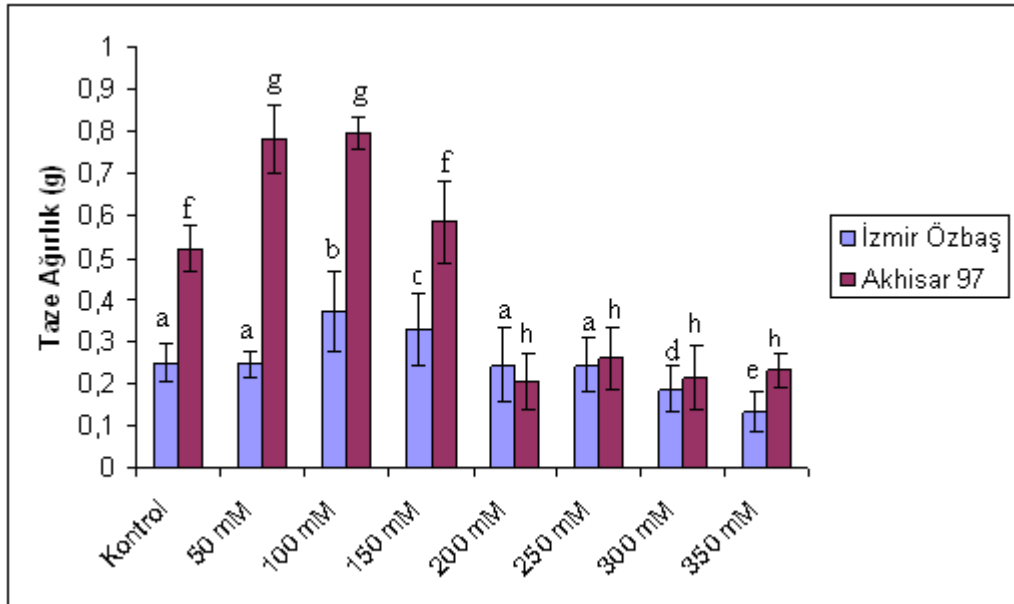


Şekil 4.14 Akhisar 97 (*Nicotiana tabacum* L.) tütün çeşidinde 14. günde tuzlu besiyerlerindeki gelişimleri



Şekil 4.15 İzmir Özbaş (*Nicotiana tabacum* L.) tütün çeşidine ait bitkilerin 14. günde tuzlu besiyerlerindeki gelişimleri

Tuz doz denemesinin 14. gününde her iki tütün çeşidine ait bitkilerin taze ağırlıkları, sürgün boyları ve kök boyları ölçüldü. Tüm değerler Duncan'ın çoklu değişim testine göre değerlendirildi.



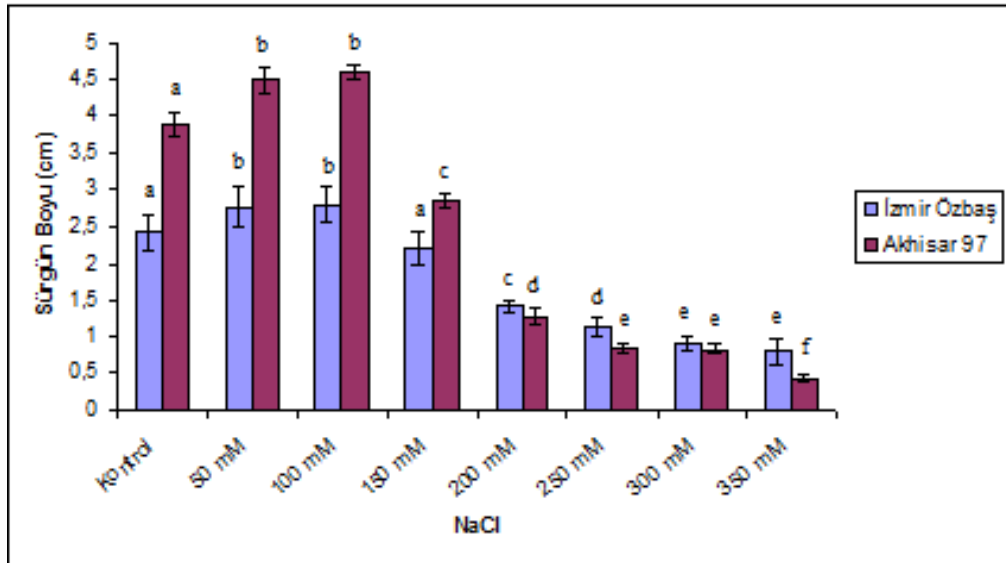
Şekil 4.16 İzmir Özbaş ve Akhisar 97 (*Nicotiana tabacum* L.) tütün çeşitlerine ait bitkilerin çeşitli tuz konsantrasyonlarında NaCl içeren besiyerlerindeki 14. günlerinde elde edilen yaş ağırlıkları (g \pm SD),

*Her çeşit kendi içinde değerlendirilerek harfleme yapılmıştır. Aynı harfler ile gösterilmeyen değerler, Duncan'ın çoklu değişim testine göre anlamlıdır. Her bir deneme 3 tekrarlı yapılmıştır ($P < 0.05$).

Farklı konsantrasyonlarında NaCl içeren besiyerlerinde yetiştirilen İzmir Özbaş ve Akhisar 97 tütün çeşitlerine ait fidelerin taze ağırlıkları saptanarak (Şekil 4.16),

Duncan'ın çoklu değişim testine göre değerlendirildi ($P<0.05$). İzmir Özbaş çeşidinde 100 ve 150 mM NaCl içeren besiyerlerinde yetişen fidelerin taze ağırlıklarında artış gözlemlendi. Bu artışın kontrole göre anlamlı olduğu bulundu. 200 ve 250 mM NaCl içeren besiyerlerinde yetişen fidelerin taze ağırlıkları ile kontrol bitkileri arasında anlamlı bir fark bulunmadı. 300 ve 350 mM NaCl içeren besiyerinde yetişen fidelerin taze ağırlıklarındaki azalma birbirlerine ve kontrole göre anlamlı bulundu. Akhisar 97 çeşidinde 50 ve 100 mM NaCl uygulamasında fidelerin taze ağırlıklarında kontrole göre anlamlı bir artış gözlemlendi. Ancak 150 mM uygulamasında elde edilen taze ağırlık 50 ve 100 mM'a göre anlamlı bir düşüş gösterirken kontrole göre farklılık bulunmadı. 200 mM ve daha yüksek konsantrasyonlarda uygulanan NaCl'ün fidelerin taze ağırlıklarında önemli bir azalışa neden oldukları gözlemlenmiş olup bu azalışların kendi aralarında anlamlı bir farklılık göstermedikleri belirlendi.

Çeşitli tuz konsantrasyonlarındaki Akhisar 97 ve İzmir Özbaş tütün çeşitlerine ait fidelerin 14. gündeki sürgün boyları hesaplanmış olup Şekil 4.17' de verildi.



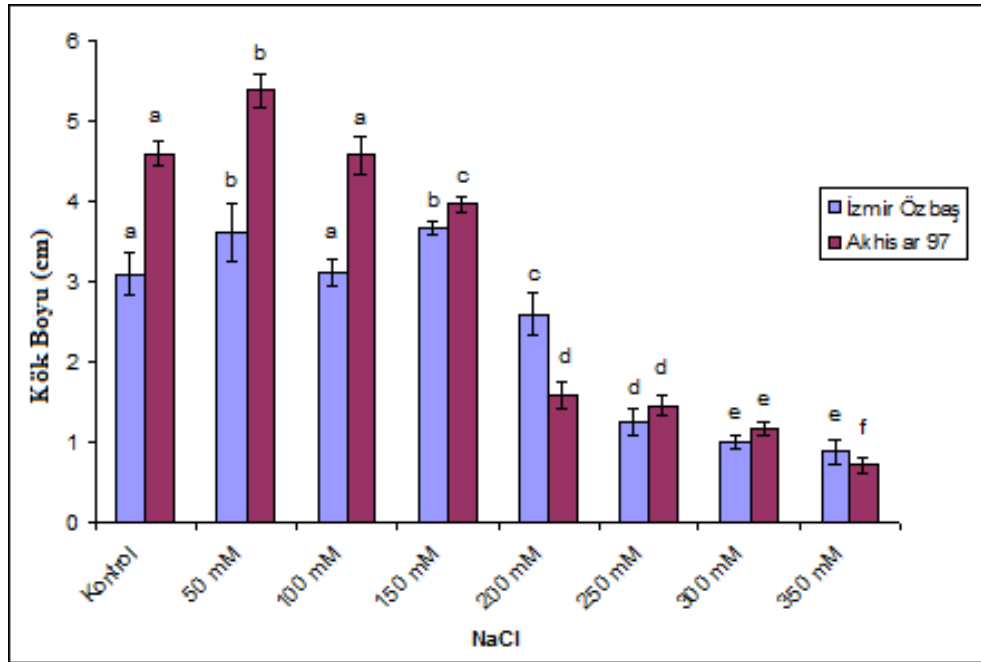
Şekil 4.17 İzmir Özbaş ve Akhisar 97 (*Nicotiana tabacum* L.) tütün çeşitlerine ait bitkiciklerin çeşitli tuz konsantrasyonlarında NaCl içeren besiyerlerindeki 14. günlerinde elde edilen sürgün boyları (cm \pm SD)

*Her çeşit kendi içinde değerlendirilerek harfleme yapılmıştır. Aynı harfler ile gösterilmeyen değerler, Duncan'ın çoklu değişim testine göre anlamlıdır. Her bir deneme 3 tekrarlı yapılmıştır ($P<0.05$).

İzmir Özbaş çeşidinde 50 ve 100 mM tuz içeren besiyerlerinde gelişen fidelerin sürgün boylarındaki artış kontrole göre istatistiksel açıdan anlamlıdır. Ancak 200 mM ve daha yüksek doz uygulandığında İzmir Özbaş tütün çeşidine ait fidelerin sürgün boylarında

azalma meydana geldi. Bu azalış kontrole göre anlamlı bir farklılık gösterdi. 250 mM'den daha yüksek dozlarda kontrole göre önemli bir azalma varken, dozun artışına paralel olarak sürgün boyunda istatistiksel bir fark bulunmadı. Akhisar 97 tütün çeşidine ait bitkilerin sürgün boyunda *in vitro* koşullarda uygulanan 50 ve 100 mM NaCl konsantrasyonlarında meydana gelen artış kontrole göre anlamlı bulundu. 150 mM ve daha yüksek NaCl konsantrasyonlarında sürgün boylarında bir azalma meydana geldi. Meydana gelen bu azalış kontrole göre istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık gösterdi ($P<0.05$). 200 mM NaCl konsantrasyonunda İzmir Özbaş ve Akhisar 97 tütün çeşidine ait fidelerin boyları kontrole göre sırasıyla %41.05 ve %67.21 oranında bir azalma gösterdi.

Çeşitli tuz konsantrasyonlarındaki Akhisar 97 ve İzmir Özbaş tütün çeşitlerine ait fidelerin 14. gündeki kök boylarına ait grafik Şekil 4.18'de gösterildi.



Şekil 4.18 İzmir Özbaş ve Akhisar 97 (*Nicotiana tabacum* L.) tütün çeşitlerine ait bitkiciklerin çeşitli tuz konsantrasyonlarında NaCl içeren besiyerlerindeki 14. günlerinde elde edilen kök boyları (cm \pm SD)

*Her çeşit kendi içinde değerlendirilerek harfleme yapılmıştır. Aynı harfler ile gösterilmeyen değerler, Duncan'ın çoklu değişim testine göre anlamlıdır. Her bir deneme 3 tekrarlı yapılmıştır ($P<0.05$).

Farklı NaCl konsantrasyonlarında yetiştirilen 14 günlük Akhisar 97 tütün çeşidine ait kök boyları 50 mM konsantrasyon uygulamasında kontrole göre anlamlı bir artış gösterdi

($P<0.05$). 150 mM ve daha yüksek NaCl konsantrasyon uygulamalarında kök boyundaki azalış kontrole göre anlamlı olarak gözlemlendi. 200 ve 250 mM arasındaki farklılığın istatistiksel açıdan anlamlı olmadığı görüldü. Ancak 300 ve 350 mM NaCl uygulamalarında fidelerin kök boylarındaki azalma istatistiksel açıdan anlamlıdır ($P<0.05$). İzmir Özbaş çeşidinde 50 ve 150 mM NaCl uygulamalarında kök boyu açısından kontrole göre bir artış olduğu ancak 200 mM ve daha yüksek NaCl konsantrasyonlarında gözlenen azalmanın kontrole göre istatistiksel açıdan anlamlı olduğu görüldü ($P<0.05$). 200 mM NaCl konsantrasyonunda İzmir Özbaş ve Akhisar 97 tütün çeşidine ait fidelerin kök boyları ise sırasıyla %15,98 ve %65,79 oranında azalma gösterdi.

4.4. *IN VITRO* TUZ DOZ DENEMESİNDE BİYOKİMASAL ANALİZLERDEN ELDE EDİLEN BULGULAR

4.4.1. Fotosentetik Pigmentler

Akhisar 97 ve İzmir Özbaş (*Nicotiana tabacum* L.) tütün çeşitlerine ait *in vitro* ortamda yetiştirilen fidelere farklı konsantrasyonlarda uygulanan tuz stresinin 14. gününde hasat edilen yapraklara ait klorofil konsantrasyonlarına ait veriler sırasıyla Tablo 4.7 ve Tablo 4.8'de verildi.

Tablo 4.7. Akhisar 97 tütün çeşidine ait *in vitro* ortamda tuz stresine maruz bırakılan bitkilerin 14. gündeki klorofil konsantrasyonları (mg/g TA)

Akhisar 97			
NaCl	Klorofil a	Klorofil b	Total Klorofil
Kontrol	40,6685±1,23 ^a	7,6571±1,20 ^a	48,3256±0,86 ^a
50 mM	44,9604±0,45 ^b	7,1419±1,20 ^a	52,1023±1,30 ^b
100 mM	45,8132±2,29 ^c	20,9249±0,98 ^b	66,7382±0,75 ^c
150 mM	41,1641±1,32 ^a	12,5859±0,87 ^c	53,7499±0,96 ^d
200 mM	28,5040±1,13 ^d	7,7367±0,76 ^a	36,2407±0,57 ^e
250 mM	19,3855±0,26 ^e	1,4511±1,20 ^d	20,8366±0,65 ^f
300 mM	15,6536±0,98 ^f	1,5639±0,54 ^d	17,2175±0,36 ^g
350 mM	9,3851±1,11 ^g	0,4529±0,36 ^e	9,8379±0,72 ^h

*Her çeşit kendi içinde değerlendirilerek harfleme yapılmıştır. Aynı harfler ile gösterilmeyen değerler, Duncan'ın çoklu değişim testine göre anlamlıdır. Her bir deneme 3 tekrarlı yapılmıştır ($P<0.05$).

Akhisar 97 tütün çeşidine ait *in vitro* ortamda tuz stresine maruz bırakılan bitkilerin klorofil a ve total klorofil konsantrasyonları, 50, 100 ve 150 mM NaCl uygulamalarında kontrole göre bir artış gösterdi. 200 mM ve daha yüksek tuz konsantrasyonlarında kontrole göre istatistiksel açıdan anlamlı bir azalış gözlemlendi. Klorofil b konsantrasyonlarında ise, 200 mM NaCl uygulamasına kadar olan tuz uygulamalarında kontrole göre anlamlı artışlar belirlendi. Daha yüksek tuz uygulamalarında ise Akhisar 97 çeşidinde kontrole göre klorofil b'nin miktarının istatistiksel açıdan anlamlı olarak azaldığı gözlemlendi ($P<0.05$).

Tablo 4.8. İzmir Özbaş tütün çeşidine ait *in vitro* ortamda tuz stresine maruz bırakılan bitkilerin 14. gündeki klorofil konsantrasyonları (mg/g TA)

İzmir Özbaş			
NaCl	Klorofil a	Klorofil b	Total Klorofil
Kontrol	28,2724±1,00 ^a	15,1447±0,96 ^a	43,4171±0,78 ^a
50 mM	38,2587±1,30 ^b	17,3492±0,63 ^b	55,6079±0,54 ^b
100 mM	59,7009±1,20 ^c	32,8707±0,85 ^c	92,5715±1,20 ^c
150 mM	51,7506±0,99 ^d	22,3144±0,86 ^d	74,0650±1,06 ^d
200 mM	40,9992±0,87 ^e	16,1339±1,20 ^b	57,1331±0,95 ^b
250 mM	17,2018±0,95 ^f	6,9913±1,05 ^e	24,1931±0,56 ^e
300 mM	10,4816±0,56 ^g	5,8549±0,76 ^f	16,3366±0,73 ^f
350 mM	7,3686±0,45 ^h	3,9163±0,56 ^g	11,2849±0,93 ^g

*Her çeşit kendi içinde değerlendirilerek harfleme yapılmıştır. Aynı harfler ile gösterilmeyen değerler, Duncan'ın çoklu değişim testine göre anlamlıdır. Her bir deneme 3 tekrarlı yapılmıştır ($P<0.05$).

İzmir Özbaş çeşidine ait *in vitro* tuz stresine maruz bırakılan fidelerin 50, 100, 150 ve 200 mM NaCl uygulamalarında klorofil a, klorofil b ve total klorofil konsantrasyonlarının istatistiksel açıdan anlamlı olarak arttıkları gözlemlendi. 250 mM ve daha yüksek konsantrasyonlarda uygulanan NaCl stresinin ise bu değerlerde kontrole göre anlamlı bir azalmaya yol açtığı görüldü ($P<0.05$).

In vitro tuz stresine maruz kalan Akhisar 97 ve İzmir Özbaş tütün fidelerinin karotenoid konsantrasyonlarına ait veriler Tablo 4.9'da verildi.

Tablo 4.9. Akhisar 97 ve İzmir Özbaş tütün çeşitlerine ait *in vitro* tuz stresine maruz kalan bitkilerin 14. gündeki karotenoid konsantrasyonları (mg/g TA)

NaCl	Akhisar 97	İzmir Özbaş
Kontrol	13,0153±0,84 ^a	10,9161±0,65 ^a
50 mM	14,1665±0,48 ^b	11,2144±0,32 ^a
100 mM	15,4755±0,64 ^c	17,8276±0,64 ^b
150 mM	13,1547±0,42 ^a	13,1904±0,52 ^c
200 mM	10,2026±0,64 ^d	11,6141±0,16 ^d
250 mM	8,3156±0,24 ^e	4,70039±0,24 ^e
300 mM	6,3341±0,45 ^f	2,1140±0,17 ^f
350 mM	5,7738±0,16 ^g	1,7697±0,15 ^g

*Her çeşit kendi içinde değerlendirilerek harfleme yapılmıştır. Aynı harfler ile gösterilmeyen değerler, Duncan'ın çoklu değişim testine göre anlamlıdır. Her bir deneme 3 tekrarlı yapılmıştır (P< 0.05).

Akhisar 97 çeşidine ait fidelerin karotenoid konsantrasyonları, 50 ve 100 mM NaCl uygulamalarında kontrole göre anlamlı bir artış gösterdi. 200 mM ve yüksek NaCl konsantrasyonlarının sonucunda gözlenen karotenoid miktarlarındaki azalmalar, kontrole göre anlamlı olarak bulundu (P<0.05).

İzmir Özbaş tütün çeşidine ait fidelerde 50, 100, 150 ve 200 mM dozlarda NaCl uygulamaları, karotenoid miktarlarında bir artışa yol açtı. 250 mM ve yüksek tuz konsantrasyonlarında ise, karotenoid uygulamalarında gözlenen azalma, kontrole göre ve kendi aralarında istatistiksel açıdan anlamlı olarak bulundu.

4.4.2.Total Protein Analizi

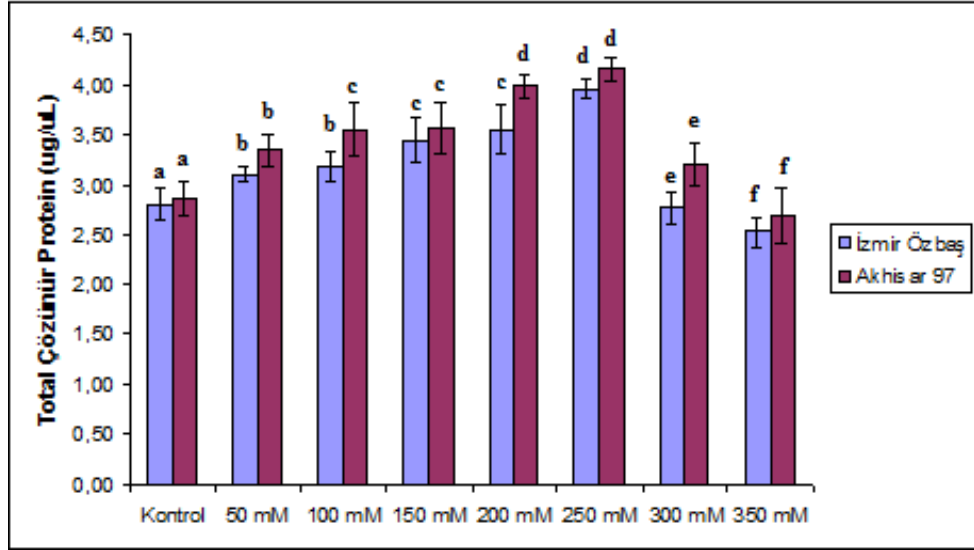
In vitro tuz doz denemesinde her iki tütün çeşidine ait yapraklarda saptanan total protein miktarları belirlendi. Akhisar 97 tütün çeşidinde 300 mM NaCl konsantrasyonuna kadar olan tüm uygulamalarda total protein konsantrasyonlarında istatistiksel açıdan anlamlı bir artış gözlemlendi (P<0.05). 350 mM NaCl stres uygulamasında ise total protein konsantrasyonunun kontrole göre azaldığı belirlendi. İzmir Özbaş tütün çeşidinde ise 250 mM NaCl konsantrasyonuna kadar maruz kalınan tuz stresinin total protein konsantrasyonunda istatistiksel açıdan anlamlı artışa sebep olduğu gözlemlendi. 300 ve 350 mM konsantrasyonlarında NaCl stresine maruz kalan fidelerin yapraklarında saptanan

total protein miktarlarındaki azalmanın kontrole göre anlamlı olduğu bulundu (Şekil 4.19). Elde edilen veriler Tablo 4.10'da verildi.

Tablo 4.10. Akhisar 97 ve İzmir Özbaş tütün çeşidine ait *in vitro* tuz stresine maruz kalan bitkilerin 14. gündeki total protein konsantrasyonları ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)

NaCl	Akhisar 97	İzmir Özbaş
Kontrol	2,8593±0,1706 ^a	2,8015±0,1643 ^a
50 mM	3,3437±0,1603 ^b	3,1000±0,0791 ^b
100 mM	3,5591±0,2650 ^c	3,1847±0,1469 ^b
150 mM	3,5747±0,2591 ^c	3,4483±0,2156 ^c
200 mM	3,9867±0,1188 ^d	3,5566±0,2493 ^c
250 mM	4,1570±0,1238 ^d	3,9623±0,0817 ^d
300 mM	3,2042±0,2238 ^e	2,7680±0,1591 ^e
350 mM	2,6938±0,2697 ^f	2,5281±0,1502 ^f

*Her çeşit kendi içinde değerlendirilerek harfleme yapılmıştır. Aynı harfler ile gösterilmeyen değerler, Duncan'ın çoklu değişim testine göre anlamlıdır. Her bir deneme 3 tekrarlı yapılmıştır ($P < 0.05$).



Şekil 4.19 Akhisar 97 ve İzmir Özbaş (*Nicotiana tabacum* L.) tütün çeşitlerine ait kontrol ve çeşitli konsantrasyonlarda *in vitro* tuz stresine maruz kalan fidelerin yapraklarındaki total protein miktarları (Ortalama değerler \pm Standart sapma)

*Her çeşit kendi içinde değerlendirilerek harflene yapılmıştır. Aynı harfler ile gösterilmeyen değerler, Duncan'ın çoklu değişim testine göre anlamlıdır. Her bir deneme 3 tekrarlı yapılmıştır ($P < 0.05$).

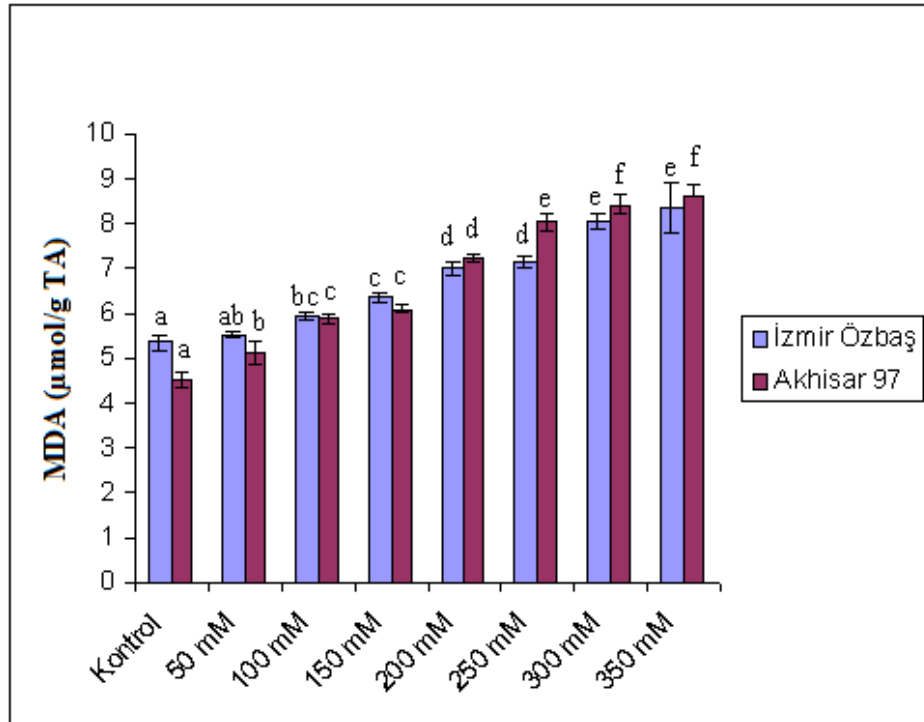
4.4.3. Lipid Peroksidasyon Analizi

Tuz stresinin tütün bitkileri üzerindeki zararlı etkilerini değerlendirmede en önemli kriter lipid peroksidasyon miktarıdır. Her iki çeşide ait malondialdehit oluşum miktarları Tablo 4.11'de ve Şekil 4.20'de verildi.

Tablo 4.11. Akhisar 97 ve İzmir Özbaş tütün çeşidine ait *in vitro* tuz stresine maruz kalan bitkilerin 14. gündeki lipid peroksidasyon miktarları ($\mu\text{mol/g TA}$)

NaCl	Akhisar 97	İzmir Özbaş
Kontrol	4,5067 \pm 0,1626 ^a	5,3467 \pm 0,1607 ^a
50 mM	5,1167 \pm 0,2450 ^b	5,5200 \pm 0,0872 ^{ab}
100 mM	5,9033 \pm 0,1115 ^c	5,9500 \pm 0,0917 ^{bc}
150 mM	6,1133 \pm 0,0737 ^c	6,3500 \pm 0,1200 ^c
200 mM	7,2300 \pm 0,1044 ^d	6,9900 \pm 0,1353 ^d
250 mM	8,0367 \pm 0,2003 ^e	7,1333 \pm 0,1358 ^d
300 mM	8,4267 \pm 0,2183 ^f	8,0433 \pm 0,1686 ^e
350 mM	8,5800 \pm 0,2773 ^f	8,3500 \pm 0,5730 ^e

*Her çeşit kendi içinde değerlendirilerek harfleme yapılmıştır. Aynı harfler ile gösterilmeyen değerler, Duncan'ın çoklu değişim testine göre anlamlıdır. Her bir deneme 3 tekrarlı yapılmıştır ($P < 0.05$).



Şekil 4.20 Akhisar 97 ve İzmir Özbaş (*Nicotiana tabacum* L.) tütün çeşitlerine ait kontrol ve çeşitli konsantrasyonlarda *in vitro* tuz stresine maruz kalan fidelerin yapraklarındaki lipid peroksidasyon miktarları (Ortalama değerler \pm Standart sapma)

*Her çeşit kendi içinde değerlendirilerek harfleme yapılmıştır. Aynı harfler ile gösterilmeyen değerler, Duncan'ın çoklu değişim testine göre anlamlıdır. Her bir deneme 3 tekrarlı yapılmıştır ($P < 0.05$).

Her iki tütün çeşidine ait fidelerin yapraklarında, uygulanan NaCl konsantrasyonunun artmasıyla malondialdehit miktarının arttığı görüldü. Bu artış da, meydana gelen zararlanmanın artışı gösterdi. *In vitro* lipid peroksidasyon analiz sonuçlarına göre kontrollerde, Akhisar 97 çeşidi NaCl konsantrasyonlarında İzmir Özbaş çeşidine oranla daha fazla MDA içermektedir. İzmir Özbaş çeşidinde MDA oluşum miktarı kontrol grubunda 5.35 iken, 200 mM NaCl uygulaması sonucunda, 6.99 olarak hesaplandı. Akhisar 97 çeşidinde bu miktar kontrol grubunda 4.51, 200 mM NaCl uygulamasında ise 7.23 olarak saptandı. 250, 300 ve 350 mM NaCl uygulaması ile İzmir Özbaş çeşidinde meydana gelen MDA miktarları sırasıyla 7.13, 8.04, 8.35; Akhisar 97 çeşidinde ise sırasıyla 8.02, 8.43, 8.58 olarak belirlendi.

In vitro tuz denemesinde elde edilen bu sonuçlara göre, aynı NaCl konsantrasyonunda, Akhisar 97 tütün çeşidinde meydana gelen zararlanma oranı, İzmir Özbaş'a göre daha yüksek olarak bulundu.

4.4.4. Antioksidant Enzim Aktiviteleri

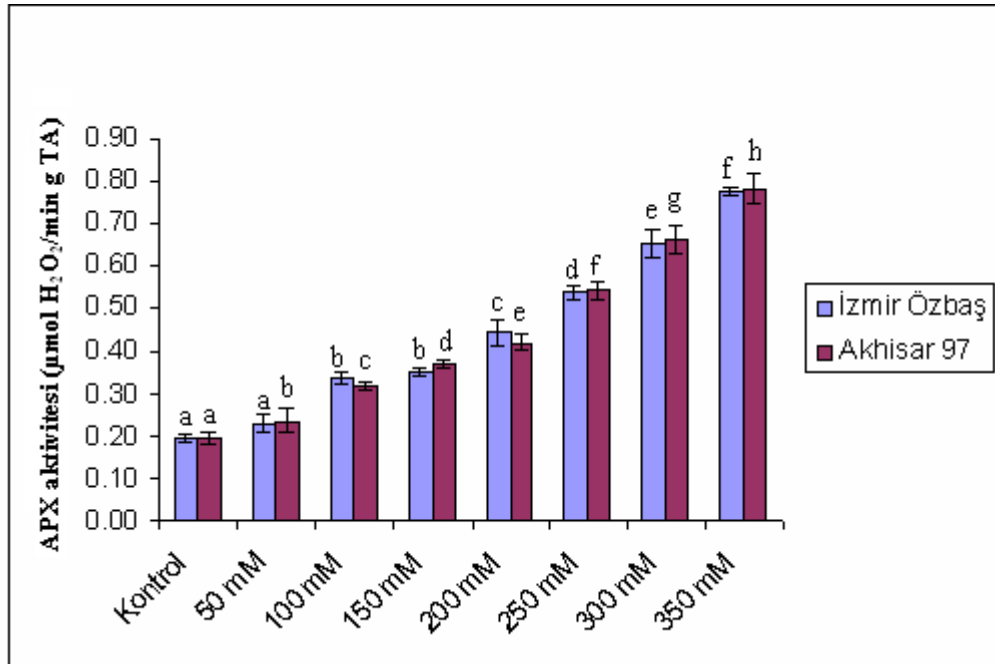
Akhisar 97 ve İzmir Özbaş (*Nicotiana tabacum* L.) tütün çeşitlerine ait fidelerin 14 gün süreyle *in vitro* tuz stresine maruz kaldıktan sonra yapraklarında ölçülen askorbat peroksidaz, guaiakol peroksidaz, glutatyon redüktaz, süperoksit dismutaz ve katalaz enzimlerinin aktivitelerine ait veriler sırasıyla Tablo 4.12, 13, 14, 15 ve 16'ta ve sırasıyla Şekil 4.21, 22, 23, 24 ve 25'te verildi.

Askorbat peroksidaz, guaiakol peroksidaz, glutatyon redüktaz ve süperoksit dismutaz enzim aktivite sonuçları incelendiğinde, her iki çeşide ait örneklerde tuz uygulamasının 14. gününde kontrol grubuna göre NaCl konsantrasyonunun artmasına paralel olarak, aktivitelerde istatistiksel açıdan anlamlı bir artış olduğu gözlemlendi ($P < 0.05$).

Tablo 4.12. Akhisar 97 ve İzmir Özbaş tütün çeşidine ait *in vitro* tuz stresine maruz kalan bitkilerin 14. gündeki askorbat peroksidaz aktiviteleri ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min mg TA}$)

NaCl	Akhisar 97	İzmir Özbaş
Kontrol	0,1939±0,0133 ^a	0,1948±0,0086 ^a
50 mM	0,2359±0,0279 ^b	0,2299±0,0201 ^a
100 mM	0,3173±0,0110 ^c	0,3358±0,0113 ^b
150 mM	0,3666±0,0090 ^d	0,3479±0,0114 ^b
200 mM	0,4193±0,0186 ^e	0,4432±0,0302 ^c
250 mM	0,5416±0,0200 ^f	0,5381±0,0154 ^d
300 mM	0,6613±0,0338 ^g	0,6527±0,0332 ^e
350 mM	0,7807±0,0353 ^h	0,7747±0,0113 ^f

*Her çeşit kendi içinde değerlendirilerek harfleme yapılmıştır. Aynı harfler ile gösterilmeyen değerler, Duncan'ın çoklu değişim testine göre anlamlıdır. Her bir deneme 3 tekrarlı yapılmıştır ($P < 0.05$).



Şekil 4.21 Akhisar 97 ve İzmir Özbaş (*Nicotiana tabacum* L.) tütün çeşitlerine ait kontrol ve çeşitli konsantrasyonlarda *in vitro* tuz stresine maruz kalan fidelerin yapraklarındaki askorbat peroksidaz enzim aktiviteleri (Ortalama değerler ± Standart sapma)

*Her çeşit kendi içinde değerlendirilerek harfleme yapılmıştır. Aynı harfler ile gösterilmeyen değerler, Duncan'ın çoklu değişim testine göre anlamlıdır. Her bir deneme 3 tekrarlı yapılmıştır ($P < 0.05$).

Her iki tütün çeşidinde NaCl konsantrasyonunun artışıyla, askorbat peroksidaz enzim aktivitelerinde de artış görüldü. Akhisar 97 kontrol grubunda $0.1939 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min g}$

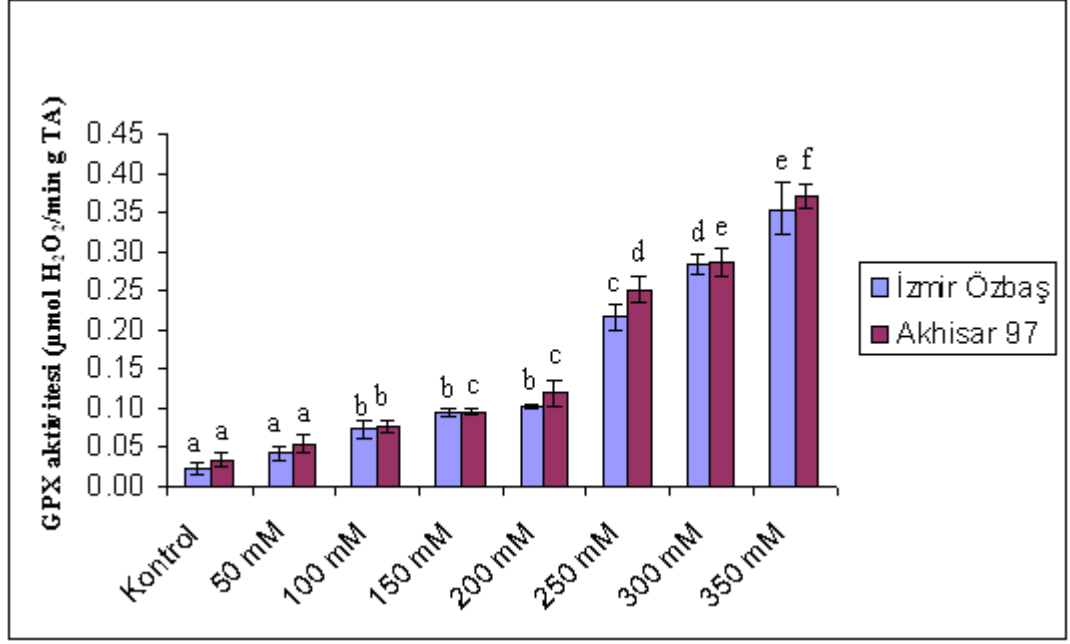
TA olan APX aktivitesi, 50 mM NaCl uygulamasında 0.2359'a, 350 mM NaCl uygulamasında da 0.7807'ye yükseldi. İzmir Özbaş çeşidinde kontrol grubunda 0.1948 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min mg TA}$ olan APX aktivitesi, 50 mM NaCl uygulaması sonrasında 0.2299'a yükseldi. 200 mM ve üzerindeki konsantrasyonlarda tuz stresine maruz kalan fidelerin yapraklarındaki askorbat peroksidaz aktivitelerindeki artışlar kontrole göre ve kendi aralarında istatistiksel açıdan anlamlıdır ($P<0.05$). 350 mM NaCl uygulamasıyla da APX aktivitesinin 0.7747 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min g TA}$ 'ya yükseldiği görüldü.

Akhisar 97 tütün çeşidine ait *in vitro* tuz stresine maruz bırakılan fidelerin askorbat peroksidaz enzim aktivitelerinin artan NaCl konsantrasyonuna paralel olarak arttığı gözlemlendi ($P<0.05$).

Tablo 4.13. Akhisar 97 ve İzmir Özbaş tütün çeşidine ait *in vitro* tuz stresine maruz kalan bitkilerin 14. gündeki guaiakol peroksidaz aktiviteleri ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min g TA}$)

NaCl	Akhisar 97	İzmir Özbaş
Kontrol	0,0333±0,0086 ^a	0,0210±0,0075 ^a
50 mM	0,0528±0,0110 ^a	0,0426±0,0093 ^a
100 mM	0,0751±0,0087 ^b	0,0725±0,0107 ^b
150 mM	0,0953±0,0050 ^c	0,0939±0,0058 ^b
200 mM	0,1192±0,0167 ^c	0,1015±0,0025 ^b
250 mM	0,2501±0,0157 ^d	0,2155±0,0152 ^c
300 mM	0,2849±0,0190 ^e	0,2824±0,0139 ^d
350 mM	0,3697±0,0150 ^f	0,3543±0,0349 ^e

*Her çeşit kendi içinde değerlendirilerek harfleme yapılmıştır. Aynı harfler ile gösterilmeyen değerler, Duncan'ın çoklu değişim testine göre anlamlıdır. Her bir deneme 3 tekrarlı yapılmıştır ($P< 0.05$).



Şekil 4.22 Akhisar 97 ve İzmir Özbaş (*Nicotiana tabacum* L.) tütün çeşitlerine ait kontrol ve çeşitli konsantrasyonlarda *in vitro* tuz stresine maruz kalan fidelerin yapraklarındaki guaiakol peroksidaz enzim aktivitesi (Ortalama değerler ± Standart sapma)

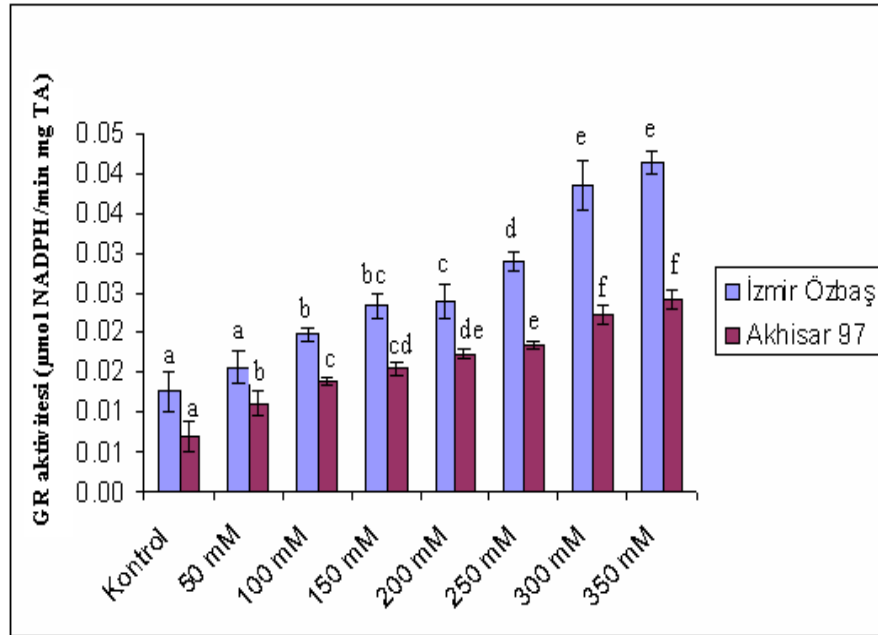
*Her çeşit kendi içinde değerlendirilerek harfleme yapılmıştır. Aynı harfler ile gösterilmeyen değerler, Duncan'ın çoklu değişim testine göre anlamlıdır. Her bir deneme 3 tekrarlı yapılmıştır ($P < 0.05$).

Akhisar 97 tütün çeşidinde maruz kalınan NaCl konsantrasyonuna bağlı olarak guaiakol peroksidaz enzim aktivitelerinde istatistiksel açıdan anlamlı bir artış gözlemlendi. İzmir Özbaş çeşidinde 100, 150 ve 200 mM NaCl uygulamaları, kontrole göre anlamlı bir aktivite artışı gösterdi. Peroksidaz enzim aktiviteleri, kontrolde 0.0210 iken 250 mM ve yüksek dozlarda sırasıyla 0.2155, 0.2844 ve 0.3543 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min g TA}$ 'ye yükseldi. Akhisar 97 tütün çeşidinde ise guaiakol peroksidaz enzim aktiviteleri kontrolde 0.0333 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min g TA}$ iken, yukarıda belirtilen konsantrasyonlardaki NaCl uygulamalarıyla sırasıyla 0.2501, 0,2849 ve 0.3697 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min g TA}$ olarak belirlendi. Guaiakol peroksidaz aktivitelerinde doz artışına bağlı olarak gözlenen bu artışlar, kontrole göre istatistiksel açıdan anlamlıdır ($P < 0.05$).

Tablo 4.14. Akhisar 97 ve İzmir Özbaş tütün çeşidine ait *in vitro* tuz stresine maruz kalan bitkilerin 14. gündeki glutasyon redüktaz aktiviteleri ($\mu\text{mol NADPH}/\text{min mg TA}$)

NaCl	Akhisar 97	İzmir Özbaş
Kontrol	0,0070 \pm 0,0019 ^a	0,0125 \pm 0,0026 ^a
50 mM	0,0110 \pm 0,0015 ^b	0,0156 \pm 0,0021 ^a
100 mM	0,0139 \pm 0,0005 ^c	0,0198 \pm 0,0009 ^b
150 mM	0,0156 \pm 0,0009 ^{cd}	0,0233 \pm 0,0016 ^{bc}
200 mM	0,0172 \pm 0,0007 ^{de}	0,0239 \pm 0,0022 ^c
250 mM	0,0184 \pm 0,0004 ^e	0,0289 \pm 0,0013 ^d
300 mM	0,0222 \pm 0,0012 ^f	0,0385 \pm 0,0030 ^e
350 mM	0,0241 \pm 0,0013 ^f	0,0413 \pm 0,0014 ^e

*Her çeşit kendi içinde değerlendirilerek harfleme yapılmıştır. Aynı harfler ile gösterilmeyen değerler, Duncan'ın çoklu değişim testine göre anlamlıdır. Her bir deneme 3 tekrarlı yapılmıştır ($P < 0.05$).



Şekil 4.23 Akhisar 97 ve İzmir Özbaş (*Nicotiana tabacum* L.) tütün çeşitlerine ait kontrol ve çeşitli konsantrasyonlarda *in vitro* tuz stresine maruz kalan fidelerin yapraklarındaki glutasyon redüktaz enzim aktiviteleri (Ortalama değerler \pm Standart sapma)

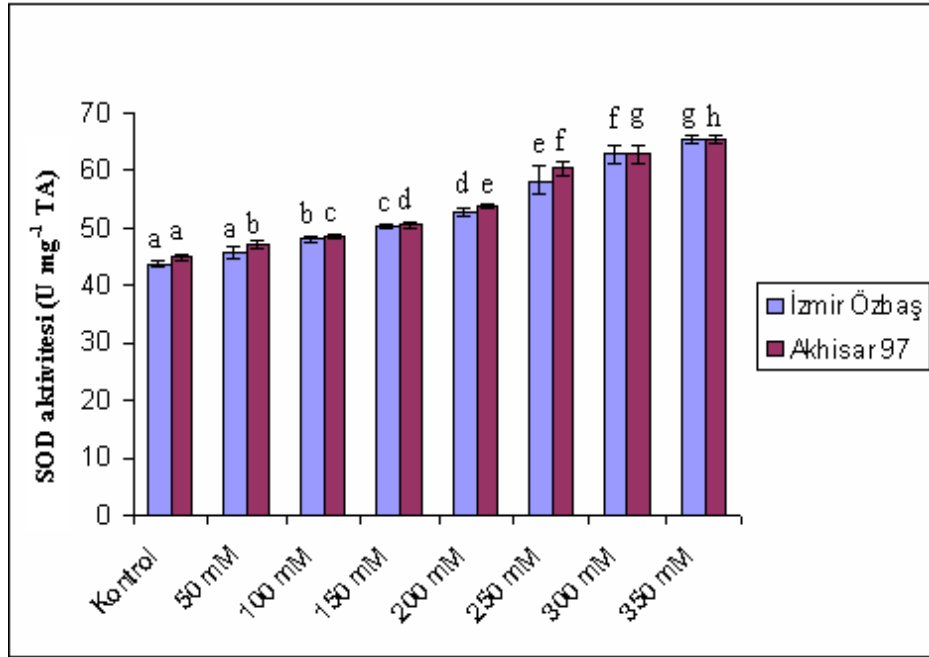
*Her çeşit kendi içinde değerlendirilerek harfleme yapılmıştır. Aynı harfler ile gösterilmeyen değerler, Duncan'ın çoklu değişim testine göre anlamlıdır. Her bir deneme 3 tekrarlı yapılmıştır ($P < 0.05$).

Akhisar 97 ve İzmir Özbaş tütün çeşitlerine ait glutatyon redüktaz enzim aktiviteleri sırasıyla 0.0070 ve 0.0125 $\mu\text{mol NADPH min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{TA}$ olarak bulundu. Glutatyon redüktaz enzim aktiviteleri, NaCl konsantrasyonuna bağlı olarak her iki çeşitte de bir artış gösterdi. Akhisar 97 çeşidine ait, 300 ve 350 mM NaCl tuz stresine maruz kalan fidelerde saptanan glutatyon redüktaz aktiviteleri sırasıyla 0.0222 ve 0.0241 $\mu\text{mol NADPH min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{TA}$ olarak bulundu. İzmir Özbaş tütün çeşitlerinde ise aynı tuz konsantrasyonlarında saptanan enzim aktiviteleri ise 0.0385 ve 0.0413 $\mu\text{mol NADPH min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{TA}$ olarak belirlendi.

Tablo 4.15. Akhisar 97 ve İzmir Özbaş tütün çeşidine ait *in vitro* tuz stresine maruz kalan bitkilerin 14. gündeki süperoksit dismutaz aktiviteleri ($\text{Umg}^{-1} \text{TA}$)

NaCl	Akhisar 97	İzmir Özbaş
Kontrol	45,0667±0,0529 ^a	43,8667±0,0469 ^a
50 mM	46,9333±0,0606 ^b	45,7667±0,0756 ^a
100 mM	48,4000±0,0435 ^c	47,9667±0,0404 ^b
150 mM	50,6667±0,0557 ^d	50,2333±0,0754 ^c
200 mM	53,7667±0,0351 ^e	52,9000±0,0500 ^d
250 mM	60,3667±0,7458 ^f	58,2666±0,4440 ^e
300 mM	62,8667±0,6346 ^g	62,8667±0,6000 ^f
350 mM	65,4333±0,7095 ^h	65,4333±0,7532 ^g

*Her çeşit kendi içinde değerlendirilerek harfleme yapılmıştır. Aynı harfler ile gösterilmeyen değerler, Duncan'ın çoklu değişim testine göre anlamlıdır. Her bir deneme 3 tekrarlı yapılmıştır ($P < 0.05$).



Şekil 4.24 Akhisar 97 ve İzmir Özbaş (*Nicotiana tabacum* L.) tütün çeşitlerine ait kontrol ve çeşitli konsantrasyonlarda *in vitro* tuz stresine maruz kalan fidelerin yapraklarındaki süperoksit dismutaz enzim aktiviteleri (Ortalama değerler \pm Standart sapma)

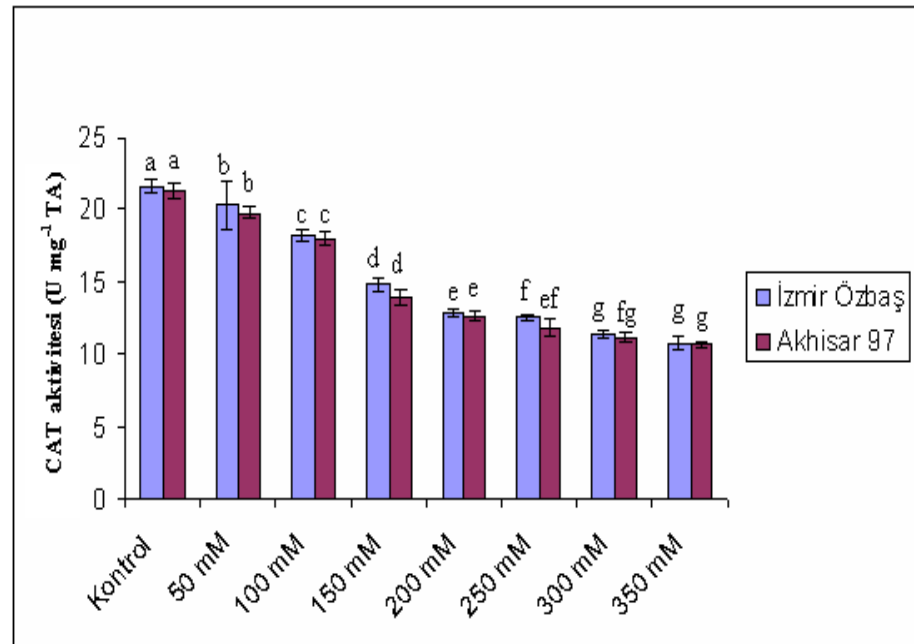
*Her çeşit kendi içinde değerlendirilerek harflene yapılmıştır. Aynı harfler ile gösterilmeyen değerler, Duncan'ın çoklu değişim testine göre anlamlıdır. Her bir deneme 3 tekrarlı yapılmıştır ($P < 0.05$).

Akhisar 97 ve İzmir Özbaş tütün çeşitlerinde maruz kalınan NaCl konsantrasyonlarına bağlı olarak SOD aktivitelerinde istatistiksel açıdan anlamlı artışlar kaydedildi ($P < 0.05$). Kontrol gruplarında ve 250 mM NaCl tuz stresine maruz kalan Akhisar 97 ve İzmir Özbaş tütün çeşitlerine ait fidelerin yapraklarında saptanan süperoksit dismutaz enzim aktiviteleri sırasıyla 45.06667, 43.86667, 60.36667 ve 58.2666 U mg⁻¹ TA olarak belirlendi. 300 ve 350 mM NaCl uygulamalarında her iki çeşitte de aynı miktarlarda enzim aktiviteleri saptanarak 62.86667 ve 65.43333 U mg⁻¹ TA olarak bulundu.

Tablo 4.16. Akhisar 97 ve İzmir Özbaş tütün çeşidine ait *in vitro* tuz stresine maruz kalan bitkilerin 14. gündeki katalaz aktiviteleri ($\text{U mg}^{-1} \text{TA}$)

NaCl	Akhisar 97	İzmir Özbaş
Kontrol	21,3333±0,5774 ^a	21,6667±0,4509 ^a
50 mM	19,8333±0,3215 ^b	20,3667±1,6658 ^b
100 mM	17,9667±0,4726 ^c	18,2667±0,4163 ^c
150 mM	14,0333±0,5886 ^d	14,8000±0,4359 ^d
200 mM	12,6367±0,3272 ^e	12,8667±0,3055 ^e
250 mM	11,8333±0,5508 ^{ef}	12,5667±0,2082 ^f
300 mM	11,2000±0,3606 ^{fg}	11,4333±0,3200 ^g
350 mM	10,6667±0,1528 ^g	10,8000±0,5000 ^g

*Her çeşit kendi içinde değerlendirilerek harfleme yapılmıştır. Aynı harfler ile gösterilmeyen değerler, Duncan'ın çoklu değişim testine göre anlamlıdır. Her bir deneme 3 tekrarlı yapılmıştır ($P < 0.05$).



Şekil 4.25 Akhisar 97 ve İzmir Özbaş (*Nicotiana tabacum* L.) tütün çeşitlerine ait kontrol ve çeşitli konsantrasyonlarda *in vitro* tuz stresine maruz kalan fidelerin yapraklarındaki katalaz enzim aktiviteleri (Ortalama değerler \pm Standart sapma)

*Her çeşit kendi içinde değerlendirilerek harfleme yapılmıştır. Aynı harfler ile gösterilmeyen değerler, Duncan'ın çoklu değişim testine göre anlamlıdır. Her bir deneme 3 tekrarlı yapılmıştır ($P < 0.05$).

Uygulanan NaCl tuz konsantrasyonları, her iki çeşitte de azalan katalaz aktivitesi ile sonuçlandı. Dozların artmasına paralel olarak, katalaz aktivitelerinde gözlenen azalışlar, istatistiksel açıdan anlamlı bulundu ($P<0.05$). Akhisar 97 çeşidinde, İzmir Özbaş çeşidine oranla daha hızlı bir azalış saptandı. Akhisar 97 ve İzmir Özbaş çeşitlerine ait kontrol bitkilerinde saptanan katalaz aktiviteleri sırasıyla 21.3333 ve 21.6667 U mg⁻¹ TA'dır. 250, 300 ve 350 mM NaCl tuz stresine maruz kalan Akhisar 97 çeşidine ait fidelerin katalaz enzim aktiviteleri sırasıyla 11.8333, 11.2000 ve 10.6667 U mg⁻¹ TA olarak bulunurken, İzmir Özbaş çeşidine ait fidelerde aynı tuz konsantrasyonlarında saptanan katalaz enzim aktiviteleri sırasıyla 12.5667, 11.4333 ve 10.8000 U mg⁻¹ TA olarak bulundu.

4.5. İN VİVO TUZ DOZ DENEMESİNDE BİYOKİMYASAL ANALİZLERDEN ELDE EDİLEN BULGULAR

4.5.1. Fotosentetik Pigmentler

Akhisar 97 ve İzmir Özbaş (*Nicotiana tabacum* L.) tütün çeşitlerine ait *in vivo* ortamda yetiştirilen fidelerine farklı konsantrasyonlarda uygulanan tuz stresinin 14. gününde hasat edilen yapraklara ait klorofil konsantrasyonları sırasıyla Tablo 4.17 ve 4.18'de verildi.

Tablo 4.17. Akhisar 97 tütün çeşidine ait *in vivo* ortamda tuz stresine maruz bırakılan bitkilerin 14. gündeki klorofil konsantrasyonları (mg/g TA)

Akhisar 97			
NaCl	Klorofil a	Klorofil b	Total Klorofil
Kontrol	33,37±1,13 ^a	9,34±1,20 ^a	42,71±0,56 ^a
50 mM	34,68±0,54 ^a	11,36±1,50 ^b	46,04±1,36 ^b
100 mM	36,54±2,34 ^b	14,35±0,87 ^c	50,89±0,79 ^c
150 mM	32,66±1,32 ^a	9,67±0,69 ^a	42,33±0,67 ^a
200 mM	24,34±0,98 ^c	7,13±1,45 ^d	31,47±1,01 ^d
250 mM	22,10±1,20 ^d	7,47±0,97 ^d	29,57±1,34 ^e
300 mM	17,39±0,89 ^e	6,25±0,65 ^e	23,64±0,64 ^f
350 mM	14,67±1,01 ^f	5,16±0,34 ^f	19,83±0,58 ^g

*Her çeşit kendi içinde değerlendirilerek harfleme yapılmıştır. Aynı harfler ile gösterilmeyen değerler, Duncan'ın çoklu değişim testine göre anlamlıdır. Her bir deneme 3 tekrarlı yapılmıştır ($P<0.05$).

Akhisar 97 çeşidine ait fidelerde, klorofil a ve total klorofil miktarlarında 50 ve 100 mM gibi düşük tuz konsantrasyonlarında bir artış gözlenirken, uygulanan tuz konsantrasyonunun azalmasıyla kontrole göre önemli azalışlar belirlendi. Klorofil b konsantrasyonları, 50, 100 ve 150 mM tuz uygulamalarında kontrole göre istatistiksel açıdan anlamlı bir artış gözlemlendi ($P<0.05$). 200 mM ve daha yüksek NaCl konsantrasyonlarında klorofil b konsantrasyonlarında saptanan azalışlar istatistiksel açıdan anlamlı olarak bulundu ($P<0.05$).

Tablo 4.18. İzmir Özbaş tütün çeşidine ait *in vivo* ortamda tuz stresine maruz bırakılan bitkilerin 14. gündeki klorofil konsantrasyonları (mg/g TA)

NaCl	İzmir Özbaş		
	Klorofil a	Klorofil b	Total Klorofil
Kontrol	27,38±1,05 ^a	14,35±1,02 ^a	41,73±0,67 ^a
50 mM	33,25±1,26 ^b	18,64±0,91 ^b	51,89±1,04 ^b
100 mM	36,88±0,97 ^c	17,69±0,38 ^c	54,57±0,86 ^c
150 mM	38,64±0,97 ^d	20,31±0,48 ^d	58,95±1,02 ^d
200 mM	35,21±0,85 ^e	12,37±0,67 ^e	47,58±0,95 ^e
250 mM	20,39±1,06 ^f	8,14±1,00 ^f	28,53±0,74 ^f
300 mM	17,32±0,67 ^g	6,39±1,03 ^g	23,71±0,68 ^g
350 mM	15,02±0,48 ^h	5,09±0,84 ^h	20,11±0,90 ^h

*Her çeşit kendi içinde değerlendirilerek harfleme yapılmıştır. Aynı harfler ile gösterilmeyen değerler, Duncan'ın çoklu değişim testine göre anlamlıdır. Her bir deneme 3 tekrarlı yapılmıştır ($P<0.05$).

İzmir Özbaş çeşidine ait *in vivo* tuz stresine maruz kalan fidelerin klorofil a ve total klorofil miktarlarında 200 mM NaCl tuz konsantrasyon uygulamasına kadar kontrole göre istatistiksel açıdan anlamlı bir artış görülürken, daha yüksek konsantrasyonlarda ise artan stres koşullarına paralel olarak bir azalış gözlemlendi. Meydana gelen bu azalışlar kendi aralarında ve kontrole göre anlamlı olarak bulundu ($P<0.05$). Klorofil b konsantrasyonları değerlendirildiğinde, 150 mM ve daha düşük tuz konsantrasyonlarında kontrole göre bir artış gözlenirken, maruz kalınan tuz stresinin artışına paralel olarak klorofil b miktarlarında istatistiksel açıdan anlamlı azalışlar kaydedildi ($P<0.05$).

Akhisar 97 ve İzmir Özbaş (*Nicotiana tabacum* L.) tütün fidelerinin *in vivo* tuz stresinin 14. gününde tayin edilen karotenoid miktarları Tablo 4.19'da verildi.

Tablo 4.19. Akhisar 97 tütün çeşidine ait *in vivo* tuz stresine maruz kalan bitkilerin 14. gündeki karotenoid konsantrasyonları (mg/g TA)

NaCl	Akhisar 97	İzmir Özbaş
Kontrol	15,06±0,84 ^a	10,92±0,27 ^a
50 mM	17,17±0,48 ^b	11,21±0,84 ^b
100 mM	18,48±0,64 ^c	12,83±0,76 ^c
150 mM	14,15±0,42 ^d	11,19±0,24 ^b
200 mM	11,20±0,64 ^e	10,61±0,65 ^a
250 mM	10,32±0,24 ^f	7,70±0,34 ^d
300 mM	8,33±0,45 ^g	5,11±0,19 ^e
350 mM	6,77±0,16 ^h	3,77±0,35 ^f

*Her çeşit kendi içinde değerlendirilerek harfleme yapılmıştır. Aynı harfler ile gösterilmeyen değerler, Duncan'ın çoklu değişim testine göre anlamlıdır. Her bir deneme 3 tekrarlı yapılmıştır (P<0.05).

In vivo koşullarda farklı konsantrasyonlarda NaCl stresine maruz bırakılan Akhisar 97 tütün çeşidine ait yapraklarda saptanan karotenoid konsantrasyonlarında, 50 ve 100 mM tuz uygulamalarında bir artış gözlenirken, 150 mM ve daha yüksek konsantrasyonlarda kontrole göre ve kendi aralarında istatistiksel açıdan anlamlı bir azalış gözlemlendi (P<0.05). İzmir Özbaş tütün çeşidinde ise 50, 100 ve 150 mM NaCl uygulamalarında kontrole göre bir artış gözlenirken, 200 mM ve daha yüksek tuz uygulamalarında karotenoid konsantrasyonlarında gözlenen azalışlar, kontrole göre istatistiksel açıdan anlamlı olarak bulundu (P<0.05).

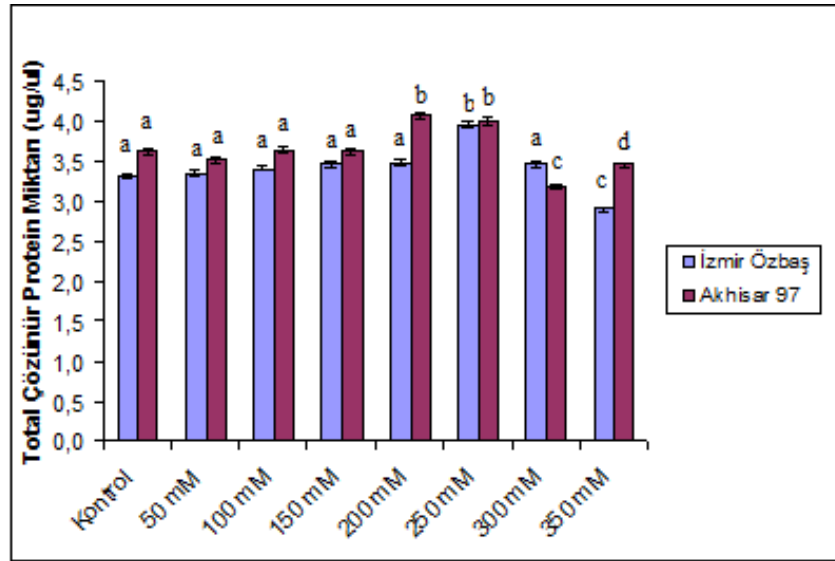
4.5.2. Total Protein Analizi

In vivo tuz stresi sonucunda bölüm 3.6.3.2'de belirtildiği şekilde saptanan total protein konsantrasyonları Tablo 4.20 ve Şekil 4.26'da verildi.

Tablo 4.20. Akhisar 97 ve İzmir Özbaş tütün çeşidine ait *in vivo* tuz stresine maruz kalan bitkilerin 14. gündeki total protein konsantrasyonları ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)

NaCl	Akhisar 97	İzmir Özbaş
Kontrol	3,6228 \pm 1,03 ^a	3,3229 \pm 0,62 ^a
50 mM	3,5208 \pm 1,10 ^a	3,3552 \pm 0,12 ^a
100 mM	3,6409 \pm 0,87 ^a	3,4171 \pm 0,50 ^a
150 mM	3,6248 \pm 0,33 ^a	3,4667 \pm 0,45 ^a
200 mM	4,0771 \pm 0,21 ^b	3,4879 \pm 0,27 ^a
250 mM	4,0143 \pm 0,42 ^b	3,9600 \pm 0,31 ^b
300 mM	3,1819 \pm 0,05 ^c	3,4663 \pm 0,18 ^a
350 mM	3,4595 \pm 0,37 ^d	2,9095 \pm 0,47 ^c

*Her çeşit kendi içinde değerlendirilerek harfleme yapılmıştır. Aynı harfler ile gösterilmeyen değerler, Duncan'ın çoklu değişim testine göre anlamlıdır. Her bir deneme 3 tekrarlı yapılmıştır ($P < 0.05$).



Şekil 4.26 Akhisar 97 ve İzmir Özbaş (*Nicotiana tabacum* L.) tütün çeşitlerine ait kontrol ve çeşitli konsantrasyonlarda *in vivo* tuz stresine maruz kalan fidelerin yapraklarındaki total çözümlü protein konsantrasyonları (Ortalama değerler \pm Standart sapma)

*Her çeşit kendi içinde değerlendirilerek harfleme yapılmıştır. Aynı harfler ile gösterilmeyen değerler, Duncan'ın çoklu değişim testine göre anlamlıdır. Her bir deneme 3 tekrarlı yapılmıştır ($P < 0.05$).

Akhisar 97 tütün çeşidinde 50, 100 ve 150 mM NaCl uygulamalarında, total protein miktarları kontrolde 3.6228 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ iken, belirtilen tuz konsantrasyonlarında sırasıyla 3.5208, 3.6409 ve 3.6248 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ olarak belirlendi. 200 ve 250 mM NaCl uygulamalarında gözlenen artış, kontrole ve daha düşük dozlara göre anlamlıdır ($P < 0.05$). 300 ve 350 mM tuz uygulamalarında, Akhisar 97 çeşidine ait fidelerde total

protein miktarları azaldı. İzmir Özbaş kontrol grubuna ait total çözümlü protein konsantrasyonları sırasıyla 3.1819 ve 3.4595 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 'dir. İzmir Özbaş tütün çeşidinde de 50, 100, 150 ve 200 mM NaCl uygulamaları total protein miktarlarında anlamlı bir değişiklik yapmazken, 250 mM muamelesinde total protein konsantrasyonu 3.9623 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 'ye yükseldi. 300 ve 350 mM NaCl uygulamalarında total protein miktarında kontrole göre meydana gelen azalmalar istatistiksel açıdan anlamlıdır ve ölçülen konsantrasyonlar 2.7680 ve 2.5281 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ olarak belirlendi ($P<0.05$).

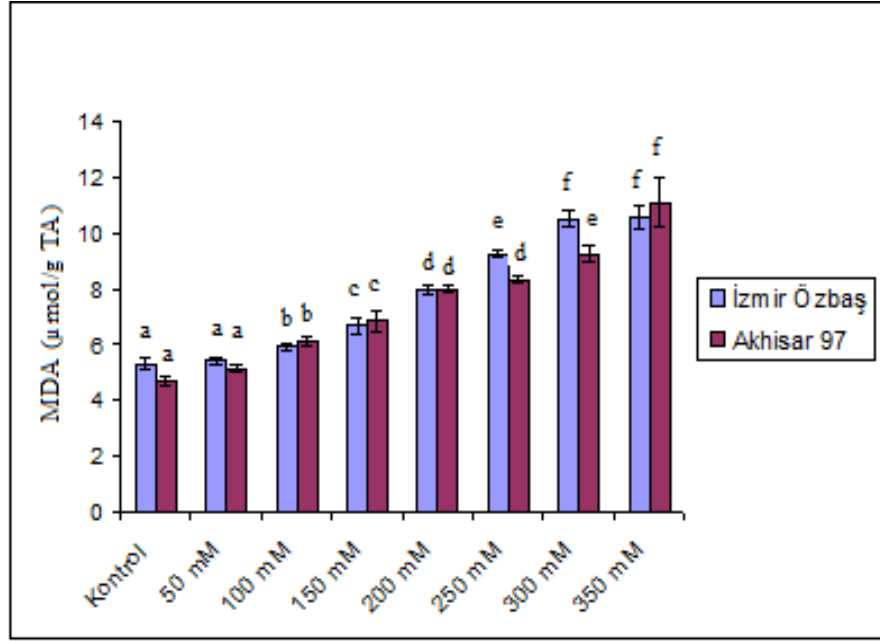
4.5.3. Lipid Peroksidasyon Analizi

Tuz stresinin bitki üzerindeki hasar derecesini gösteren en önemli veri olan malondialdehit oluşum miktarını gösteren lipid peroksidasyon verileri Tablo 4.21 ve Şekil 4.27'de verildi. *In vivo* ortamda NaCl'nin artan konsantrasyonlarına maruz kaldıkça, oluşan MDA konsantrasyonlarında bir artış her iki tütün çeşidinde de gözlemlendi.

Tablo 4.21 İzmir Özbaş ve Akhisar 97 tütün çeşidine ait *in vivo* tuz stresine maruz kalan bitkilerin 14. gündeki lipid peroksidasyon oranları ($\mu\text{mol}/\text{g TA}$)

NaCl	İzmir Özbaş	Akhisar 97
Kontrol	5,3567 \pm 0,2303 ^a	4,7200 \pm 0,1852 ^a
50 mM	5,4333 \pm 0,0666 ^a	5,1633 \pm 0,1656 ^a
100 mM	5,9467 \pm 0,1531 ^b	6,1567 \pm 0,1914 ^b
150 mM	6,7200 \pm 0,2921 ^c	6,8800 \pm 0,4122 ^c
200 mM	7,9773 \pm 0,1557 ^d	8,0167 \pm 0,1137 ^d
250 mM	9,3000 \pm 0,1212 ^e	8,3667 \pm 0,1582 ^d
300 mM	10,5200 \pm 0,3175 ^f	9,3067 \pm 0,3150 ^e
350 mM	10,5867 \pm 0,4187 ^f	11,1400 \pm 0,8653 ^f

*Her çeşit kendi içinde değerlendirilerek harfleme yapılmıştır. Aynı harfler ile gösterilmeyen değerler, Duncan'ın çoklu değişim testine göre anlamlıdır. Her bir deneme 3 tekrarlı yapılmıştır ($P<0.05$).



Şekil 4.27 Akhisar 97 ve İzmir Özbaşı (*Nicotiana tabacum* L.) tütün çeşitlerine ait kontrol ve çeşitli konsantrasyonlarda *in vivo* tuz stresine maruz kalan fidelerin yapraklarındaki lipid peroksidasyon miktarları (Ortalama değerler \pm Standart sapma)

*Her çeşit kendi içinde değerlendirilerek harfleme yapılmıştır. Aynı harfler ile gösterilmeyen değerler, Duncan'ın çoklu değişim testine göre anlamlıdır. Her bir deneme 3 tekrarlı yapılmıştır ($P < 0.05$).

Lipid peroksidasyon analiz sonuçları, Akhisar 97 çeşidinin daha hassas olduğunu gösterdi. İzmir Özbaşı çeşidinde MDA oluşum miktarı kontrol grubunda $5.36 \mu\text{mol/g TA}$ iken, 200 mM NaCl uygulaması sonucunda bu değer %48 oranında artış gösterdi. Akhisar 97 çeşidinde ise kontrol grubunda $4.72 \mu\text{mol/g TA}$ iken, aynı konsantrasyonda NaCl stresine maruz kalan bitkilerde %69.9 oranında artış görüldü. 250, 300 ve 350 mM NaCl uygulaması ile İzmir Özbaşı çeşidinde meydana gelen MDA artış oranları sırasıyla %73.5, %96.3, %97.6'dır. Akhisar 97 çeşidinde ise %77.3, %97.2, %136 oranında artış gözlemlendi.

4.5.4. Antioksidant Enzim Aktiviteleri

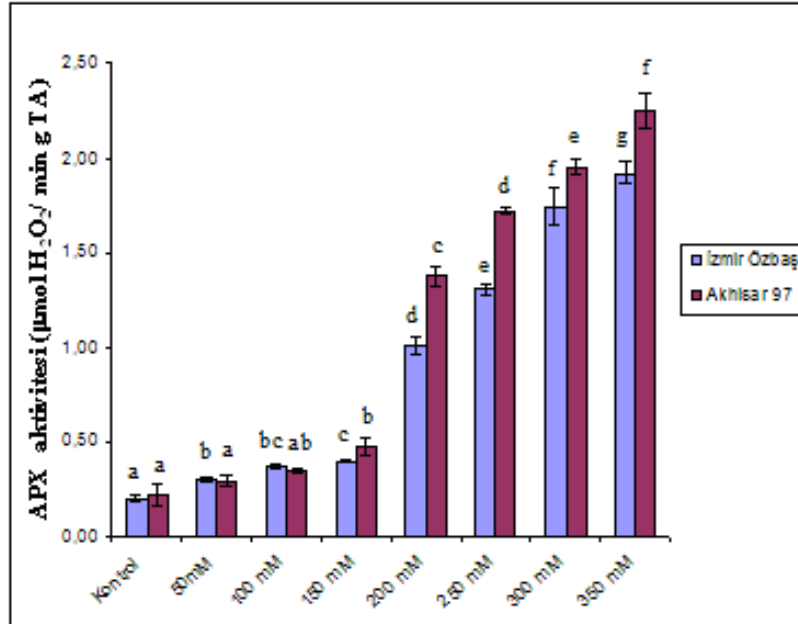
Akhisar 97 ve İzmir Özbaşı tütün çeşitlerine ait fidelerinin 14 gün süreyle perlit ortamında maruz kaldıkları NaCl stresine karşı antioksidan enzim sistemlerinin aktivite analizi sonuçları saptandı. Askorbat peroksidaz enzim aktivite verileri Tablo 4.22 ve Şekil 4.28'de, guaiakol peroksidaz enzim aktivitesindeki değişimleri Tablo 4.23 ve Şekil 4.29'da, glutatyon redüktaz enzim aktivite değişikliklerine ait veriler Tablo 4.24

ve Şekil 4.30'da, süperoksit dismutaz ve katalaz enzimlerinin aktivitelerindeki değişimleri gösteren veriler ise sırasıyla Tablo 4.25, 4.26 ve Şekil 4.31 ve 4.32'de verildi.

Tablo 4.22. Akhisar 97 ve İzmir Özbaş tütün çeşidine ait *in vivo* tuz stresine maruz kalan bitkilerin 14. gündeki askorbat peroksidaz enzim aktiviteleri ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min g TA}$)

NaCl	Akhisar 97	İzmir Özbaş
Kontrol	0,2242±0,0572 ^a	0,2008±0,0130 ^a
50 mM	0,2981±0,0250 ^a	0,2997±0,0114 ^b
100 mM	0,3501±0,0083 ^{ab}	0,3743±0,0097 ^{bc}
150 mM	0,4792±0,0431 ^b	0,4011±0,0105 ^c
200 mM	1,3830±0,0514 ^c	1,0063±0,0432 ^d
250 mM	1,7164±0,0178 ^d	1,3100±0,0308 ^e
300 mM	1,9490±0,0433 ^e	1,7427±0,0960 ^f
350 mM	2,2487±0,0944 ^f	1,9227±0,0560 ^g

*Her çeşit kendi içinde değerlendirilerek harfleme yapılmıştır. Aynı harfler ile gösterilmeyen değerler, Duncan'ın çoklu değişim testine göre anlamlıdır. Her bir deneme 3 tekrarlı yapılmıştır ($P < 0.05$).



Şekil 4.28 Akhisar 97 ve İzmir Özbaş (*Nicotiana tabacum* L.) tütün çeşitlerine ait kontrol ve çeşitli konsantrasyonlarda *in vivo* tuz stresine maruz kalan fidelerin yapraklarındaki askorbat peroksidaz enzim aktiviteleri (Ortalama değerler ± Standart sapma)

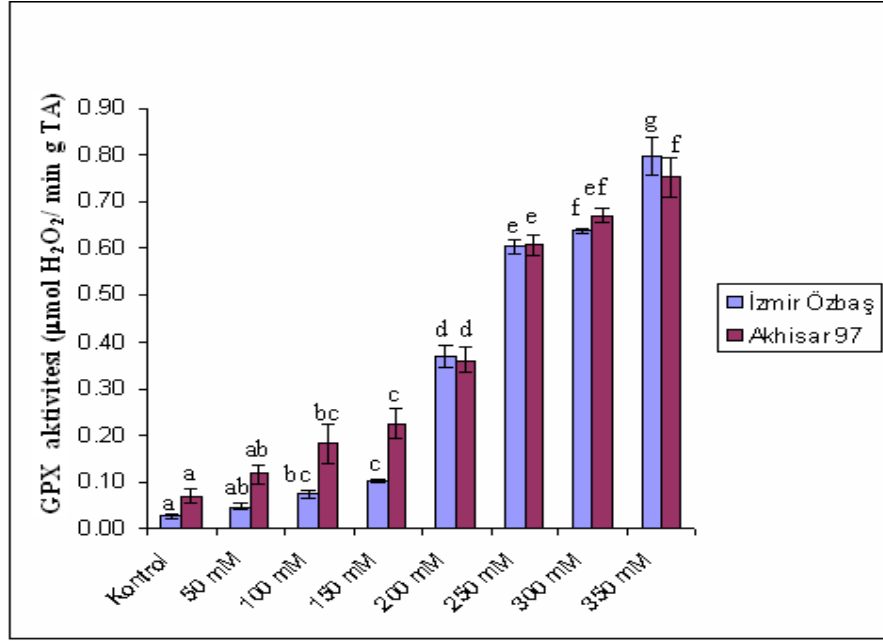
*Her çeşit kendi içinde değerlendirilerek harfleme yapılmıştır. Aynı harfler ile gösterilmeyen değerler, Duncan'ın çoklu değişim testine göre anlamlıdır. Her bir deneme 3 tekrarlı yapılmıştır ($P < 0.05$).

Her iki tütün çeşidinde de uygulanan NaCl konsantrasyonlarına paralel olarak askorbat peroksidaz enzim aktivitelerinde istatistiksel açıdan anlamlı artışlar gözlemlendi. Akhisar 97 tütün çeşidine ait fidelerin kontrol gruplarında saptanan APX aktivitesi 0.2242 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min mg TA}$ 'dır. Bu çeşitte 300 ve 350 mM NaCl uygulamalarının 14. gününde saptanan askorbat peroksidaz aktiviteleri sırasıyla 1.9490 ve 2.2487 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min mg TA}$ olarak bulundu. İzmir Özbaş çeşidinde kontrol grubundaki enzim aktivitesi 0.2008 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min mg TA}$ iken, aynı tuz konsantrasyonlarında saptanan askorbat peroksidaz aktivitelerinin sırasıyla 1.7427 ve 1.9227'e arttığı görüldü.

Tablo 4.23. Akhisar 97 ve İzmir Özbaş tütün çeşidine ait *in vivo* tuz stresine maruz kalan bitkilerin 14. gündeki guaiakol peroksidaz enzim aktiviteleri ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min g TA}$)

NaCl	Akhisar 97	İzmir Özbaş
Kontrol	0,0680±0,0159 ^a	0,0281±0,0051 ^a
50 mM	0,1166±0,0196 ^{ab}	0,0466±0,0054 ^{ab}
100 mM	0,1808±0,0436 ^{bc}	0,0737±0,0098 ^{bc}
150 mM	0,2243±0,0306 ^c	0,1023±0,0040 ^c
200 mM	0,3602±0,0267 ^d	0,3685±0,0229 ^d
250 mM	0,6067±0,0240 ^e	0,6034±0,0164 ^e
300 mM	0,6705±0,0176 ^{ef}	0,6386±0,0068 ^f
350 mM	0,7524±0,0398 ^f	0,7984±0,0414 ^g

*Her çeşit kendi içinde değerlendirilerek harfleme yapılmıştır. Aynı harfler ile gösterilmeyen değerler, Duncan'ın çoklu değişim testine göre anlamlıdır. Her bir deneme 3 tekrarlı yapılmıştır ($P < 0.05$).



Şekil 4.29 Akhisar 97 ve İzmir Özbaşı (*Nicotiana tabacum* L.) tütün çeşitlerine ait kontrol ve çeşitli konsantrasyonlarda *in vivo* tuz stresine maruz kalan fidelerin yapraklarındaki guaiakol peroksidaz enzim aktiviteleri (Ortalama değerler ± Standart sapma)

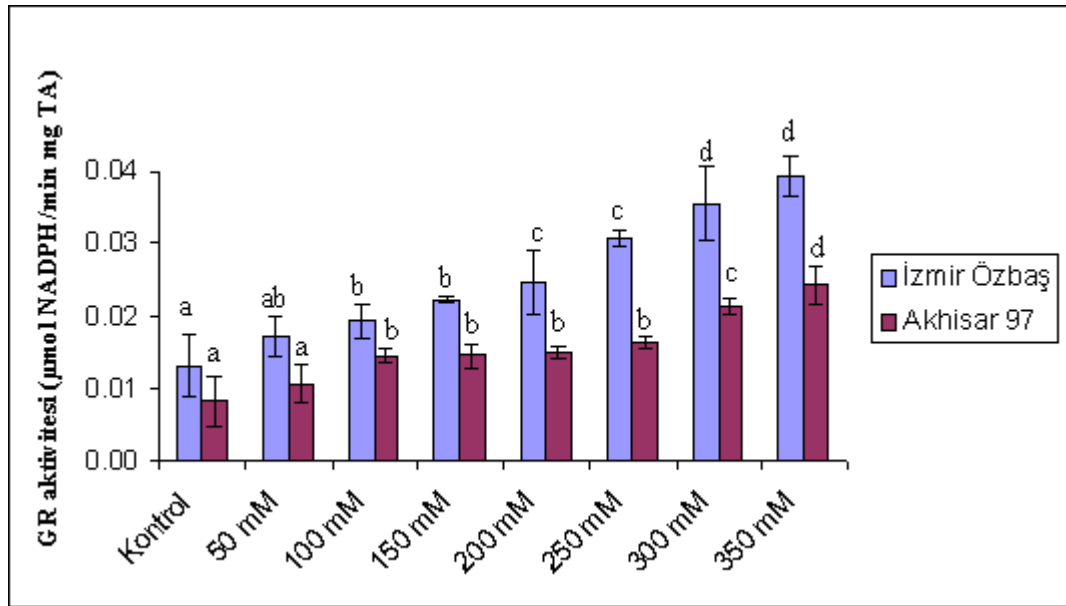
*Her çeşit kendi içinde değerlendirilerek harfleme yapılmıştır. Aynı harfler ile gösterilmeyen değerler, Duncan'ın çoklu değişim testine göre anlamlıdır. Her bir deneme 3 tekrarlı yapılmıştır ($P < 0.05$).

İzmir Özbaşı ve Akhisar 97 tütün kontrol bitkilerine ait guaiakol peroksidaz enzim aktiviteleri sırasıyla 0.0680 ve 0.0281 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min g TA}$ olarak bulundu. İzmir Özbaşı ve Akhisar 97 çeşitlerine ait tütün fidelerinden düşük dozlarda tuz stresine maruz kalanlarda guaiakol peroksidaz enzim aktivitelerindeki artışlar kontrole göre anlamlı bulunmadı. Konsantrasyon artışına paralel olarak, enzim aktivitelerindeki artışlar istatistiksel açıdan anlamlı bulundu ($P < 0.05$). 300 ve 350 mM NaCl konsantrasyonlarında *in vivo* tuz stresine maruz kalan İzmir Özbaşı ve Akhisar 97 tütün fidelerine ait guaiakol peroksidaz aktiviteleri sırasıyla 0.6705, 0.7524 ve 0.6386, 0.7984 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min g TA}$ olarak belirlendi.

Tablo 4.24. Akhisar 97 ve İzmir Özbaş tütün çeşidine ait *in vivo* tuz stresine maruz kalan bitkilerin 14. gündeki glutasyon redüktaz enzim aktiviteleri ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min mg TA}$)

NaCl	Akhisar 97	İzmir Özbaş
Kontrol	0,0083±0,0035 ^a	0,0131±0,0043 ^a
50 mM	0,0105±0,0026 ^a	0,0171±0,0027 ^{ab}
100 mM	0,0144±0,0010 ^b	0,0193±0,0023 ^b
150 mM	0,0146±0,0016 ^b	0,0223±0,0005 ^b
200 mM	0,0149±0,0008 ^b	0,0246±0,0045 ^c
250 mM	0,0163±0,0009 ^b	0,0307±0,0011 ^c
300 mM	0,0214±0,0012 ^c	0,0354±0,0052 ^d
350 mM	0,0243±0,0026 ^d	0,0394±0,0028 ^d

*Her çeşit kendi içinde değerlendirilerek harfleme yapılmıştır. Aynı harfler ile gösterilmeyen değerler, Duncan'ın çoklu değişim testine göre anlamlıdır. Her bir deneme 3 tekrarlı yapılmıştır ($P < 0.05$).



Şekil 4.30 Akhisar 97 ve İzmir Özbaş (*Nicotiana tabacum* L.) tütün çeşitlerine ait kontrol ve çeşitli konsantrasyonlarda *in vivo* tuz stresine maruz kalan fidelerin yapraklarındaki glutasyon redüktaz enzim aktiviteleri

*Her çeşit kendi içinde değerlendirilerek harfleme yapılmıştır. Aynı harfler ile gösterilmeyen değerler, Duncan'ın çoklu değişim testine göre anlamlıdır. Her bir deneme 3 tekrarlı yapılmıştır ($P < 0.05$).

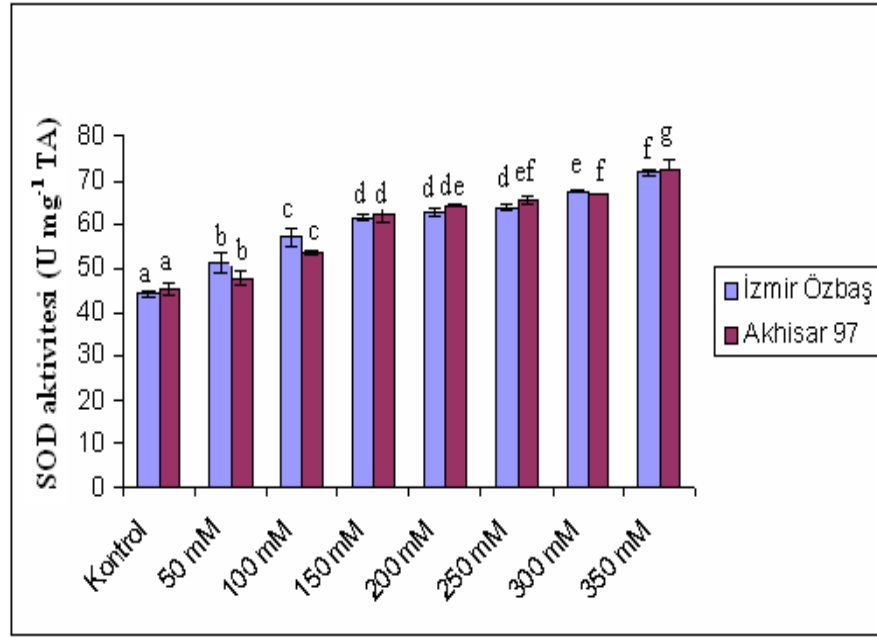
Her iki çeşitte de doz artışına bağlı olarak glutasyon redüktaz enzim aktivitelerinde istatistiksel açıdan anlamlı bir artış gözlemlendi ($P < 0.05$). Akhisar 97 kontrol grubunda GR

aktivitesi, İzmir Özbaş çeşidine göre daha düşük değerlere sahiptir. Bu değerler iki çeşit için sırasıyla 0.0083 ve 0.0131 $\mu\text{mol NADPH}/\text{min mg TA}$ 'dır. NaCl uygulamasıyla İzmir Özbaş çeşidinde GR aktivitesinde gözlenen artışlar, Akhisar 97 çeşidine göre daha fazladır. 350 mM NaCl uygulamasında Akhisar 97'de GR aktivitesi, 0.0243 iken, İzmir Özbaş varyetesinde 0.0394 $\mu\text{mol NADPH}/\text{min mg TA}$ olarak bulundu.

Tablo 4.25. Akhisar 97 ve İzmir Özbaş tütün çeşidine ait *in vivo* tuz stresine maruz kalan bitkilerin 14. gündeki süperoksit dismutaz enzim aktiviteleri ($\text{U mg}^{-1} \text{TA}$)

NaCl	Akhisar 97	İzmir Özbaş
Kontrol	44,9667 \pm 1,4295 ^a	44,0000 \pm 0,7000 ^a
50 mM	47,6333 \pm 1,6442 ^b	51,1667 \pm 2,1362 ^b
100 mM	53,2333 \pm 0,5686 ^c	57,0000 \pm 2,0952 ^c
150 mM	62,1667 \pm 1,4295 ^d	61,5667 \pm 0,4726 ^d
200 mM	64,1333 \pm 0,2082 ^{de}	62,5000 \pm 0,9849 ^d
250 mM	65,4333 \pm 1,0263 ^{ef}	63,7333 \pm 0,5859 ^d
300 mM	66,9000 \pm 0,2000 ^f	67,6000 \pm 0,3600 ^e
350 mM	72,4400 \pm 1,9876 ^g	71,7333 \pm 0,7095 ^f

*Her çeşit kendi içinde değerlendirilerek harfleme yapılmıştır. Aynı harfler ile gösterilmeyen değerler, Duncan'ın çoklu değişim testine göre anlamlıdır. Her bir deneme 3 tekrarlı yapılmıştır ($P < 0.05$).



Şekil 4.31 Akhisar 97 ve İzmir Özbaşı (*Nicotiana tabacum* L.) tütün çeşitlerine ait kontrol ve çeşitli konsantrasyonlarda *in vivo* tuz stresine maruz kalan fidelerin yapraklarındaki süperoksit dismutaz enzim aktiviteleri (Ortalama değerler \pm Standart sapma)

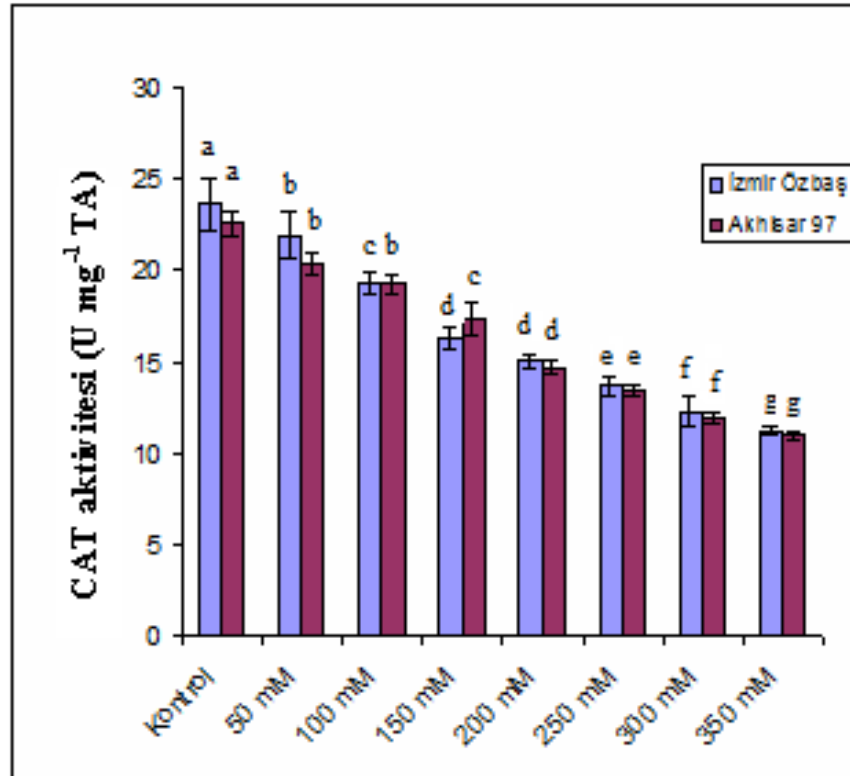
*Her çeşit kendi içinde değerlendirilerek harflene yapılmıştır. Aynı harfler ile gösterilmeyen değerler, Duncan'ın çoklu değişim testine göre anlamlıdır. Her bir deneme 3 tekrarlı yapılmıştır ($P < 0.05$).

Akhisar 97 tütün çeşidi kontrol bitkisine ait süperoksit dismutaz aktivitesi 44.9667 iken, İzmir Özbaşı tütün çeşidine ait SOD enzim aktivitesi 44.0000 U mg⁻¹ TA olarak bulundu. SOD aktiviteleri, maruz kalınan tuz konsantrasyonunun artışına bağlı olarak, her iki tütün çeşidinde de gözlenen artışlar istatistiksel açıdan anlamlıdır ($P < 0.05$). 350 mM tuz konsantrasyonunda stres sonucunda Akhisar 97 tütün çeşidine ait fidelerde saptanan SOD aktivitesi 72.4400 U mg⁻¹ TA iken, Akhisar 97 çeşidinde aynı tuz konsantrasyonunda saptanan SOD enzim aktivitesi 71.7333 U mg⁻¹ TA olarak bulundu.

Tablo 4.26. Akhisar 97 ve İzmir Özbaş tütün çeşidine ait *in vivo* tuz stresine maruz kalan bitkilerin 14. gündeki katalaz enzim aktiviteleri (U mg⁻¹ TA)

NaCl	Akhisar 97	İzmir Özbaş
Kontrol	22,6000±0,7000 ^a	23,6667±1,4572 ^a
50 mM	20,3333±0,5774 ^b	21,9667±1,2097 ^b
100 mM	19,3333±0,5033 ^b	19,3667±0,5859 ^c
150 mM	17,4333±0,8505 ^c	16,3333±0,5508 ^d
200 mM	14,7667±0,3512 ^d	15,0333±0,3789 ^d
250 mM	13,4667±0,3055 ^e	13,6667±0,5033 ^e
300 mM	11,9667±0,3055 ^f	12,2667±0,8300 ^f
350 mM	10,9667±0,2517 ^g	11,1667±0,2309 ^g

*Her çeşit kendi içinde değerlendirilerek harfleme yapılmıştır. Aynı harfler ile gösterilmeyen değerler, Duncan'ın çoklu değişim testine göre anlamlıdır. Her bir deneme 3 tekrarlı yapılmıştır (P< 0.05).



Şekil 4.32 Akhisar 97 ve İzmir Özbaş (*Nicotiana tabacum* L.) tütün çeşitlerine ait kontrol ve çeşitli konsantrasyonlarda *in vivo* tuz stresine maruz kalan fidelerin yapraklarındaki katalaz enzim aktiviteleri (Ortalama değerler ± Standart sapma)

*Her çeşit kendi içinde değerlendirilerek harfleme yapılmıştır. Aynı harfler ile gösterilmeyen değerler, Duncan'ın çoklu değişim testine göre anlamlıdır. Her bir deneme 3 tekrarlı yapılmıştır (P< 0.05).

Akhisar 97 ve İzmir Özbaş kontrol bitkilerinde saptanan katalaz aktiviteleri sırasıyla 22.6000 ve 23.6667 U mg^{-1} TA'dır. Tütün bitkilerinin maruz kaldıkları tuz konsantrasyonunun artışına bağlı olarak katalaz enzim aktiviteleri, her iki tütün çeşidinde de bir azalma gösterdi. 350 mM NaCl tuz uygulamasında İzmir Özbaş çeşidinde saptanan enzim aktivitesi 10.9667 iken, Akhisar 97 çeşidinde 11.1667 U mg^{-1} TA olarak bulundu.

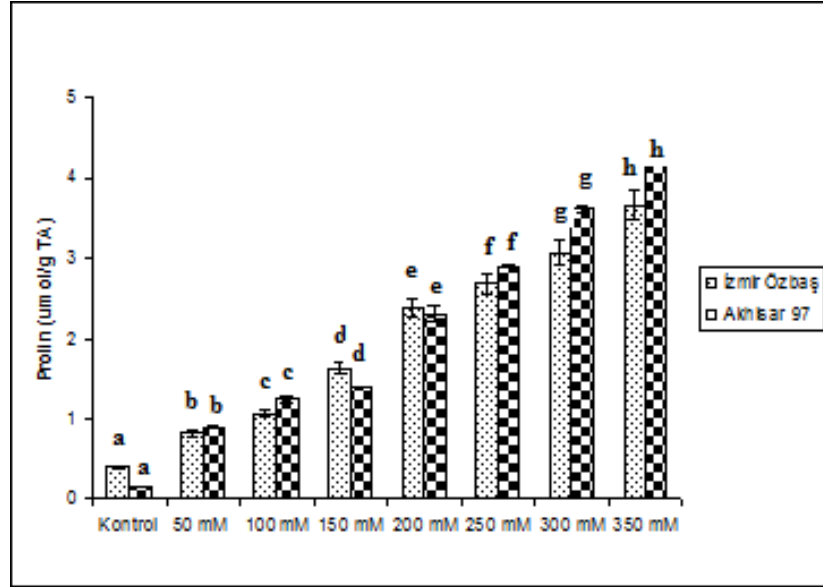
4.5.5. Prolin Konsantrasyonu

In vitro ve *in vivo* koşullarda tuz stresine maruz bırakılan fidelerin yapraklarında bölüm 3.7.3.8.2.'ye göre prolin konsantrasyon ölçümü yapıldı. Elde edilen ölçüm sonuçları sırasıyla Tablo 4.27 ve 4.28 Şekil 4.33 ve 4.34'te verildi.

Tablo 4.27. Akhisar 97 ve İzmir Özbaş tütün çeşidinde ait *in vitro* tuz stresine maruz kalan bitkilerin 14. gündeki prolin miktarları ($\mu\text{mol/g}$ TA)

NaCl	Akhisar 97	İzmir Özbaş
Kontrol	0,15±0,038 ^a	0,39±0,010 ^a
50 mM	0,90±0,007 ^b	0,83±0,048 ^b
100 mM	1,24±0,023 ^c	1,06±0,013 ^c
150 mM	1,39±0,008 ^d	1,64±0,010 ^d
200 mM	2,31±0,108 ^e	2,38±0,016 ^e
250 mM	2,91±0,023 ^f	2,69±0,120 ^f
300 mM	3,62±0,036 ^g	3,08±0,028 ^g
350 mM	4,26±0,006 ^h	3,67±0,016 ^h

*Her çeşit kendi içinde değerlendirilerek harfleme yapılmıştır. Aynı harfler ile gösterilmeyen değerler, Duncan'ın çoklu değişim testine göre anlamlıdır. Her bir deneme 3 tekrarlı yapılmıştır ($P < 0.05$).



Şekil 4.33 Akhisar 97 ve İzmir Özbaş (*Nicotiana tabacum* L.) tütün çeşitlerine ait kontrol ve çeşitli konsantrasyonlarda *in vitro* tuz stresine maruz kalan fidelerin yapraklarındaki prolin konsantrasyonları

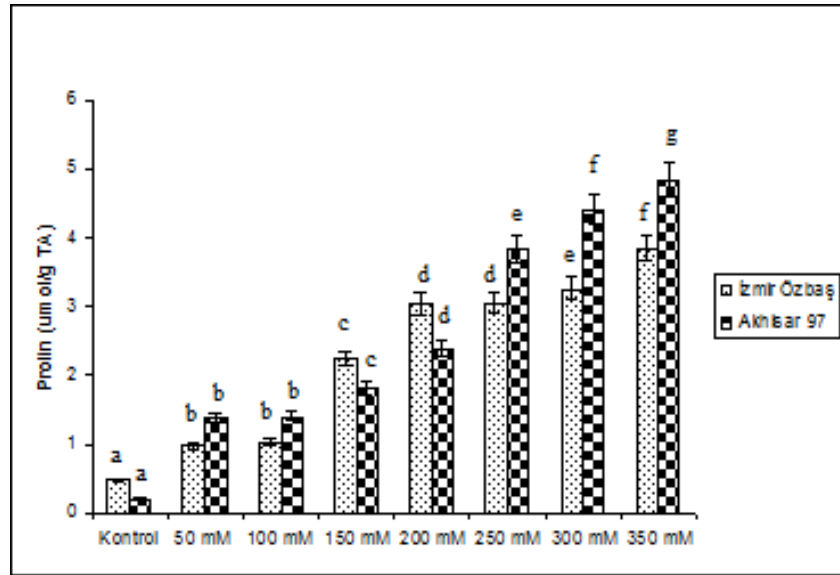
*Her çeşit kendi içinde değerlendirilerek harfleme yapılmıştır. Aynı harfler ile gösterilmeyen değerler, Duncan'ın çoklu değişim testine göre anlamlıdır. Her bir deneme 3 tekrarlı yapılmıştır ($P < 0.05$).

Buna göre, Akhisar 97 ve İzmir Özbaş tütün çeşitlerinde, kontrol ile tuz muamelelerine ait prolin konsantrasyonları belirlenmiş olup, prolin konsantrasyonlarının *in vitro* koşullarda maruz kalınan tuz konsantrasyonlarına paralel bir artış gösterdikleri ve meydana gelen artışların istatistiksel açıdan anlamlı olduğu bulundu ($P < 0.05$). Prolin konsantrasyonlarının artan tuz konsantrasyonlarına paralel olarak, Akhisar 97 çeşidinde, İzmir Özbaş çeşidine oranla daha fazla artış olduğu görüldü. Akhisar 97 ve İzmir Özbaş çeşitlerinin kontrol gruplarında ölçülen prolin konsantrasyonları sırasıyla 0.15 ve 0.39 $\mu\text{mol/g TA}$ 'dır. 300 ve 350 mM NaCl uygulamalarında İzmir Özbaş çeşidinde saptanan prolin miktarı 3.08 ve 3.67 $\mu\text{mol/g TA}$ iken, Akhisar 97 çeşidinde sırasıyla 3.63 ve 4.26 $\mu\text{mol/g TA}$ olarak belirlendi.

Tablo 4.28. Akhisar 97 ve İzmir Özbaş tütün çeşidine ait *in vivo* tuz stresine maruz kalan bitkilerin 14. gündeki prolin miktarları ($\mu\text{mol/g TA}$)

NaCl	Akhisar 97	İzmir Özbaş
Kontrol	0,21 \pm 0,002 ^a	0,47 \pm 0,006 ^a
50 mM	1,38 \pm 0,006 ^b	0,96 \pm 0,004 ^b
100 mM	1,40 \pm 0,004 ^b	1,01 \pm 0,005 ^b
150 mM	1,81 \pm 0,004 ^c	2,24 \pm 0,006 ^c
200 mM	2,39 \pm 0,005 ^d	3,04 \pm 0,005 ^d
250 mM	3,82 \pm 0,012 ^e	3,05 \pm 0,005 ^d
300 mM	4,42 \pm 0,004 ^f	3,25 \pm 0,007 ^e
350 mM	4,83 \pm 0,076 ^g	3,85 \pm 0,004 ^f

*Her çeşit kendi içinde değerlendirilerek harfleme yapılmıştır. Aynı harfler ile gösterilmeyen değerler, Duncan'ın çoklu değişim testine göre anlamlıdır. Her bir deneme 3 tekrarlı yapılmıştır ($P < 0.05$).



Şekil 4.34 Akhisar 97 ve İzmir Özbaş (*Nicotiana tabacum L.*) tütün çeşitlerine ait kontrol ve çeşitli konsantrasyonlarda *in vivo* tuz stresine maruz kalan fidelerin yapraklarındaki prolin konsantrasyonları

*Her çeşit kendi içinde değerlendirilerek harfleme yapılmıştır. Aynı harfler ile gösterilmeyen değerler, Duncan'ın çoklu değişim testine göre anlamlıdır. Her bir deneme 3 tekrarlı yapılmıştır ($P < 0.05$).

Perlit ortamında yetiştirilerek tuz stresine maruz bırakılan her iki tütün çeşidinde de prolin miktarlarında doz artışına paralel olarak bir artış gözlemlendi. Akhisar 97 ve İzmir Özbaş kontrol gruplarında ölçülen prolin konsantrasyonları 0.21 ve 0.47 $\mu\text{mol/g TA}$ 'dır. 150 ve 200 mM NaCl tuz uygulamalarında belirlenen prolin konsantrasyonlarının İzmir

Özbaş çeşidinde Akhisar 97 çeşidine göre daha yüksek olduğu görüldü. Ancak *in vivo* ortamda tütün fidelerinin maruz bırakıldıkları 250, 300 ve 350 mM NaCl uygulamalarının sonucu olarak prolin konsantrasyonlarında kontrole göre ve kendi aralarında istatistiksel açıdan anlamlı bir artış olduğu belirlendi ($P<0.05$). Yukarıda belirtilen konsantrasyonlarda ölçülen prolin miktarları Akhisar 97 çeşidinde de 3.82, 4.42 ve 4.83 $\mu\text{mol/g TA}$ iken, İzmir Özbaş çeşidinde de 3.05, 3.25 ve 3.85 $\mu\text{mol/g TA}$ olarak bulundu. 350 mM NaCl uygulamasında, Akhisar 97 çeşidinde prolin miktarı 4.83 $\mu\text{mol/g TA}$ iken, İzmir Özbaş çeşidinde 3.85 $\mu\text{mol/g TA}$ olarak bulundu.

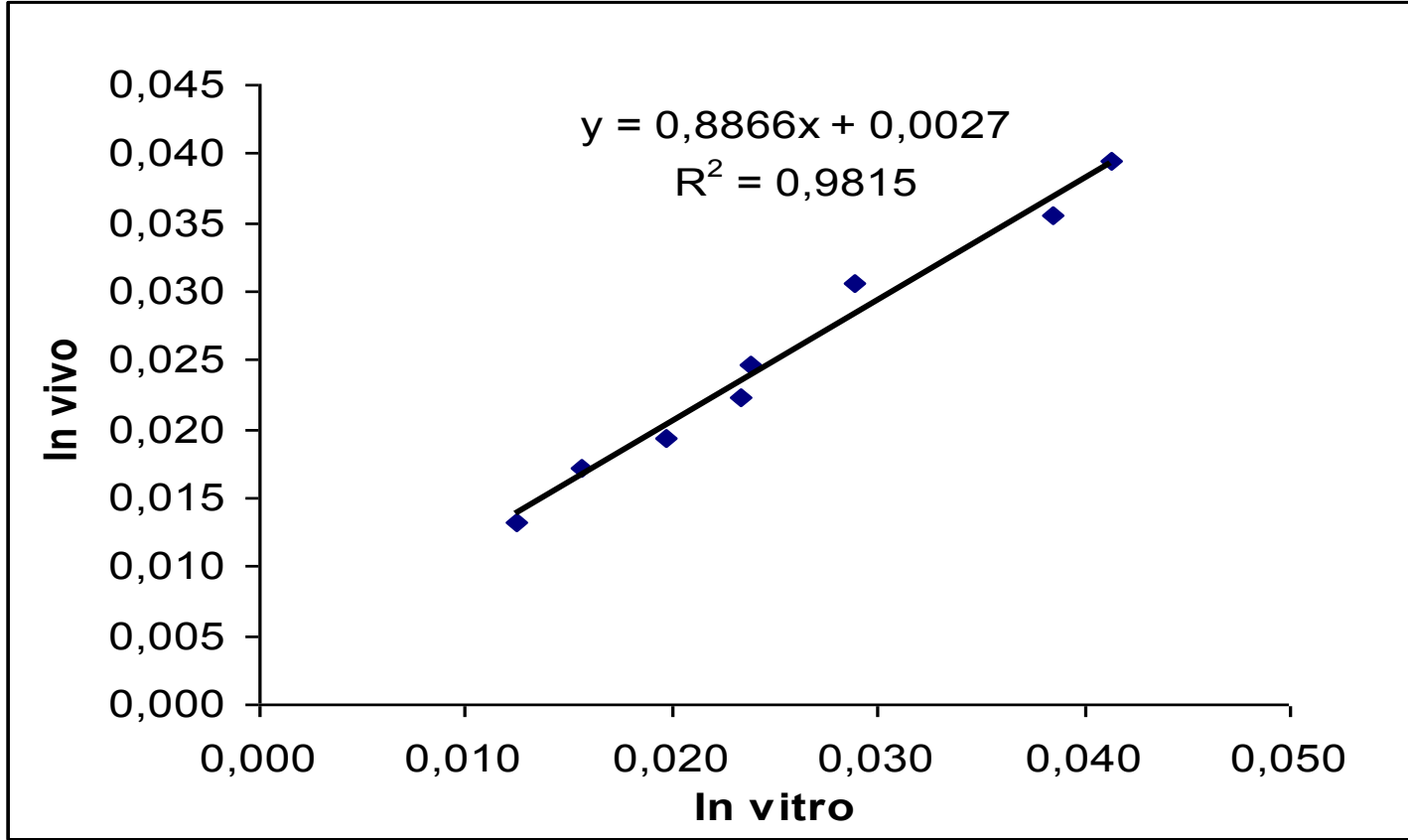
4.6.İN VİTRO VE İN VİVO BİYOKİMYASAL ANALİZ SONUÇLARININ KARŞILAŞTIRILMASI

In vitro ve *in vivo* ortamda gerçekleştirilen tuz stresi denemelerinden elde edilen sonuçların değerlendirilmesi, mutant bireylerin seleksiyonunda kullanılacak olan tuz konsantrasyonunu belirlemek amacıyla çok önemlidir. Bitkinin gelişimi sırasında, bitkide meydana gelen zararlanmayı izleyebildiğimiz ilk parametre klorofil yıkımıdır. *In vitro* tuz denemesinde, her iki tütün çeşidine ait klorofil verileri incelendiğinde 150 mM NaCl uygulamasından sonraki tüm konsantrasyonlarda klorofil miktarlarında kontrole göre anlamlı bir azalma gözlemlendi ($P<0.05$). *In vivo* tuz denemesinde de klorofil konsantrasyonlarının, aynı dozdaki tuz uygulamasıyla azalmaya başladığı ve tuz konsantrasyonunun artmasıyla klorofil a, klorofil b ve total klorofil miktarlarındaki azalmanın arttığı kaydedildi.

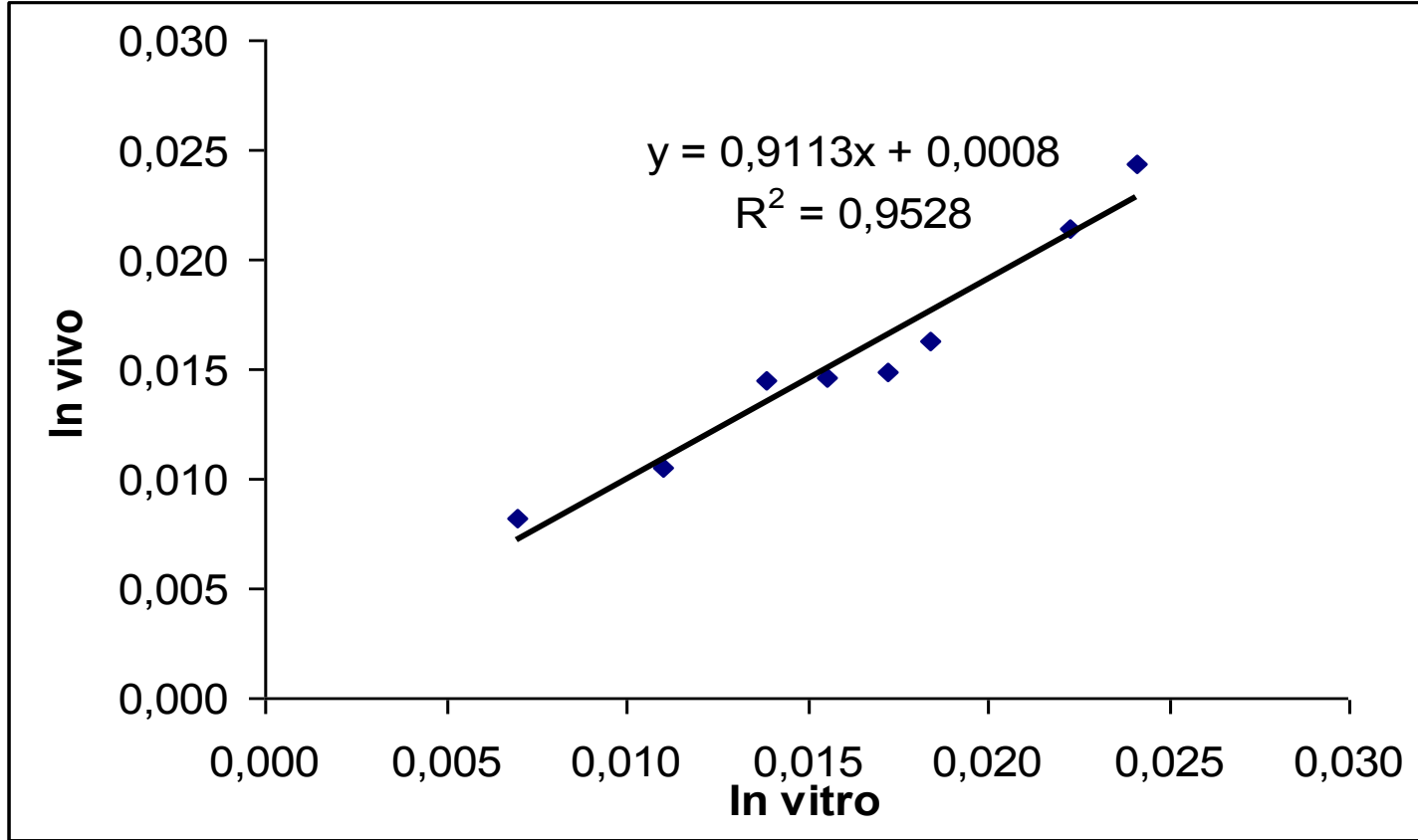
Total protein sonuçları karşılaştırıldığında, *in vitro* ortamda gerçekleştirilen tuz denemesinde 250 mM'a kadar olan NaCl konsantrasyonlarında bir artış görülürken, 300 mM ve 350 mM NaCl uygulamalarında ise protein miktarlarında bir azalma belirlendi. *In vivo* tuz denemesinde de elde edilen bulgularında bu sonucu desteklediği görüldü.

Hem *in vitro* hem de *in vivo* ortamda gerçekleştirilen tuz stres denemelerinden elde edilen yapraklarda yapılan biyokimyasal analizlerinin sonuçlarının paralellik göstererek birbirlerini destekledikleri görüldü. Maruz kalınan NaCl konsantrasyonunun artmasıyla, meydana gelen zararlanmanın arttığı ve buna bağlı olarak da koruyucu göreve sahip

antioksidan enzim aktivitelerinde de artış olduğu gözlemlendi. Tuz stresi denemeleri sonucunda değerlendirilen antioksidant enzimlerden sadece glutatyon redüktaz enzim aktivitesine ait sonuçlarda, türler arasında ve her iki deney koşulunda regresyon katsayıları arasındaki farklılıkların anlamlı olduğu belirlendi ($p < 0.05$) (Şekil 4.35 ve 4.36).



Şekil 4.35 İzmir Özbaş tütün çeşidine ait *in vitro* ve *in vivo* tuz denemelerindeki glutatyon redüktaz (GR) enzim aktiviteleri arasındaki ilişki



Şekil 4.36 Akhisar 97 tütün çeşidine ait *in vitro* ve *in vivo* tuz denemelerindeki glutatyon redüktaz (GR) enzim aktiviteleri arasındaki ilişki

4.6. MORFOLOJİK ZARARLANMA DEĞERLENDİRİLMESİ

Bölüm 3.6.3'te belirtildiği şekilde 14 gün süreyle *in vivo* NaCl uygulamasına maruz bırakılan fidelerde meydana gelen zararlanmalar 0-5 skalasına göre derecelendirildi. Elde edilen sonuçlar Duncan'ın çoklu değişim testine göre değerlendirildi (Tablo 4.29).

Tablo 4.29. İzmir Özbaş ve Akhisar 97 tütün çeşitlerine ait *in vivo* tuz denemesi morfolojik zararlanma verileri

	İzmir Özbaş	Akhisar 97
Kontrol	0.10±0.03 ^a	0.09±0.02 ^a
50 mM NaCl	0.37±0.08 ^a	0.47±0.09 ^a
100 mM NaCl	1.03±0.05 ^b	1.33±0.03 ^b
150 mM NaCl	1.37±0.03 ^b	1.53±0.10 ^b
200 mM NaCl	2.10±0.11 ^c	2.43±0.07 ^c
250 mM NaCl	3.40±0.09 ^d	4.00±0.06 ^d
300 mM NaCl	4.00±0.12 ^e	4.36±0.13 ^e
350 mM NaCl	4.30±0.21 ^e	4.66±0.04 ^f

*Her çeşit kendi içinde değerlendirilerek harfleme yapılmıştır. Aynı harfler ile gösterilmeyen değerler, Duncan'ın çoklu değişim testine göre anlamlıdır. Her bir deneme 3 tekrarlı yapılmıştır (P< 0.05).

Buna göre, Akhisar 97 tütün çeşidinde, kontrol ile 200 mM ve üzerindeki konsantrasyonlarda NaCl uygulaması ile meydana gelen zararlanmalar istatistiksel açıdan anlamlı bulundu (P<0.05). İzmir Özbaş tütün çeşidine ait fidelerde ise, 250, 300 ve 350 mM NaCl uygulamalarında meydana gelen hasarlar kontrole göre anlamlı bulundu (P<0.05). Tüm analiz sonuçlarının da hem *in vitro* hem de *in vivo* tuz denemelerinde, her iki tütün çeşidi için paralellik göstermesi nedeniyle, tuz mutantlarının seleksiyonunda kullanılacak ortak bir NaCl konsantrasyonu belirlendi.

Bütün bu analizler sonucunda tarla denemesinden elde edilecek olan tohumların *in vivo* koşullarda, 250 mM NaCl içeren ¼ Hoagland solüsyonu ile sulanarak seleksiyonlarının yapılması uygun olarak bulundu.

4.7. TUZLULUĞA TOLERANSLI MUTANT BİTKİ SELEKSİYONUNA AİT BULGULAR

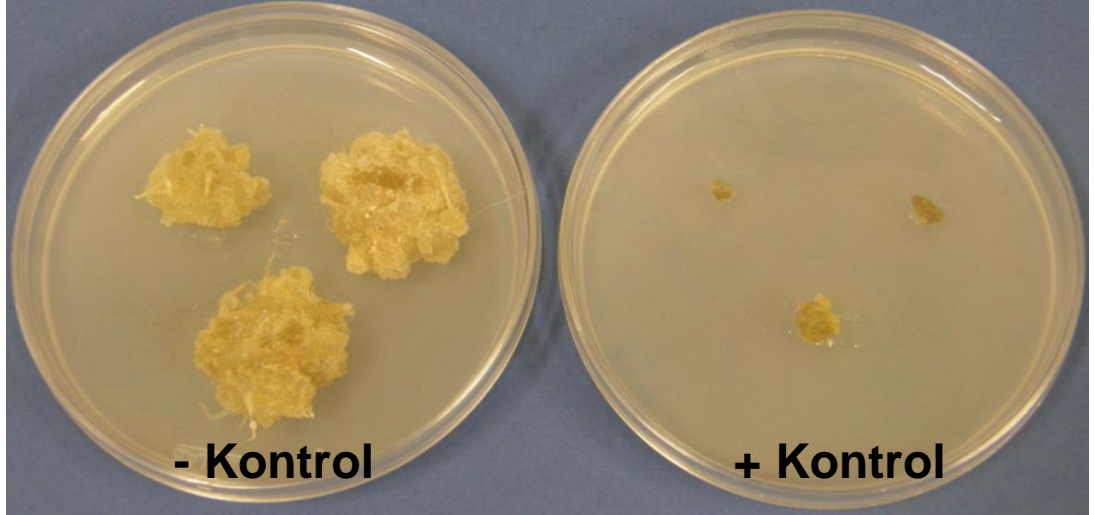
Her iki tütün çeşidinden toplam 1500 adet bitkinin *in vivo* ön tuz seleksiyonu yapılarak 250 mM NaCl'ye toleranslı 103 birey seçildi. Bu bireylerin 42 tanesi Akhisar 97 çeşidine ait olup, 61 tanesi de İzmir Özbaş tütün çeşidine aittir.

Tuz denemesinin sonunda seçilen fideler temiz perlite alınarak $\frac{1}{4}$ Hoagland solüsyonu ile sulandı ve iklim odasında yetiştirilmeye devam edildi. Gelişimleri normale dönen bitkilerin yapraklarından doku kültürü kurularak, *in vitro* ortamda bu bitkilerin tuzluluğa verdikleri cevabın ikincil kontrolü bölüm 3.9'da belirtildiği şekilde kallus gelişim farklılıklarına göre yapıldı. 21 gün sonunda 250 mM NaCl içeren besi ortamında iyi kallus gelişimi gösteren 10 bitki seçilmiş olup, örnek numaraları ve ışınlama dozları Tablo 4.30'da verildi.

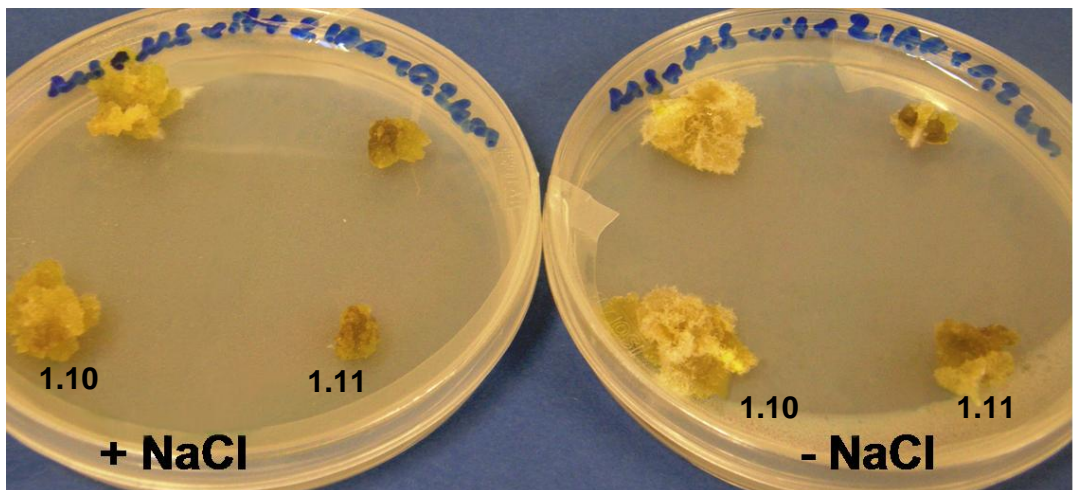
Tablo 4.30. Gama radyasyonu ile ışınlanan tütün bitkilerinin M₃ generasyonunda 250 mM NaCl varlığında kontrole yakın gelişim gösteren mutant bireyler

Bitki Numarası	Çeşit	Işınlama Dozları
1.1	Akhisar	200 Gy
1.3	Akhisar	200 Gy
1.10	Akhisar	300 Gy
1.11	Akhisar	100 Gy
1.17	Akhisar	100 Gy
3.3	İzmir Özbaş	100 Gy
3.4	İzmir Özbaş	100 Gy
3.25	İzmir Özbaş	100 Gy
3.26	İzmir Özbaş	200 Gy
3.31	İzmir Özbaş	300 Gy

İn vitro seleksiyonda herbir bitkinin kendi kontrolü kullanıldı. Şekil 4.37’de kontrol bitkilerinin 250 mM NaCl içeren ve içermeyen ortamlardaki kallus gelişimleri ve *in vitro* seleksiyona tabi tutulan bitkilerin kallus gelişimleri Şekil 4.38 ve 4.39’da verildi.

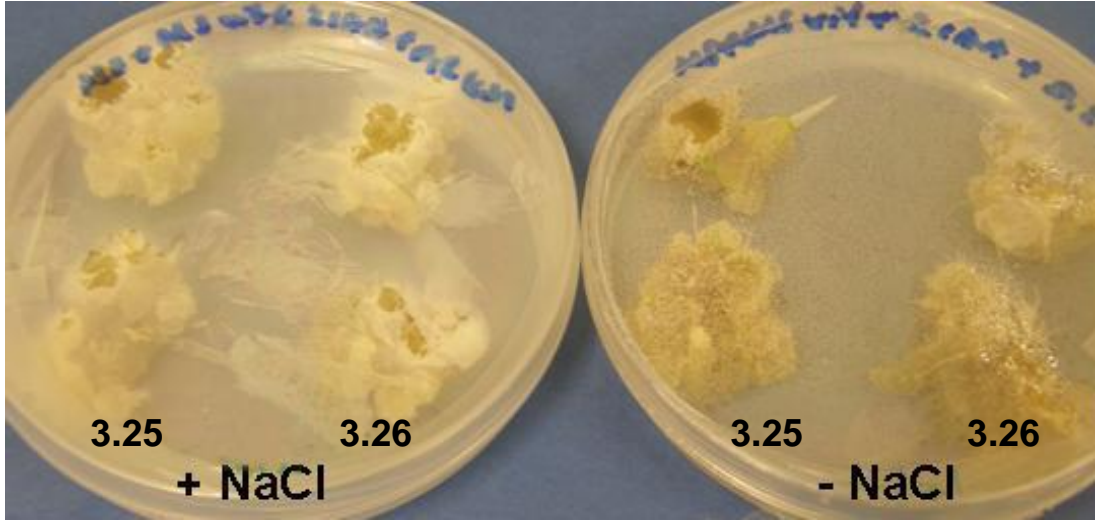


Şekil 4.37 İzmir Özbaş çeşidine ait kontrol bitkilerinin 250 mM NaCl içeren ve içermeyen besiyerlerindeki kallus gelişimleri



A

Şekil 4.38 1.10 ve 1.11 numaralı Akhisar 97 varyetesi ait 250 mM NaCl'ye toleranslı olarak belirlenen mutant bitkilerin yapraklarından kurulan kallus kültürlerindeki gelişimleri



B

Şekil 4.39 3.25 ve 3.26 numaralı İzmir Özbaş varyetesine ait 250 mM NaCl'ye toleranslı olarak belirlenen mutant bitkilerin yapraklarından kurulan kallus kültürlerindeki gelişimleri

4.8. TUZ MUTANTLARININ GLUTATYON REDÜKTAZ (GR) ENZİM AKTİVİTELERİ

250 mM NaCl'ye karşı toleranslı olarak belirlenen Akhisar 97 ve İzmir Özbaş çeşitlerine ait mutant bitkilerin glutatyon redüktaz enzim aktiviteleri belirlendi (Tablo 4.31).

Tablo 4.31. 250 mM NaCl'ye toleranslı olarak seçilen Akhisar 97 ve İzmir Özbaş tütün çeşitlerine ait mutantların glutatyon redüktaz enzim aktiviteleri ($\mu\text{mol NADPH}/\text{min mg TA} \pm \text{SD}$)

Mutant Bitki Numarası	GR Aktivitesi ($\mu\text{mol NADPH}/\text{min mg TA}$) \pm SD
Kontrol Akhisar	0.0085 \pm 0.0027
Mutant 1.1	0.0314 \pm 0.0035
Mutant 1.3	0.0322 \pm 0.0210
Mutant 1.10	0.0316 \pm 0.0180
Mutant 1.11	0.0303 \pm 0.0150
Mutant 1.17	0.0318 \pm 0.0240
Kontrol İzmir Özbaş	0.0014 \pm 0.0410
Mutant 3.3	0.0320 \pm 0.0320
Mutant 3.4	0.0346 \pm 0.0170
Mutant 3.25	0.0411 \pm 0.0260
Mutant 3.26	0.0384 \pm 0.0410
Mutant 3.31	0.0405 \pm 0.0230

Akhisar 97 tütün çeşitlerine ait kontrol bitkilerinin glutatyon redüktaz enzim aktiviteleri 0.0085 $\mu\text{mol NADPH}/\text{min mg TA}$ iken, Akhisar 97 çeşidine ait olan tuza toleranslı olarak seçilen mutantlara ait glutatyon redüktaz enzim aktiviteleri 0.0303 ile 0.0322 $\mu\text{mol NADPH}/\text{min mg TA}$ arasında değişirken en yüksek GR aktivitesini 1.3 numaralı mutant gösterdi. İzmir Özbaş tütün çeşidine ait kontrol bitkilerinin glutatyon redüktaz aktiviteleri 0.0014 $\mu\text{mol NADPH}/\text{min mg TA}$ 'dır. Seçilen mutant bireylerin glutatyon redüktaz enzim aktiviteleri 0.0320 ile 0.0411 $\mu\text{mol NADPH}/\text{min mg TA}$ olarak belirlendi. En yüksek GR aktivitesine sahip olan İzmir Özbaş çeşidine ait mutant bitki 3.25 numaralı bireydir.

4.9. GENOMİK DNA İZOLASYONU VE ANALİZİ

Çalışmamızda, genomik DNA izolasyonu yapıldı ve her iki tütün çeşidine ait kontrol ve tuza toleranslı bitkilerin genomik DNA analizleri spektrofotometrik ve elektroforetik yöntemler kullanılarak ortaya kondu. İzole edilen genomik DNA'ların miktar tayinleri

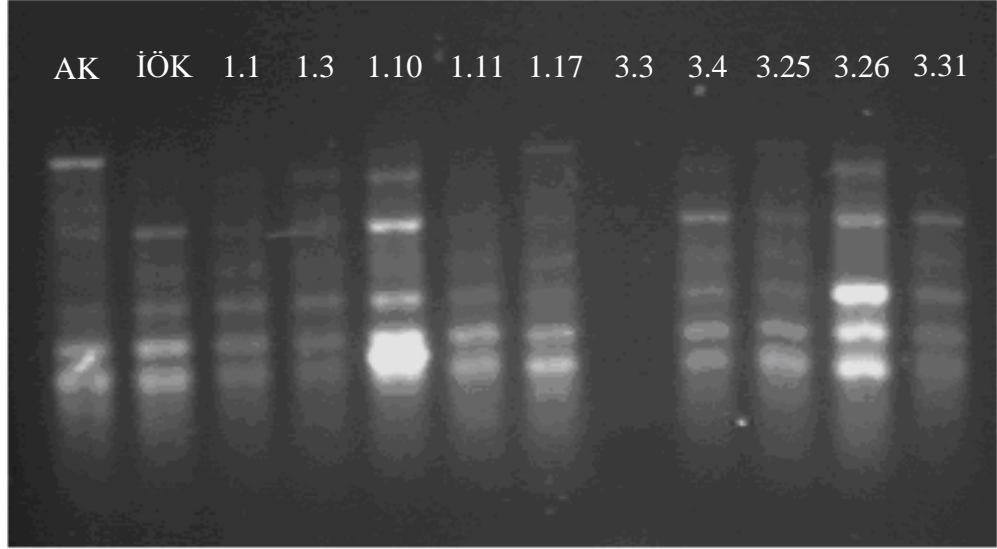
Tris/EDTA tamponu kullanılarak 50 kez sulandırılan örneklerin Nanodrop cihazında 260 nm dalga boyundaki absorpsiyon değerlerine göre hesaplandı.

4.9.1.Genomik DNA Amplifikasyonu

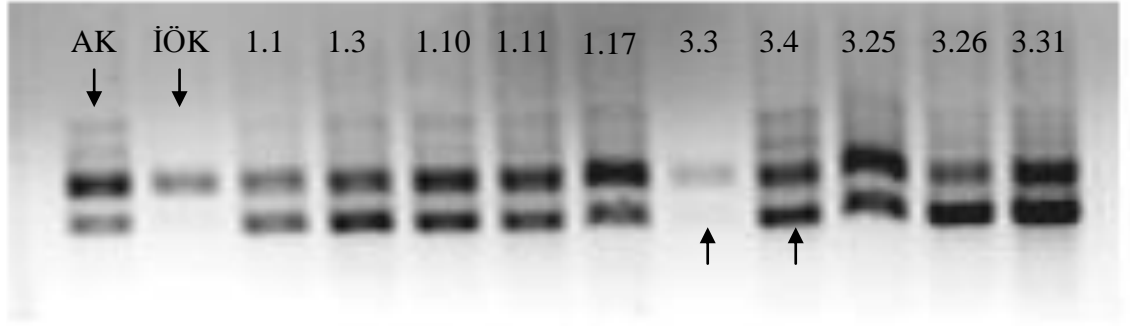
Optimum PZR karışımı ve döngüleri, RAPD-PZR analizinde uygulanarak kontrol ve tuza toleranslı mutant bitkilerin genomik DNA amplifikasyonları gerçekleştirildi.

4.9.2.PZR Ürünlerinin Gözlenmesi

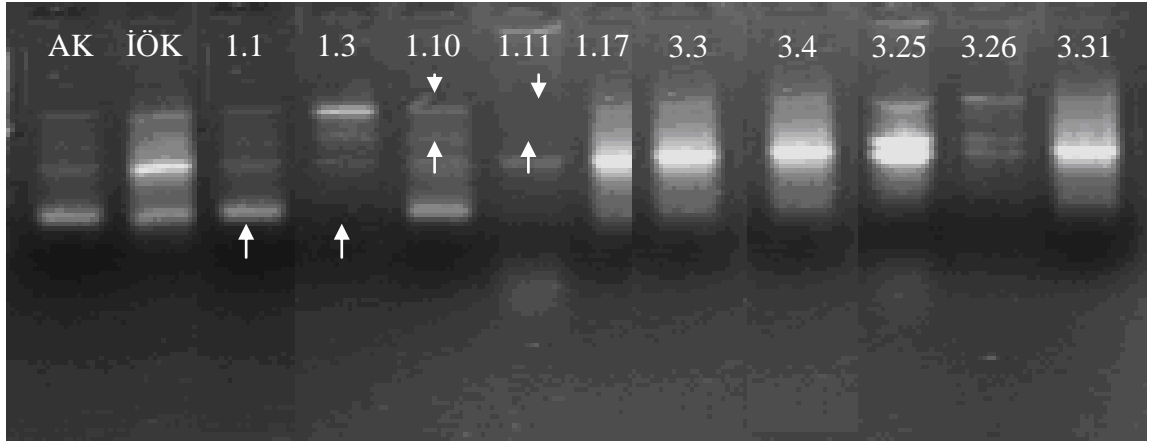
RAPD-PZR analizinde kullandığımız primerlere ait PZR ürünleri %2'lik agaroz jel elektroforezinde 1xTAE tampon çözeltisi içerisinde 90 V'da yürütülerek etidyum bromid (10 mg/ml) ile UV ışığında görünür hale getirildi. RAPD-PZR uygulamasında kullanılan primerlerin amplifikasyonlarına ait jel görüntüleri Şekil 4.40-4.44'te verildi.



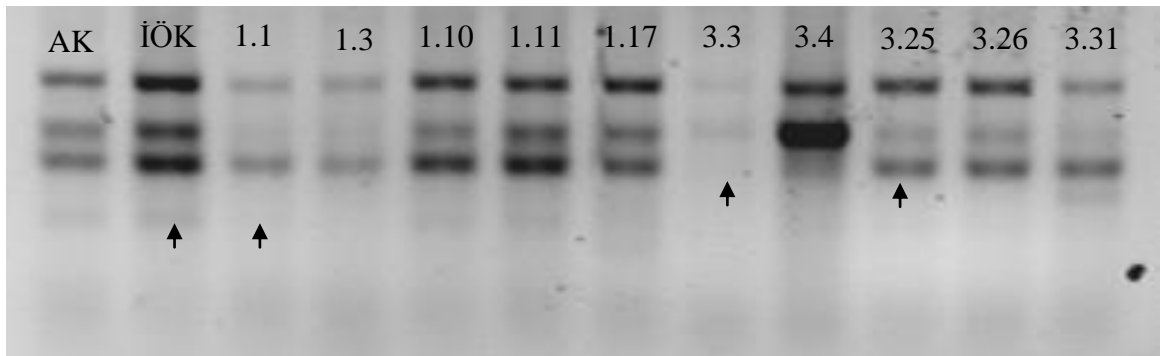
Şekil 4.40 OPO 02 primerine ait amplifikasyonun agaroz jel elektroforez görüntüsü



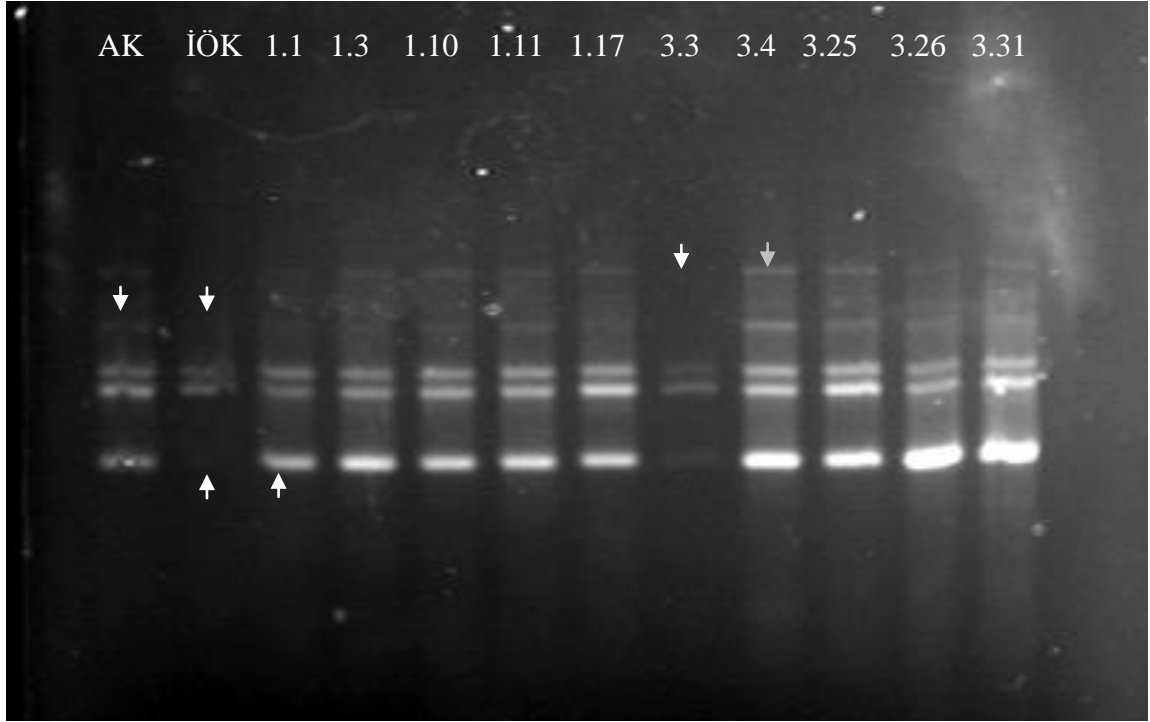
Şekil 4.41 OPB 05 primerine ait amplifikasyonun agaroz jel elektroforez görüntüsü



Şekil 4.42 M13 primerine ait amplifikasyonun agaroz jel elektroforez görüntüsü



Şekil 4.43 A7 primerine ait amplifikasyonun agaroz jel elektroforez görüntüsü



Şekil 4.44 OPB 08 primerine ait amplifikasyonun agaroz jel elektroforez görüntüsü

4.9.3. Primerlere Ait Amplifikasyon Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Çalışmamızda RAPD bantlarının büyüklüklerini belirlemek için 100-1500 baz çifti arasında 11 bant içeren DNA markırı kullanıldı. Primerlere ait amplifikasyon sonuçları, amplifikasyon ürünlerinin büyüklüklerinin, DNA marköründeki bantlar ile karşılaştırılması sonucunda belirlendi.

Çalışmamızdaki primerlere ait amplifikasyon sonuçları RAPD bantlarının agaroz jel elektroforezinde görüntülenmesi ile elde edildi. Elde edilen sonuçlara göre, RAPD-PZR analizinde kullanılan M13, A7, OPO 02, OPB 05 ve OPB 08 primerlerinde amplifikasyon gözlemlendi.

RAPD analizinde kullanılan 13 adet primerden 5 tanesi denemede kullanılan tütün bitkilerinde çalıştı. Tüm primerler göz önünde bulundurulduğunda, toplam 23 DNA bantı kontrol ve mutant bitkilerde amplifiye oldu. Çalışmada kullanılan 5 primerin ortalama polimorfizm oranı, polimorfik bant sayısının toplam bant sayısına oranlanması ile saptandı (Tablo 4.16).

Tablo 4.32. RAPD sonucu oluşan bantlar ve polimorfizm oranları

Primerin Adı	Toplam Bant Sayısı	Polimorfik Bant Sayısı	Polimorfizm
			Oranı (%)
M13	4	3	75
OPO 02	6	6	100
A7	4	2	50
OPB 05	4	3	75
OPB 08	5	3	60
Toplam	23	17	73.91

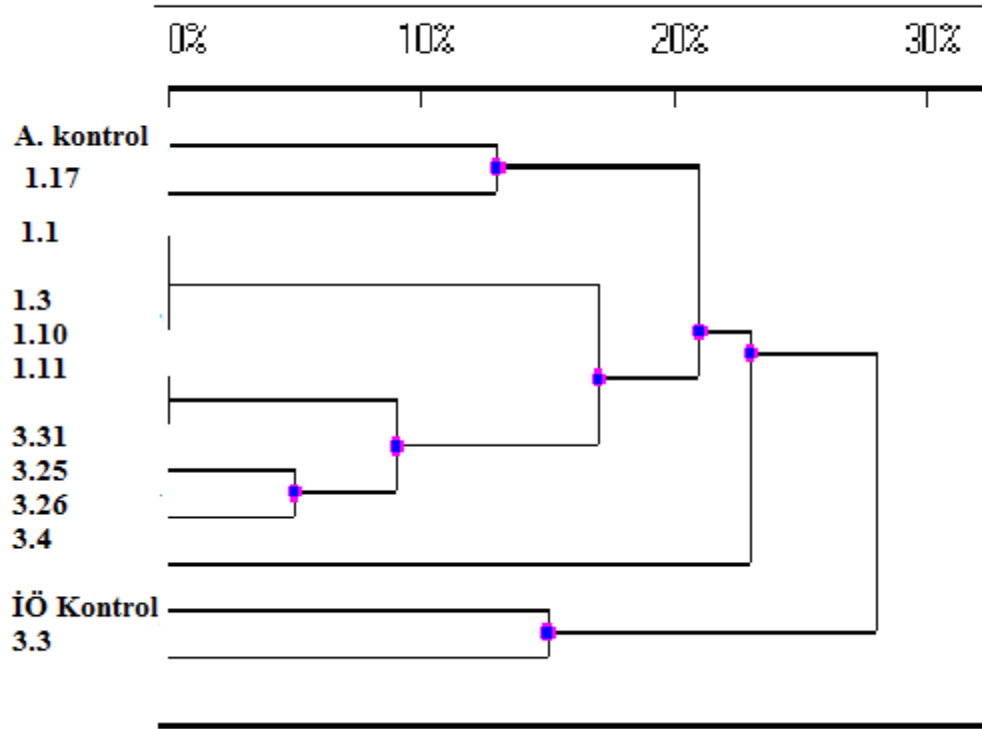
Çalışmada kullanılan tüm primerlerin polimorfiz oranı % 73.91 olarak bulundu.

4.9.4.Genetik Mesafenin Hesaplanması

Akhisar 97 ve İzmir Özbaş tütün (*Nicotiana tabacum* L.) çeşitlerine ait kontrol ve mutant bitkilerin birbirlerine olan genetik uzaklıklarını belirlemek için RAPD-PZR analizinde amplifiye olan primerlerdeki RAPD bantlarına RAPD-PZR ile her bir primerde ayrı ayrı elde edilen jel fotoğraflarından polimorfik olan bantlar belirlendi. Buna göre yapılan inceleme sonucunda bantların varlığına (1), yokluğuna (0) değeri verilerek bir veri matrisi oluşturuldu. Bu matristen hareketle primerlerin verdikleri polimorfik bantların frekansları ve polimorfizm oranları hesaplandı. Genetik benzerlikler ve uzaklıklar POPGENE programı kullanılarak hesaplandı. Tablo 4.33'te her iki tütün çeşidine ait kontrol ve mutant bitkilerin birbirlerine olan genetik uzaklıkları verildi. Şekil 4.45'te ise, elde edilen genetik uzaklık verilerine göre çizilen dendrogram verildi.

Tablo 4.33. Çalışmamızda kullanılan primerlere göre Akhisar 97 ve İzmir Özbaş tütün (*Nicotiana tabacum* L.) çeşitlerine ait kontrol ve mutant bitkilerin birbirlerine olan genetik uzaklıkları

	Akontrol	İÖkontrol	1.1	1.3	1.10	1.11	1.17	3.3	3.4	3.25	3.26	3.31
Akontrol	0.00											
İÖkontrol	0.33	0.00										
1.1	0.33	0.40	0.00									
1.3	0.33	0.40	0.00	0.00								
1.10	0.33	0.40	0.00	0.00	0.00							
1.11	0.35	0.33	0.25	0.25	0.25	0.00						
1.17	0.23	0.36	0.36	0.36	0.30	0.30	0.00					
3.3	0.52	0.25	0.44	0.44	0.44	0.37	0.37	0.00				
3.4	0.36	0.43	0.35	0.35	0.35	0.29	0.29	0.29	0.00			
3.25	0.33	0.39	0.32	0.32	0.32	0.18	0.18	0.43	0.27	0.00		
3.26	0.33	0.39	0.32	0.32	0.32	0.10	0.10	0.43	0.35	0.09	0.00	
3.31	0.35	0.33	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.18	0.20	0.22	0.22	0.00



Şekil 4.45 Akhisar 97 ve İzmir Özbaş tütün (*Nicotiana tabacum* L.) çeşitlerine ait kontrol ve mutant bitkilerin, RAPD-PZR’de kullanılan primerlerin amplifikasyon sonuçlarına göre oluşturulan dendrogramları

RAPD-PZR’de kullanılan primerlerin amplifikasyonlarına göre oluşturulan dendrogramda, iki ana grup görülmektedir. Bu gruplardan küçük olan İzmir Özbaş kontrol ve 3.3 bireyinden oluşurken, büyük grup kendi içinde iki alt gruba ayrılmaktadır. Küçük grup sadece 3.4 bitkisinden oluşmaktadır. İkinci büyük alt grup, kendi içinde alt gruplardan oluşmaktadır.

Bu sonuçlara göre, Akhisar 97 ve İzmir Özbaş tütün çeşitlerine ait kontrol bitkileri, genetik olarak birbirlerinden %33 oranında uzak oldukları görüldü. İzmir Özbaş çeşidine ait olan 3.3 mutanı kendi kontrol bitkisine %25, Akhisar çeşidine ait olan 1.17 bitkisi, kontrolüne %23 oranında uzaklıkta bulundu. İzmir Özbaş tütün çeşidine ait mutantlar arasında kontrole en uzak olan mutant bitki %43 genetik uzaklık ile 3.4 numaralı bitki iken, Akhisar 97 çeşidine ait 1.11 mutanı %35 genetik uzaklığa sahiptir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Abiyotik streslere toleranslı bitkilerin geliştirilmesi, tarımsal verimde ürün kayıplarının giderilmesi açısından son derece önemlidir. Klasik ıslah metodları ile, tuza toleranslı hatların geliştirilmesinde sınırlayıcı etken, önemli bir çok üründe gen havuzlarında genetik varyasyonların çok az olmasıdır. Bu nedenle, alternatif teknolojiler geliştirilmektedir. Gen aktarım metodları ile, birçok bitkide iyon taşıyıcı sistemler, koruyucu organik bileşiklerin sentezinin artırılması, antioksidan enzim üretiminde artış sağlama yönünde çalışmalar yapılmış ve başarılar sağlanmıştır (Ashraf and Akram, 2009). Ancak geliştirilen hatlarda istenen, gen aktarımından sonra bitkiye sadece istenilen özelliğin kazandırılması ve ana hattın sahip olduğu diğer özelliklerde herhangi bir değişiklik olmamasıdır. Ancak, uygulanan bu teknik stres etmenine karşı tolerans sağlansa bile diğer özelliklerde sonraki hatlarda farklılıkların oluşabileceği gösterilmiştir. Thomson (2010), gen aktarım çalışmalarında tek bir lokusa fazla gen girebileceği gibi, bazı durumlarda aktarılan genlerin ekspresyonlarının görülmediği durumlarla da karşılaşılabilindiğini belirtmiştir. Ayrıca, gen aktarım tekniklerinin maliyetleri de oldukça fazladır. Bu tekniğe alternatif olarak mutasyon ıslahı tekniği kullanılması, çok çeşitli özellikler için kısa sürede ve düşük maliyette gen havuzunun oluşturulması nedeniyle tercih edilmektedir.

Tuz stresi, bitkiler üzerinde çeşitli biyokimyasal ve fizyolojik değişikliklere neden olmaktadır. Son yıllarda ülkemiz için de oldukça önemli bir sorun haline gelmekte olan toprak tuzluluğu, tarım alanları çok geniş olan ülkemizde de tarımsal üretimde sorunları beraberinde getirecektir.

Bu çalışmaya tuzluluk probleminin çözümüne katkıda bulunmak amacıyla başlanmış ve İzmir yöresine ait 2 çeşit tütünde 4 farklı gama radyasyon dozları kullanılarak, genetik çeşitlilik elde edilmiş ve tuzluluğa toleranslı mutant bitkilerin seçimleri yapılmıştır.

Bu amaçla Akhisar 97 ve İzmir Özbaş tütün çeşitlerinin gama radyasyonuna karşı hassasiyetleri belirlendi. Çalışmada 0, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 500 ve 600 Gy'lik dozlar ile ışınlanan her iki çeşide ait tohumlardan elde edilen fidelerde, yaşayan fide sayıları, yaş ve kuru ağırlıkları belirlenerek, bu değerlere göre LD₃₀, LD₅₀, GR₃₀ ve

GR₅₀ değerleri saptandı. Akhisar 97 eşidinde LD₅₀ dozu 213 Gy iken, İzmir Özbaş eşidinde 288 Gy'dir. Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde Akhisar 97 tütün çeşidinin, gama radyasyonuna İzmir Özbaş çeşidine göre daha hassas olduğu görüldü. Kurulacak olan tarla denemesi için kullanılacak olan radyasyon dozları, bu verilere göre belirlenerek mutasyon denemesi kuruldu

Tütün bitkisi ile yapılan mutasyon ıslahı çalışmalarında, en etkili gama radyasyon dozlarının 200-350 Gy arasında olduğu belirtilmektedir (Briggs ve Constantin, 1977).

Işınlanan bitki materyaline göre kullanılan gama radyasyon dozları değişiklik göstermektedir. Tohumların ışınlanmasında, daha yüksek dozda radyasyon kullanılmaktadır (Lamseejan ve diğ., 2000; iftçi ve diğ., 2006; Suprasanna ve diğ., 2008).

M₁ generasyonu eldesi için 0, 100, 200, 300 ve 400 Gy'lik gama radyasyon dozlarında ışınlanan ve tarlaya ekilen Akhisar 97 ve İzmir Özbaş tütün tohumlarından gelişen fidelerin yaşama oranları, ortalama fide boylarında, uygulanan radyasyon dozlarının artışına paralel olarak bir azalma gözlemlendi. Ayrıca, radyasyon dozunun artışıyla, fide başına düşen yaprak sayılarında da azalma gözlemlendi.

Taner ve diğ.(2004), sarımsak dişlerini (*Allium sativum* L.) Cs¹³⁷ kaynağında 0, 5, 10, 15, 20, 25 ve 30 Gy dozlarda ışınlamışlardır. Işınlama dozlarının artmasıyla çimlenme oranlarında bir azalma olduğunu bildirmişlerdir.

Başer ve diğ.(2007), 2 makarnalık buğday çeşidini ⁶⁰Co, gama radyasyon kaynağında 100, 200, 300, 400, 500 ve 600 Gy dozlarda ışınlamışlardır. 100, 200 ve 300 Gy dozların çimlenme üzerine önemli bir etkiye sahip olmadıkları, 400 Gy'lik dozun her iki buğday çeşidinde de çimlenme oranlarında azalmaya yol açarken, uygulanan radyasyon dozunun artmasıyla, bitki canlılığının da önemli ölçüde azaldığını göstermişlerdir.

Hewawasam ve diğ.(2004), *Crossandra* bitkisinde yaptıkları çalışmada sürgün ucu eksplantlarını 0-90 Gy gama radyasyon dozu ile ışınlamışlardır ve ışınlama dozunun artmasıyla sürgün boylarında bir azalmanın meydana geldiğini bildirmişlerdir.

Puchooa (2005), Anthurium yaprak, tohum ve *in vitro*'da yetiştirilen sürgünleri 5, 10 ve 15 Gy gama radyasyonu ile ışınlamışlardır. ¹³⁷Cs'yi gama kaynağı olarak kullanmışlardır. Kallus oluşumu ve rejenerasyon için en iyi sonucu 5 Gy'de gözlemişlerdir. 15 Gy gama radyasyon dozunun Anthurium dokuları için öldürücü etkiye sahip olduğu gösterilmiştir.

Çiftçi ve diğ.(2006), 4 farklı bezelye (*Pisum sativum* L.) çeşidinde *in vitro* koşullarda gama ışınlarının mutajenik etkilerini incelemişlerdir. 5 farklı doz kullanarak (60, 100, 140 ve 180 Gy) gruplar oluşturulmuştur. Çalışmada kullanılan tüm genotiplerde, radyasyon dozunun artmasıyla bitki boyunda ve kök uzunluğunda azalma görmüşlerdir.

Suprasanna ve diğ. (2008), *in vitro* koşullarda şeker kamışı bitkisinde 0-80 Gy gama radyasyon ile ışınlama sonucunda mutant bitkiler elde etmişlerdir. Çalışmada LD₅₀ dozu olarak 20-30 Gy aralığını belirlemişlerdir.

Lamseejan ve diğ.(2000), krizantem (*Chrysanthemum morifolium*) bitkisinde doku kültürü koşullarında organogenik kallus oluşturduktan sonra 0, 10, 30, 50, 70, 90 ve 110 Gy gama radyasyon dozlarında ışınlamışlardır. Alt kültürlerde, çiçek rengi ve boyutunda değişiklikler gözlemişlerdir. 50 Gy ve üzerindeki dozların sürgün oluşturmak için kullanılmadığını, bitkilerin öldüklerini bildirmişlerdir.

Atak ve diğ.(2004), yaptıkları çalışmada 3 farklı soya (*Glycine max* L. Merrill) varyetesinde gama radyasyonu ile atrazine dirençli ve toleranslı mutantları oluşturmuşlardır. Tohumları, 200 Gy gama radyasyon dozu ile ışınladıktan sonra M₂ generasyonunda klorofil mutantlarını saptamışlardır.

Branch (2002)'de yaptığı çalışmada, "Georgia Browne" çeşidi yer fıstığını ⁶⁰Co kaynağında 200 Gy dozda ışınlamıştır. M₆, M₇, M₈, M₉ generasyonları, bakla ağırlığı, bakla ürünü, tohum ağırlığı ve tohum boyut dağılımları açısından değerlendirmişlerdir.

Tütün bitkisinin yapraklarında içerdiği nikotin ve indirgen şeker konsantrasyonları, tütünün önemli kalite özellikleridir. Kontrol ve M₁ generasyonuna ait fidelerin yapraklarının kırımı yapılmış olup, 2. ana ve uç ellerdeki hem nikotin hem de indirgen

şeker miktarları belirlendi. Kontrolde indirgen şeker oranı kırımlara göre 2. elden uç ellere doğru bir azalma gösterirken nikotinde kırımlara göre, 2. elden uç ellere doğru gidildikçe artış gösterdi. 2. ana elde her iki tütün çeşidinde radyasyon dozunun artmasıyla indirgen şeker miktarında kontrole göre bir artış görüldü. Uç ellerde ise, doz artışıyla indirgen şeker miktarlarında kontrole göre bir azalma gözlemlendi. Nikotin miktarlarında 2. ana elde kontrole göre azalma saptanırken, uç ellerde radyasyon uygulamalarında artış gözlemlendi. Bitkinin gelişimine bağlı olarak 2. ana ellerde şeker miktarının radyasyonla artışı ve buna bağlı olarak da uç ellerde nikotin miktarı artışında radyasyonun neden olduğu oksidatif stres rol oynamaktadır. Radyasyon ve abiyotik stres koşullarında, hücrel korunma mekanizmaları içerisinde şeker moleküllerinin miktarının arttığı bilinmektedir (Hoffmann, 2010; Schwimmer ve diğ., 2008; Watanabe ve diğ., 2004). Stres altında şeker konsantrasyonunda meydana gelen artış, uç ellerde de nikotin miktarının artışına neden olmuştur.

Kiong ve diğ.(2008), *Orthosiphon stamineus* bitkisinin sürgün ucu eksplantlarını, 0-70 Gy gama radyasyonu ile ışınlamışlardır. Biyokimyasal çalışmalar, radyasyon dozunun artışıyla total çözümlü protein ve total klorofil içeriğinde azalma olduğunu göstermişlerdir.

Ling ve diğ.(2008), 0, 10, 20, 30, 40 ve 50 Gy gama radyasyon dozlarını kullanarak, *Citrus sinensis* bitkisinde fizyolojik değişiklikleri incelemişlerdir. LD₅₀ dozu, 27 Gy olarak tespit edilmiş olup, 50 Gy ile ışınlanan bitkilerde en yüksek total çözümlü protein içeriği bulunduğu gösterilmiştir. Bununla beraber bu dozda ışınlanan bitkilerde önemli bir stres parametresi olan peroksidaz aktivitelerinde artış olduğunu bildirmişlerdir.

Wada ve diğ. (1998), ⁶⁰Co gama kaynağında 500 Gy'e kadar radyasyon dozlarında 2 tütün çeşidine ait tohum ve fidelerin radyohassasiyetlerini değerlendirmişlerdir. *N. debneyi* çeşidinde *N.tabacum* çeşidine göre tohumların radyasyona karşı hassas olduklarını gözlemişlerdir. *N.tabacum*'da ise fidelerin daha hassas olduklarını gözlemişlerdir. Fidelerle yapılan ileri analizler sonucunda, ışınlanan dokularda oluşan ·OH radikalının miktarının türler arasında veya artan radyasyon dozları arasında farklılık göstermediğini bildirmişlerdir. Radyasyon uygulamasıyla, bazı antioksidant enzimlerin (SOD, POX, CAT) aktivitelerinin arttığı ve izozim modellerinin değiştiği gösterilmiştir.

Çalışmada elde edilen sonuçlara dayanarak, radyasyona cevaptaki türler arasındaki farklılığın, dokularda oluşan toksik hidrojen peroksiti uzaklaştırmada görevi olan POX enziminin aktivitesindeki farklılıktan kaynaklanabileceğini öne sürmüşlerdir.

M₁ generasyonunda radyasyonun neden olduğu zararlanmalar nedeniyle hasat edilen bitki sayılarında dozun artışına paralel olarak daha az sayıda bitki hasat edildi. Bu nedenle, her iki çeşit için M₂ generasyonu eldesinde tarlaya şaşırtılan fide ve hasat edilen bitki sayıları, yüksek radyasyon dozlarında düşüktür. M₂ generasyonuna ait 1500 bitkiden tuzluluğa tolerans gösteren mutantların seçilimi gerçekleştirilmiştir. Mutantların seleksiyonları yapılmadan önce İzmir yöresine ait Akhisar 97 ve İzmir Özbaş tütün çeşitlerinin tuzluluğa karşı gösterdikleri toleransları hem *in vitro* hem de *in vivo* koşullarda yapılan denemelerle belirlendi.

In vitro tuz doz denemelerinde 8 farklı NaCl konsantrasyonuna maruz kalan iki çeşit tütün hattına ait tüm bitkilerin büyüme parametrelerinde (sürgün boyu, kök boyu ve taze ağırlık) uygulanan NaCl konsantrasyonunun artışına bağlı olarak bir azalma olduğu gözlemlendi.

Masood ve diğ. (2006), *A. pinnota* ve *A. filicuoides* ile yaptığı çalışmada tuz uygulamasının bitki gelişimlerini önemli ölçüde inhibe ettiğini göstermiştir.

Gövde ve kök yaş ağırlıkları, Adams ve diğ.(1992)' lerinin yaptıkları çalışmada da farklı tuz tiplerinin uygulanması sonucunda önemli ölçüde bir azalış göstermiştir.

Neto ve diğ.(2004), mısır bitkisi ile yaptıkları çalışmada, kullanılan tüm mısır genotiplerinde, tuz stresi uygulanması sonrasında bitki büyümesinde gerileme olduğunu göstermişlerdir.

Öncel ve Keleş (2002), 200 mM NaCl stresi altındaki buğday genotiplerinde, kök ve sürgün büyümelerinde azalma olduğunu bildirmişlerdir.

Moud ve Maghsoudi (2008), farklı buğday çeşitlerinde, tuz stresi altında koleoptil büyümesinde gerileme tespit etmişlerdir.

Çalışmada kullanılan her iki tütün çeşidinde de *in vitro* koşullarda uygulanan 8 farklı tuz konsantrasyonunda fotosentetik pigment konsantrasyonlarında, düşük NaCl konsantrasyonlarında bir artış gözlense de artan NaCl konsantrasyonlarına paralel olarak bir azalma saptandı. Ancak Akhisar 97 çeşidi için 200 mM NaCl'den yüksek olan tuz konsantrasyonlarında istatistiksel açıdan anlamlı azalışlar kaydedilirken, İzmir Özbaş çeşidi için 250 mM'dan daha yüksek dozlarda fotosentetik pigmentlerde saptanan azalmalar anlamlı olarak bulundu ($P < 0.05$). *In vivo* stres koşullarında saptanan fotosentetik pigment konsantrasyonlarındaki değişiklikler, *in vitro* çalışmada elde edilen bulguları destekledi.

Tuzluluk, bitkilerde fotosentezi de azaltmaktadır. Biyokütle ürünü olarak bitki büyümesi, fotosentezin bir ölçümüdür ve bu nedenle büyümeyi etkileyen çevresel stresler, fotosentezi de etkilemektedirler. Ancak, tuz stresinin fotosentezi baskıladığına dair bilgiler olsa da, fotosentezin tuzluluk ile yavaşlamadığına ve düşük konsantrasyonlarda tuz uygulaması ile fotosentezin stimule olduğuna dair sonuçlar da bildirilmiştir (Lascano ve diğ., 2003; Reddy ve diğ., 2004; Yazıcı ve diğ., 2007; Xin Wen ve diğ., 2008).

Artan tuzluluğa maruz kalan birçok bitkide verimde meydana gelen düşüş, fotosentetik kapasitedeki azalma ile bağlantılı bulunmaktadır. Birçok türde tuz stresi altında fotosentezi sınırlayan etkenler araştırılmış olmasına rağmen, inhibisyonun mekanik modeli henüz tam olarak anlaşılammıştır. Tuz, fotosentez oranını azaltarak dolaylı olarak büyüme ve gelişmeyi etkileyebilmektedir (Reddy ve diğ., 2004; Yazıcı ve diğ., 2007).

Ayrıca, fotosentez kapasitesindeki azalma, tuz ile indüklenmiş reaksiyonlardan alınan geri bildirim ile bazı karbon metabolizma süreçlerinin engellenmesinin sonucudur. Azalmış su potansiyeli altında, substrat fruktoz-1,6-bifosfatın (FBF) stroma seviyeleri birikip, fruktoz-6-fosfat azalarak FBPaz, fotosentez oranını kısıtlar hale gelmektedir (Reddy ve diğ., 2004).

XinWen ve diğ.(2008), Taklamakan çölünde yetişen 3 farklı bitkide tuz stresinin etkilerini değerlendirmişlerdir. Uygulanan tuz stresinin 10 g/L'den 15 g/L'ye çıkartılmasıyla, klorofil seviyelerinde azalmalar görüldüğünü bildirmişlerdir.

In vitro tuz doz denemelerinde, total protein miktarları, her iki tütün çeşidinde de 300 mM NaCl konsantrasyonuna kadar artış gösterdi. Akhisar 97 tütün çeşidinde meydana gelen artış, İzmir Özbaş çeşidine göre daha fazla olarak bulundu. 300 ve 350 mM NaCl uygulamalarında total protein miktarlarında azalma gözlemlendi. *In vivo* tuz denemesinde ise, Akhisar 97 çeşidinde 200 ve 250 mM NaCl uygulamalarıyla daha düşük dozlara göre anlamlı bir artış gösterdi ($P<0.05$). İzmir Özbaş çeşidinde de 250 mM konsantrasyonda NaCl muamelesinin, total protein miktarlarında artışa neden olduğu görüldü. 300 ve 350 mM NaCl uygulamalarında gözlenen düşüş, *in vitro* denemede elde edilen sonuçlarla benzerlik gösterdi.

Yapraklarda çözünebilir protein içeriğinin azalması, tuzluluğa karşı bir tepki olarak oluşmaktadır. Razavizadeh ve diğ. (2009), yaptıkları çalışmada, tuz stresi altında savunma ve enerji üretimiyle ilgili olan proteinlerin sentezinin gerilediğini göstermişlerdir.

Rahnama ve Ebrahimzadeh (2004), patates bitkisinde tuz stresinin, NaCl konsantrasyonunun artmasıyla hem sürgünlerde hem de kalluslarda total protein miktarlarında düşüş kaydetmişlerdir. K^+ 'un protein sentezi için önemli bir role sahip olması nedeniyle, meydana gelen bu azalışın, K^+ miktarının azalmasından kaynaklanabileceğini öne sürmüşlerdir.

Bitkilerin maruz kaldıkları düşük konsantrasyonlardaki NaCl stresine karşı proteinleri sentezlemeleri, total protein miktarında artış olarak gözlemlendi. Ancak tuz konsantrasyonunun artmasına paralel, bitkide meydana gelen zararlanmalar artmakta ve birçok metabolik yol inhibe olmaktadır. Bu sonuçta total protein miktarında bir azalma olarak karşımıza çıkmaktadır (Hassan ve diğ., 2004; Mazzucotelli ve diğ., 2008).

Proteinlerin oksidatif strese karşı en duyarlı oldukları bölgeleri, sülfidril gruplarıdır. Proteinler, ROS'a karşı lipidlere oranla daha az duyarlıdır ve aminoasit dizilerine

bağlı olarak etkilenmektedirler. Özellikle doymamış bağ ve sülfür içeren moleküllerin ROS ile etkileşimleri fazladır. Bu nedenle yapısında triptofan, tirozin, fenil alanin, histidin, metionin ve sistein gibi aminoasitleri bulunduran proteinler ROS'a karşı daha duyarlıdırlar (Kelly ve diğ., 1998; Sen ve Packer, 2000).

Akhisar 97 ve İzmir Özbaş tütün çeşitlerine ait malondialdehit oluşum oranlarının *in vitro* tuz denemesinde artan NaCl konsantrasyonlarına bağlı olarak her iki çeşitte de arttığı ve meydana gelen bu artışların istatistiksel açıdan anlamlı oldukları belirlendi ($P<0.05$). Akhisar 97 çeşidinde meydana gelen zararlanma oranlarının, İzmir Özbaş çeşidine oranla daha fazla oldukları gözlemlendi. *In vivo* tuz doz denemelerinde gerçekleştirilen lipid peroksidasyon analizi sonuçları da, Akhisar 97 çeşidinin daha hassas olduğunu destekledi.

MDA, çevresel stresler ile artan, plazmalemma ve organel membranlarında hasara yol açan ve lipid peroksidasyonun değerlendirilmesinde önemli bir parametredir (Esfandiari ve diğ., 2007).

Meloni ve diğ.(2003) pamuk bitkisinde NaCl uygulamasının MDA miktarında artışa yol açtığını göstermişlerdir. *A. pinnat* ve *A. filiculoides* bitkileri ile yapılan çalışmada da NaCl uygulamasının MDA miktarında artışa neden olduğu da bildirilmiştir (Masood ve diğ., 2006).

Her iki türde de, *in vitro* tuz uygulamasıyla doz artışına bağlı olarak APX aktivitelerinde artış gözlemlendi. *In vivo* denemede farklılık olarak, 150 mM NaCl konsantrasyonundan daha yoğun stres koşullarında her iki türde de ciddi artış olduğu gözlemlendi. Benzer bulgular, Neto ve diğ.(2006) mısır genotiplerinde, Masood ve diğ.(2006) *Azolla spp'*de yaptıkları çalışmalarda da gözlenmiştir.

In vitro ve *in vivo* denemelerde Akhisar 97 ve İzmir Özbaş tütün çeşitlerinde, tuz stresi altında doza bağlı olarak GPX aktivitesinde bir artış belirlenirken özellikle bu artışın 250 mM NaCl ve üzerinde daha yüksek olduğu gözlemlendi.

Meloni ve diğ. (2003), tuz stresine maruz bıraktıkları pamuk çeşitlerinde, NaCl uygulamasının GPX aktivitesinde artışa neden olduğunu göstermişlerdir.

Koca ve diğ. (2007), yaptıkları çalışmada, 21 gün süreyle 0, 50 ve 100 mM NaCl konsantrasyonlarında sulama yaptıkları susam çeşitlerine ait bitkilerin yapraklarında SOD, CAT, APX, GR ve POX aktivitelerinde artan stres dozuyla orantılı olarak bir artış bildirmişlerdir. Ayrıca artan tuz konsantrasyonuna paralel olarak prolin konsantrasyonunda da artış gözlemişlerdir. Ancak her iki konsantrasyonda da 21. günde SOD aktivitesinde düşüş izlenmiştir.

In vitro ve *in vivo* tuz denemelerinde İzmir Özbaş çeşidinin GR aktivitesinin Akhisar 97 çeşidine göre daha yüksek olduğu ve her iki çeşitte de maruz kalınan NaCl aktivitesinin artmasıyla GR aktivitelerinde artış olduğu görüldü. Askorbat-glutasyon döngüsü, ROS'ların etkisiz hale getirilmesinde oldukça önemli bir basamaktır. Bu yüzden İzmir Özbaş çeşidinde tuzdan etkilenme oranının, Akhisar 97 çeşidine göre daha az olduğu saptandı.

Tuza toleranslı bezelye varyetelerinde de tuza hassas varyetelere göre daha fazla GR aktivitesi saptanmıştır (Hernandez ve diğ., 2000). Meloni ve diğ.(2003), pamuk bitkisinde tuz stresi altında GR aktivitesinde önemli artış saptadıklarını bildirmişlerdir.

Akhisar 97 ve İzmir Özbaş tütün çeşidinde de her iki tuz deneme koşulunda (*in vitro* ve *in vivo*), SOD enzim aktivitesi uygulanan tuz konsantrasyonunun artmasına paralel olarak artış gösterdi.

Masood ve diğ. (2006) yılında iki Azolla çeşidinde yürüttükleri NaCl stres uygulamasının MDA içeriğini arttırdığını göstermişlerdir. Ayrıca artan tuz konsantrasyonuna bağlı olarak, APX ve SOD aktivitelerinde artış gözlediklerini bildirmişlerdir.

Her iki çeşitte de hem *in vitro* hem de *in vivo* tuz denemelerinde NaCl konsantrasyonunun artmasına paralel olarak, CAT aktivitelerinde istatistiksel açıdan anlamlı bir azalış gözlemlendi ($P < 0.05$).

In vitro ve *in vivo* koşullarda gerçekleştirilen tuz doz denemelerinden elde edilen sonuçlar, radyasyona hassas olarak belirlediğimiz Akhisar 97 eşidinin tuz toleransının da, İzmir zbaş'a göre daha az olduğunu gösterdi.

Yapılan istatistiksel analizler sonucunda, *in vitro* ve *in vivo* koşullarda gerçekleştirilen stres denemelerinden elde edilen biyokimyasal verilerin birbirlerini destekledikleri görüldü. Her iki deney koşulunda ve türler arasında antioksidant enzimlerden sadece glutasyon redüktaz enzim aktivitesine ait farklılıkların her iki deney koşulunda istatistiksel açıdan anlamlı olduğu bulundu ($P < 0.05$). Bu nedenle, GR enzim aktivitesi, tuzluluğa toleranslılık açısından markır enzim olarak kullanılabilir.

Neto ve diğ. (2006), mısır bitkisinde tuz stresi altında antioksidan enzim aktivitelerini değerlendirmişlerdir. 100 mM NaCl konsantrasyonu ile uygulanan tuz stresinin, mısır yapraklarında SOD, APX, GPX ve GR enzim aktivitelerinde artışa yol açtığını göstermişlerdir.

Hoque ve diğ. (2008), tütün BY-2 hücrelerinde 200 mM NaCl uygulamasıyla GSH ve GR aktivitelerinde artış gördüklerini bildirmişlerdir.

Esfandiari ve diğ. (2007), buğday fidelerine 10 gün süreyle 50, 100, 150 ve 200 mM NaCl stresi uygulamışlardır. Tuz stresi sonrasında yapılan biyokimyasal analizlerde, lipid peroksidasyon oranı, SOD ve CAT enzim aktivitelerinde bir artış gözlenirken, GR aktivitesinde artan NaCl konsantrasyonuna zıt olarak azalma gözlemişlerdir.

Meloni ve diğ. (2003), Guazuncho ve Pora pamuk çeşitlerini 0, 50, 100 ve 200 mol/m³ NaCl konsantrasyonlarındaki tuz stresine 21 gün süreyle maruz bırakmışlardır. Pora varyetesinde SOD aktivitesinde artış gözlerken, Guazuncho eşidinde önemli bir değişiklik gözlememişlerdir. Pora eşidinde, GR aktivitesindeki ortalama artışın %53 olduğu ve diğer çeşitte değişiklik olmadığını bildirmişlerdir. Çalışmadan elde edilen sonuçlara göre, tuza toleranslı pamuk varyetelerinde, tuz stres altında antioksidan enzim aktivitelerinin artışıyla reaktif oksijen türlerine (ROS) karşı daha iyi bir korunma sağlanabildiğini belirtmişlerdir.

Çalışmamızda, *in vitro* ve *in vivo* denemelerde, kontrol bitkilerinin prolin değerleri karşılaştırıldığında, İzmir Özbaş çeşidinin içsel prolin konsantrasyonu Akhisar 97 çeşidine göre daha yüksek olarak bulundu. Çalışmada kullanılan tuz konsantrasyonlarının artışına paralel olarak her iki çeşitte de prolin konsantrasyonlarında artışlar gözlemlendi. Akhisar 97 tütün çeşidinde 350 mM NaCl'ye maruz kalan bitkilerin yapraklarında aynı doza maruz kalan İzmir Özbaş'tan daha fazla prolin biriktiği gözlemlendi.

Yapılan birçok çalışmada tuz stresi varlığında bitkilerde prolin seviyesinin arttığı bildirilmiştir. Prolin birikiminin, osmoregülasyonun sağlanmasında önemli olduğu bilinmektedir. *Solanum tuberosum* (Martinez ve diğ., 1996), *Beta vulgaris* (Ghoulam ve diğ., 2001), *Brassica juncea* (Madani ve diğ., 1995) ve *alfalfa* (Trinchant ve diğ., 2004) tuzluluk stresi altında prolin seviyelerinde önemli artışlar göstermiştir.

Bitkilerin tuz stresine karşı tolerans kazanmalarında, antioksidant sistemde görevli enzimlerin aktivitesindeki artışlar oldukça önemlidir. Normal gelişim evresindeki hücrelerde de reaktif oksijen türleri üretilmektedir. Hücresel homeostas, bu radikallerin formasyonunu kısıtlamanın yanında, oluşmuş radikallerin yok edilmesini sağlayan mekanizmaları da içermektedir. Bu sistem, hücre stressiz ortamda iken düzenli bir mekanizma ile işlemektedir. Ancak, hücre stres altında iken sistemin regülasyonunda karışıklıklar oluşmaktadır. Bitkiler, streslere, antioksidant enzimleri ve diğer tüm elemanları ile, savunma sistemi aktif oksijen türlerini yok etmeyi tamamiyle başaramadığı durumlarda tepki vermekteler (Yokoi ve diğ., 2002; Türkan ve Demiral, 2009).

Tuz stresi altında oluşan morfolojik zararlanmalar değerlendirildiğinde ve biyokimyasal analizler göz önünde bulundurularak, seleksiyon için kullanılacak olan NaCl konsantrasyonunun 250 mM olduğu bulundu.

A.thaliana bitkisinde 200 mM, *Oryza sativa*'da 300 mM, *N.tabacum* L. bitkisinde 200 mM (Umezawa ve diğ., 2006), buğdayda 150 mM NaCl (Munns ve diğ., 2006), şeker kamışında 171 mM NaCl (Patade ve diğ., 2006) konsantrasyonlarında gelişim gösteren tuza toleranslı bitkiler geliştirilmiştir.

M₂ generasyonuna ait tek bitki hasadı yapılarak toplanan 1900 adet bitkiye ait tohumdan 1500 tanesinin perlit ortamında 250 mM NaCl içeren besin solüsyonu ile sulanarak gelişimleri kontrol edildi ve tuza toleranslı bireyler M₃ generasyonunda tespit edildi. *In vivo* tuz seleksiyonunda, 250 mM NaCl'ye toleranslı olarak 103 adet bitki belirlendi. Bu bitkilerin daha sonra *in vitro* koşullarda tekrar tuzluluğa toleransları kontrol edildi ve 10 adet mutant bitki tuza toleranslı olarak seçildi. Seçilen bitkilerin 5 tanesi Akhisar 97 çeşidine ve 5 tanesi de İzmir Özbaş çeşidine aittir. Akhisar 97 çeşidine ait belirlenen mutantlardan 2 tanesi 100 Gy, 2 tanesi 200 Gy, 1 tanesi de 300 Gy gama radyasyon dozu ile ışınlama sonucunda, İzmir Özbaş çeşidine ait mutantlarda ise, 3 tanesi 100 Gy, 1 tanesi 200 Gy ve 1 tanesi de 300 Gy radyasyon dozu ile ışınlanan tohumlara aittir. Tuz seleksiyonunda özellikle, 100 ve 200 Gy'lik dozlarda seçilen mutant sayısı daha fazladır.

Bu mutant bitkilerin yapraklarında tuzluluğa toleransta *bir* markır olarak düşünülen GR enzim aktiviteleri belirlendi. Kontrol bitkilerine göre mutantlarda oldukça yüksek enzim aktiviteleri saptandı. Akhisar çeşidine ait mutantlardan 1.3 numaralı bitki, 0.0322 µmol NADPH/min mg TA aktivite gösterdi. İzmir Özbaş çeşidine ait olan 3.25 numaralı mutant bitki ise kendi grubunda 0.0411 µmol NADPH/min mg TA ile en yüksek aktiviteyi gösterdi.

250 mM NaCl'ye toleranslı olarak seçilen 10 adet mutant bitkinin genomik DNA analizleri gerçekleştirildi. Mutant bitkilerin kontrol bitkileri ile olan farklılıkları, analizde kullanılan primerlere bağlı olarak ortaya konmuş olup, genetik uzaklıkları çizilen dendrogramlar ile gösterildi.

Çalışmamızda Akhisar 97 ve İzmir Özbaş tütün çeşitlerine (*Nicotiana tabacum* L.) ait tuza toleranslı mutant bitkiler ile kontrol bireyleri arasındaki farklılıkları DNA düzeyinde ortaya koymak amacıyla, rastgele primerler kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonuna dayanan moleküler markör tekniği olan RAPD tekniği kullanıldı. Bu yöntem, diğer metodlara göre daha ucuz ve uygulanabilirliğinin kolay olması nedeniyle tercih edilmektedir (Kumar, 1999; Upadhyay ve diğ., 2004; Gale, 2005).

Araştırmalarda, uygulanan fizyolojik etmenlerin bitki eşitleri arasında oluşturdukları polimorfizm RAPD metodu kullanılarak etkili bir şekilde tespit edilebilmektedir (Kumar 199; Upadhyay ve diğ., 2004; Gale 2005).

Akhisar 97 tütün çeşidine ait olan 1.1, 1.3, 1.10 mutant bitkilerinin kontrol bitkisine olan genetik uzaklıkları %33 iken, 1.11 numaralı mutantın %35, 1.17 numaralı mutantında kontrole %23 oranında genetik uzaklığa sahip olduğu saptandı. İzmir Özbaş çeşidine ait 3.3, 3.4, 3.25, 3.26 ve 3.31 numaralı mutant bitkilerin kontrole olan genetik uzaklıkları sırasıyla %25, %43, %39, %39 ve %33 olarak bulundu.

Çalışmada kullanılan 5 primer ile toplam 23 bant elde edilmiş olup, bu bantların 17 tanesi polimorfik olarak belirlendi.

Sonuç olarak,

Çalışmamızda kullandığımız çeşitlerden Akhisar 97, İzmir Özbaş'a göre radyasyona ve tuzluluğa karşı daha hassastır.

Tüm antioksidant enzimler arasında sadece glutasyon redüktaz enzim aktivitesindeki *in vitro* ve *in vivo* denemelerdeki ve kullanılan tütün eşitleri arasındaki farklılıkların, istatistiksel açıdan anlamlı olması, GR'nin tuzluluk toleransında tanımlayıcı bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir.

Tuza toleranslı 10 adet mutant bitki seçildi.

Mutant bitkilerin, GR aktivitelerinin kontrollerine göre arttığı görüldü.

Gama radyasyonu teşviki ile Akhisar 97 ve İzmir Özbaş tütün (*Nicotiana tabacum* L.) bitkilerine ait kontrol ve tuza toleranslı mutant bitkiler arasındaki farklılıkları saptamak amacıyla RAPD-PZR yönteminde kullandığımız 5 primere göre polimorfizm oranı % 73.91 olarak belirlendi. Tuzluluğa toleranslı mutant bitkilerin kontrol bitkilerine olan uzaklıkları POPGENE programı kullanılarak hesaplandı ve dendrogramları çizildi. Akhisar 97 ve İzmir Özbaş tütün çeşitlerinde tuza toleranslı olarak seçilen ve en fazla

genetik uzaklığa sahip olan iki mutantın 100 Gy'lik gama radyasyon dozu ile ışınılandıkları belirlendi.

KAYNAKLAR

ADAMS, P., THOMAS, J.C., VERNON, D.M., BOHNERT, H.J., JENSEN, R.G., 1992, Distinct cellular and organismic responses to salt stress. *Plant Cell Physiology*, 33, 1215-1223.

AHLOOWALIA, B.S., MALUSZYNSKI, M., 2001, Induced mutations-A new paradigm in plant breeding, *Euphytica*, 118, 167-173.

AHLOOWALIA, B.S., MALUSZYNSKI, O., NICTERLEIN, K., 2004, Global impact of mutation-derived varieties, *Euphytica*, 135, 187-204.

AL-RUMAIH, M.M., AL-RUMAIH, M.M., 2008, Influence of ionizing radiation on antioxidant enzymes in three species of *Trigonella*, *American Journal of Environmental Sciences*, 4(2), 151-156.

ALIKAMANOGLU, S., ATAK, Ç., 1994, Radiosensitivity in callus tissues of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill), *Turkish Journal of Nuclear Sciences*, 21(2), 95-103.

ALIKAMANOGLU, S., 1999, *In vitro* tekniklerle haploid şeker pancarı (*Beta vulgaris* L.) bitkisinin eldesi ve somatik mutasyonların oluşturulmasında gama radyasyonun kullanılması, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.

APEL, K., HIRT, H., 2004, Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction, *Annual Review of Plant Biology*, 55, 373-399.

APSE, M.P., BLUMWALD, E., 2002, Engineering salt tolerance in plants, *Current Opinion in Biotechnology*, 13, 146-150.

ARNON, D.I., 1949, Copper enzymes in isolated chloroplasts polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*, *Plant Physiology*, 4, 1-15.

ASHRAF, M., 2004, Some important physiological selection criteria for salt tolerance in plants, *Flora*, 199, 361-376.

ASHRAF, M., BASHIR, A., 2003, Salt stress induced changes in some organic metabolites and ionic relations in nodules and other plant parts of two crop legumes differing in salt tolerance, *Flora*, 198, 486-498.

ASHRAF, M., AKRAM, N.A., 2009, Improving salinity tolerance of plants through conventional breeding and genetic engineering: An analytical comparison, *Biotechnology Advances*, 27, 744-752.

ATAK, Ç., 1991, Gama ışınları ile ışınlanan soyada (*Glycine max* (L.) Merrill) klorofil mutasyonu, *Journal of Biology- Faculty of Science and Arts Gazi University*, 2, 321-330.

ATAK, C, ALIKAMANOĞLU, S., YALCIN, S., 1999, Induced mutation and radiation sensitivity *in vitro* culture of soybean (*Glycine max* L. Merrill), *Turkish Journal of Nuclear Sciences*, 26(2), 69-88.

ATAK, Ç., ALIKAMANOĞLU, S., ACIK, L., CANBOLAT, Y., 2004, Induced of plastid mutations in soybean plant (*Glycine max* L. Merrill) with gamma radiation and determination with RAPD, *Mutation Research*, 556, 35-44.

BADAWI, G.H., YAMAUCHI, Y., SHIMADA, E., SASAKI, R., KAWANO, N., TANAKA, K., TANAKA, K., 2004, Enhanced tolerance to salt stress and water deficit by overexpressing superoxide dismutase in tobacco (*Nicotiana tabacum*) chloroplasts, *Plant Science*, 166, 919-928.

BANU, N.A., HOQUE, A., WATANABE-SUGIMOTO, M., MATSUOKA, K., NAKAMURA, Y., SHIMOISHI, Y., MURATA, Y., 2009, Proline and glycinebetain induce antioxidant defense gene expression and suppress cell death in cultured tobacco cells under salt stress, *Journal of Plant Physiology*, 166(2): 146-156.

BAŞER, İ., BILGIN, O., KORKUT, K.Z., BALKAN, A., 2007, Makarnalık buğdayda mutasyon ıslahı ile bazı kantitatif karakterlerin geliştirilmesi. *Tarım Bilimleri Dergisi* 13(4), 346-353.

BATES, L.S., WALDREN, R.P., TEARE, I.D., 1973, Rapid determination of free proline for water-stress studies, *Plant Soil*, 39, 205-207.

BEAUCHAMP, C. AND FRIDOVICH I., 1971, Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels, *Analytical Biochemistry*, 44, 276-287.

BELTAGI, M.S., ISMAIL, M.A., MOHAMED, F.H., 2006, Induced salt tolerance in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by gamma irradiation, *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 9(6), 1143-1148.

BERENSCHOT, A.S., ZUCCHI, M.I., NETO, A.T., QUCCINI, V., 2008, Mutagenesis in *Petunia x hybrida* Vilm. And isolation of a novel morphological mutant, *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 20(2), 95-103.

BERGMEYER, M., 1970, Methoden der enzymatischen Analyse, Vol.1 Akademie Verlag, Berlin, pp. 636-647.

BOUGHANMI, N., MICHONNEAU, P., DAGHFOUS, D., FLEURAT-LESSARD, P., 2005, Adaptation of *Medicago sativa* cv. Gabès to long-term NaCl stress, *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 168, 262-268.

BRADFORD, M.M., 1976, A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.

BRANCH, W.D., 2002, Variability among advanced gamma-irradiation induced large-seeded mutant breeding lines in the "Georgia Browne" peanut cultivar, *Plant Breeding*, 121, 275-277.

BRIGGS, R.W., CONSTANTIN, M.J., 1977, Radiation types and radiation sources. Manual on Mutation Breeding. Technical Reports Series N: 19, International Atomic Energy Agency, Vienna, pp 7-20.

CALLJAS, C., OCHANDO, M.D., 2002, Phylogenetic relationships among Spanish *Barbus* species (Pisces, Cyprinidae) shown by RAPD markers, *Heredity*, 89, 36-43.

CHEN, H., AN, R., TANG, J.H., CUI, X.H., HAO, F.S., CHEN, J., WANG, X.C., 2007, Over-expression of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter gene improves salt tolerance in an upland rice, *Molecular Breeding*, 19, 215-225.

CHEONG, M.S., YUN, D.J., 2007, Salt stress signalling, *Journal of Plant Biology*, 50(2), 148-155.

CHEW, V., 1976, Uses and abuses of Duncan's multiple range test, *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, 89, 251-253.

ÇİFTÇİ, C.Y., TURKAN, A.D., KHAWAR, K.M., ATAK, M., OZCAN, S., 2006, Use of gamma rays to induce mutations in four pea (*Pisum sativum* L.) cultivars, *Turkish Journal of Biology*, 30, 29-37.

CONGER, B.V., KONZAK, C.F., NILAN, R.A., 1977, Radiation sensitivity and modifying factors. Manual on Mutation Breeding. Technical Reports Series N: 19, International Atomic Energy Agency, Vienna, pp 40-43.

CONSTANTINOVICI, M., OANCEA, D., ZAHARESCU, T., 2009, Gamma irradiation effect on the enzymatic activities of horseradish and apple peroxidases, *Radiation Physics and Chemistry*, 78, 33-36.

DANYLCHENKO, O., SOROCHINSKY, B., 2005, Use of RAPD assay for the detection of mutation changes in plant DNA induced by UV-B and γ -rays, *BMC Plant Biology*, 5 (Supp 1): S9.

DARDENIZ, A., MÜFTÜOĞLU, N.M., ALTAY, H., 2006, Determination of salt tolerance of some American grape rootstocks, *Bangladesh Journal of Botany*, 35(2), 143-150.

DAS, A., GOSAL, S.S., SIDHU, J.S., DHALIWAL, H.S., 2000, Induction of mutations for heat tolerance in potato by using *in vitro* culture and radiation, *Euphytica*, 114, 205-209.

DHALIWAL, H.S., YEUNG, E.C., THORPE, T.A., 2004, TIBA inhibition of *in vitro* organogenesis in excised tobacco leaf explants, *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 40, 235-238.

DOYLE, J.J., DOYLE, J.L., 1987, DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue, *Phytochemical Bulletin*, 19, 11-15.

DUROVIĆ, B., SELAKOVIĆ, V., SPASIĆ-JOKIĆ, V., 2004, Does occupational exposure to low-dose ionizing radiation induce cell membrane damage?, *Archive of Oncology*, 12(4), 197-199.

EDREVA, A., 2005, Generation and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts: a submolecular approach, *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 106, 119-133.

ESFANDIARI, E., SHEKARI, F., SHEKARI, F., ESFANDIARI, M., 2007, The effect of salt stress on antioxidant enzymes' activity and lipid peroxidation on the wheat seedling, *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 35(1), 48-56.

FAROOQ, S., AZAM, F., 2002, Molecular markers in plant breeding-II. Some prerequisites for use, *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 5(10), 1141-1147.

FERREIRA, A.R., KEIM, P., 1997, Genetic mapping of Soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] using random amplified polymorphic DNA (RAPD), *Plant Molecular Biology Reporter*, 15, 335-354.

FOYER C., HALLIWELL B., 1976, The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism, *Planta*, 133, 21-25.

FU, Y.X., 1996, New statistical tests of neutrality for DNA samples from a population, *Genetics*, 143, 557-570.

FUKUDA, A., NAKAMURA, A., TAGIRI, A., TANAKA, H., MIYAO, A., HIROCHIKA, H., TANAKA, Y., 2004, Function, intracellular localization and the importance in salt tolerance of a vacuolar Na^+/H^+ antiporter from rice, *Plant and Cell Physiology*, 45, 146-159.

GALE, K.R., 2005, Diagnostic DNA markers for quality traits in wheat, *Journal of Cereal Science*, 41, 181-192.

GAAFAR, R.M., SAKER, M.M., 2006, Monitoring of cultivars identity and genetic stability in strawberry varieties grown in Egypt, *World Journal of Agricultural Sciences*, 2(1), 29-36.

GAXIOLA, R.A., LIU, J., UNDURRAGA, S., DANG, L.M., ALLEN, G.J., ALPER, S.L., FINK, G.R., 2001, Drought- and salt-tolerant plants results from overexpression of the AVP1 H^+ -pump, *PNAS*, 98(20), 11444-11449.

GHOULAM, C., FORES, K., 2001, Effect of salinity on seed germination and early seedling growth of sugarbeet (*Beta vulgaris* L.), *Seed Science Technology*, 29, 357-364.

GIMÉNEZ, C., GARCIA, E.D., ENRECH, N.X.D., BLANCA, I., 2001, Somaclonal variation in banana: cytogenetic and molecular characterization of the somaclonal variant Cien BTA-03, *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 37, 217-222.

GOMES-FILHO, E., SODEK, L., 1998, Effect of salinity on ribonuclease activity of *Vigna unguiculata* cotyledons during germination, *Journal of Plant Physiology*, 132, 307-311.

GOSTIMSKY, S.A., KOKAEVA, Z.G., KONOLAV, F.A., 2005, Studying plant genome variation using molecular markers, *Russian Journal of Genetics*, 41(4), 378-388.

GÜBBÜK, H., PEKMEZCI, M., 2001, Değişik muz klonları arasındaki genetik varyasyonların RAPD markörleri ile belirlenmesi, *Bahçe*, 30(1-2), 71-79.

HASEGAWA, P.M., BRESSAN, R.A., ZHU, J.K., BOHNERT, H.J., 2000, Plant Cellular and Molecular Responses To High Salinity, *Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology*, 51, 463-499.

HASSAN, N.M., SERAG, M.S., EL-FEKY, F.M., 2004, Changes in nitrogen content and protein profiles following *in vitro* selection of NaCl resistant mung bean and tomato, *Acta Physiologiae Plantarum*, 26(2), 165-175.

HAYASHI, H., MURATA, N., 1998, Genetically Engineered Enhancement of Salt Tolerance in Higher Plants, In: Sato, K., Murata, N. (Ed.), *Stress Response of Photosynthetic Organisms: Molecular Mechanisms and Molecular Regulation*, Elsevier, Amsterdam, pp., 133-148.

HERNÁNDEZ, J.A., JIMÉNEZ, A., MULLINEAUX, P., SEVILIA, F., 2000, Tolerance of pea (*Pisum sativum* L.) to long-term salt stress is associated with induction of antioxidant defences, *Plant, Cell & Environment*, 23(8), 853-862.

HEWAWASAM, W.D.C.J., BANDAR, D.C., ABERATHNE, W.M., 2004, New phenotypes of *Crossandra infundibuliformis* var. *Danica* through *in vitro* culture and induced mutations, *Tropical Agriculture Research*, 16, 253-270.

HIRT, H., SHINOZAKI, K., 2004, *Topics in Current Genetics: Plant Responses to Abiotic Stress*. (eds.) Springer.

HMIDA-SAYARI, A., GARGOURI-BOUZID, R., BIDANI, A., JAOUA, L., SAVOURÉ, A., JAOUA, S., 2005, Overexpression of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate

synthetase increases proline production and confers salt tolerance in transgenic potato plants, *Plant Science*, 169, 746-752.

HOFFMANN, C.M., 2010, Sucrose accumulation in sugar beet under drought stress, *Journal of Agronomy and Crop Science*, 1-10.

HONG-BO, S., LI-YE, C., MING-AN, S., JALEEL, C.A., HONG-MEI, M., 2008, Higher plant antioxidants and redox signaling under environmental stress, *C.R. Biologies*, 331, 433-441.

HOQUE, A., BANU, N.A., NAKAMURA, Y., SHIMOISHI, Y., MURATA, Y., 2008, Proline and glycinebetine enhance antioxidant defense and methylglyoxal detoxification systems and reduce NaCl-induced damage in cultured tobacco cells, *Journal of Plant Physiology*, 165, 813-824.

HOSSAIN, Z., MANDAL, A.K.A., DATTA, S.K., BISWAS, A.K., 2006, Development of NaCl-tolerant strain in *Chrysanthemum morifolium* Ramat. through *in vitro* mutagenesis, *Plant Biology*, 8, 450-461.

HOSSAIN, Z., MANDAL, A.K.A., DATTA, S.K., BISWAS, A.K., 2007, Development of NaCl-tolerant line in *Chrysanthemum morifolium* Ramat. through shoot organogenesis of selected callus line, *Journal of Biotechnology*, 129, 658-667.

Tobacco growing in Victoria

<http://www.alpinelink.com.au/tobaccoproduction/index.shtml>

[Ziyaret Tarihi: 2 Haziran 2010].

IAEA, 2009, International Atomic Energy Agency Nuclear Technology Review, Vienna, <http://www.iaea.org/Publications/Reports/ntr2009.pdf>

[Ziyaret Tarihi: 20 Mayıs 2010].

JALEEL, C.A., MANIVANNAN, P., LAKSHMANAN, G.M.A., SRIDHARAN, R., PANNEERSELVAM, R., 2007, NaCl as a physiological modulator of proline

metabolism and antioxidant potential in *Phyllanthus amarus*, *C.R. Biologies*, 330, 806-813.

JENKS, M.A., HASEGAWA, P.M., 2005, Plant Abiotic Stress, Roberts J.A.(ed), Blackwell Publishing.

JENKS, M.A., WOOD, A.J., 2010, Genes for Plant Abiotic Stress, Wiley-Blackwell Publication.

KANBER, R., KIRDA, C., TEKINE, O., 1992, Sulama suyu niteliği ve sulamada tuzluluk sorunları. Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Genel Yay. No: 21, Ders Kitapları Yay. No:6, Adana, 341 s.

KELLY, S.A., HAVRILLA, C.M., BRADY, T.C., ABREVO, K.H., LEVIN, E.D., 1998, Oxidative stress in toxicology: established mammalian and emerging piscine model systems, *Environmental Health Perspectives*, 106, 1-24.

KHAN, I.A., AWAN, F.S., AHMAD, A., KHAN, A.A., 2004, A modified mini-prep method for economical and rapid extraction of genomic DNA in plants, *Plant Molecular Biology Reporter*, 22, 89a-89e.

KHAN, M.A., WITZKE-EHBRECHT, S., MAASS, B.L., BECKER, H.C., 2009, Relationships among different geographical groups, agro-morphology, fatty acid composition and RAPD marker diversity in Safflower (*Carthamus tinctorius*), *Genetic Resources and Crop Evolution*, 56, 19-30.

KIONG, A.L.P., LAI, A.G., HUSSEIN, S., HARUN, A.R., 2008, Physiological responses of *Orthosiphon stamineus* plantlets to gamma irradiation, *American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture*, 2(2),135-149.

KOCA, H., BOR, M., OZDEMIR, F., TURKAN, I., 2007, The effect of salt stress on lipid peroxidation, antioxidative enzymes and proline content of sesame cultivars, *Environmental and Experimental Botany*, 60, 344-351.

KULKARNI, M., DESHPANDE, U., 2006, RAPD based fingerprinting of tomato genotypes for identification of mutant and wild cherry specific markers, *Journal of Plant Sciences*, 1(3), 192-200.

KUMAR, L.S., 1999, DNA markers in plant improvement: An overview, *Biotechnology Advances*, 17, 143-182.

KUŞVURAN, S., S. ELLIALTIOGLU, YAŞAR F., ABAK K., 2007, Effects of Salt Stress on Ion Accumulations and Some of the Antioxidant Enzymes Activities in Melon (*Cucumis melo* L.), *International Journal of Food, Agriculture and Environment*, 5 (2), 351-354.

KUZNETSOVA, O.I., ASH, O.A., HARTINA, G.A., GOSTIMSKIJ, S.A., 2005, RAPR and ISSR analyses of regenerated pea *Pisum sativum* L. plants, *Russian Journal of Genetics*, 41(1), 60-65.

KWIATOWSKY, J., 1998, Salinity Classification, Mapping and Management in Alberta.

LAMSEEJAN, S., JOMPUK, P., WONGPIYASATID, A., DEESEPAN, S., KWANTHAMMACHART, P., 2000, Gamma-rays induced morphological changes in Chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*), *Kasetsart Journal (Natural Science)*, 34, 417-422.

LASCANO, H.R., MELCHIORRE, M.N., LUNA, C.M., TRIPPI, V.S., 2003, Effect of photooxidative stress induced by paraquat in two wheat cultivars with differential tolerance to water stress, *Plant Science*, 164, 841-848.

LEE, I.S., KIM, D.S., LIM, Y.P., LEE, K.S., SONG, H.S., LEE, Y.I., 2003, Generation and performance evaluation of salt tolerant mutants in rice, *Sabrao Journal of Breeding and Genetics*, 35(2), 93-102.

- LEE, Y.P., KIM, S.H., BANG, J.W., LEE, H.S., KWAK, S.S., KWON, S.Y., 2007, Enhanced tolerance to oxidative stress in transgenic tobacco plants expressing three antioxidant enzymes in chloroplasts, *Plant Cell Reports*, 26, 591-598.
- LI, B., HUANG, W., BASS, T., 2003, Shoot production per responsive leaf explant increases exponentially with explant organogenic potential in *Nicotiana* species, *Plant Cell Reports*, 22, 231-238.
- LING, A.P.K., CHIA, J.Y., HUSSEIN, S., HARUN, A.R., 2008, Physiological responses of *Citrus sinensis* to gamma irradiation, *World Applied Sciences Journal*, 5(1), 12-19.
- LIU, J., ZHU, J.K., 1997, Proline accumulation and salt-stress-induced gene expression in a salt-hypersensitive mutant of *Arabidopsis*, *Plant Physiology*, 114, 591-596.
- MA, S.Y., WU, W.H., 2007, AtCPK23 functions in *Arabidopsis* responses to drought and salt stresses, *Plant Molecular Biology*, 65(4), 511-518.
- MADANI S., NAINAWATEE, H.S., JAIN, R.K., CHOWDHURY, J.B., 1995, Proline and proline metabolising enzymes in *in-vitro* selected NaCl-tolerant *Brassica juncea* L. under salt stress, *Annals of Botany*, 76, 51-57.
- MADHAVA RAO, K.V., STRESTY, T.V.S., 2000, Antioxidative parameters in the seedlings of pigeonpea (*Cajanus cajan* L. Millspaugh) in response to Zn and Ni stresses, *Plant Science*, 157, 113-128.
- MAHAJAN, S., PANDEY, G.K., TUTEJA, N., 2008, Calcium- and salt-stress signalling in plants: Shedding light on SOS pathway, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 471, 146-158.
- MANCHANDA, G., GARG, N., 2008, Salinity and its effects on the functional biology of legumes, *Acta Physiologica Plantarum*, 30, 595-618.

MARTINEZ, C.A., MAESTRI, M., LANI, E.G., 1996, *In vitro* salt tolerance and proline accumulation in andean potato (*Solanum* spp.) differing in frost resistance, *Plant Science*, 116, 117-184.

MASOOD, A., SHAH, N.A., ZEESHAN, M., ABRAHAM, G., 2006, Differential response of antioxidant enzymes to salinity stress in two varieties of *Azolla* (*Azolla pinnata* and *Azolla filiculoides*), *Environmental and Experimental Botany*, 58, 216-222.

MAZZUCOTELLI, E., MASTRANGELO, A.M., CROSATTI, C., GUERRA, D., STANCA, A.M., CATTVELLI, L., 2008, Abiotic stress response in plants: When post-transcriptional and post-translational regulations control transcription, *Plant Science*, 174, 420-431.

MELONI, D.A., OLIVA, M.A., MARTINEZ, C.A., CAMBRAIA, J., 2003, Photosynthesis and activity of superoxide dismutase, peroxidase and glutathione reductase in cotton under salt stress, *Environmental and Experimental Botany*, 49, 69-76.

MISRA, N., GUPTA, A.K., 2005, Effect of salt stress on proline metabolism in two high yielding genotypes of green gram, *Plant Science*, 169, 331-333.

MITTLER, R., VANDERAUWERA, S., GOLLERY, M., BREUSEGEM, F.V., 2004, Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance, *Trends in Plant Science*, 9(10), 490-498.

MONTALVÁN, R., ANDO, A., 1998, Effect of gamma-radiation and sodium azide on quantitative characters in rice (*Oryza sativa* L.), *Genetics and Molecular Biology*, 21(1), 1-10.

MOUD, A., MAGHSOUDI, K., 2008, Salt stress effects on respiration and growth of germinated seeds of different wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars, *World Journal of Agricultural Sciences*, 4(3), 351-358.

MULLER, H.J., 1927, The production of mutations by X-rays, *Zoölogy*, 14, 714-726.

MUNNS, R., RAWSON, H.M., 1999, Effect of salinity on salt accumulation and reproductive development in the apical meristem of wheat and barley, *Australian Journal of Plant Physiology*, 26, 459-464.

MUNNS, R., 2002, Comparative physiology of salt and water stress, *Plant Cell & Environment*, 25, 239-250.

MUNNS, R., JAMES, R.A., LÄUCHLI, A., 2006, Approaches to increasing the salt tolerance of wheat and other cereals, *Journal of Experimental Botany*, 57(5), 1025-1043.

NAKAMURA, I., MURAYAMA, S., TOBITA, S., BONG, B.B., YANAGIHARA, S., ISHIMINE, Y., KAWAMITSU, Y., 2002, Effect of NaCl on the photosynthesis, water relations and free proline accumulation in the wild *Oryza* Species, *Plant Production Science*, 5(4), 305-310.

NAKANO, Y. ASADA, K., 1981, Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts, *Plant and Cell Physiology*, 22, 867-880.

NEI, M., MARUYAMA, T., WU, C., 1983, Models of evolution of reproductive isolation, *Genetics*, 103, 557-579.

NETO, A.D.A., PRISCO, J.T., ENÉAS-FILHO, J., LACERDA, C.F., SILVA, J.V., COSTA, P. H.A., GOMES-FILHO, E., 2004, Effects of salt stress on plant growth, stomatal response and solute accumulation of different maize genotypes, *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 16(1), 31-38.

NETO, A.D., PRISCO, J.T., ENÉAS-FILHO, J., ABREU, C.E.B., 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.

OMAR, M.S., YOUSIF, D.P., AL-JIBOURI, A.J.M., AL-RAWI, M.S., HAMEED, M.K., 1993, Effects of gamma rays and sodium chloride on growth and cellular constituents of sunflower (*Helianthus annuus* L.) callus cultures, *Journal of Islamic Academy of Sciences*, 6(1), 69-72.

ÖNCEL, İ., KELEŞ, Y., 2002, Tuz stresi altındaki buğday genotiplerinde büyüme, pigment içeriği ve çözümler madde kompozisyonunda değişimler, *C.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi Fen Bilimleri Dergisi*, 23(2), 8-16.

ÖZALPAN, A., 2001, Temel Radyobioloji. Haliç Üniversitesi Yayınları. Orkide Matbaası.

ÖZBEK, N., ATAK, Ç., 1984, Mutagenic efficiency of gamma irradiation in two soybean varieties, *Turkish Journal of Nuclear Sciences*, 11(1), 43-51.

ÖZBEK, N., ATILLA, A.S., SAĞEL, Z., ATAK, Ç., 1990, Radiation induced mutations for yield and oil content in soybean (*Glycine max* (L) Merrill), *Turkish Journal of Nuclear Sciences*, 17(1-2), 49-57.

PARIDA, A.K., DAS, A.B., 2004 a, Effects of NaCl stress on nitrogen and phosphorous metabolism in a true mangrove *Bruguiera parviflora* grown under hydroponic culture, *Journal of Plant Physiology*, 161, 921-928.

PARIDA, A.K., DAS, A.B., MITTRA, B., 2004 b, Effects of salt on growth ion accumulation photosynthesis and leaf anatomy of the mangrove, *Bruguiera parviflora*, *Trees-Structure and Function*, 18, 167-174.

PATADE, V.Y., SUPRASANNA, P., BAPAT, V.A., KULKARNI, U.G., 2006, Selection for abiotic (salinity and drought) stress tolerance and molecular characterization of tolerant lines in sugarcane, *Bhabha Atomic Research Centre Newsletter*, 273, 244-256.

PEKSÜSLÜ, A., GENCER, S., 2002, Tütün Tarımı, E.T.A.E. YayınNo: 105. Menemen /İZMİR

PESSARAKLI, M., 1999, Handbook of Plant and Crop Stress. (Ed.), Taylor&Francis.

PINTO, E., SIGAUD-KUTNER, T.C.S., LEITÃO, M.A.S., OKAMOTO, O.K., MORSE, D., COLEPICCOLO, P., 2003, Heavy metal-induced oxidative stress in algae, *Journal of Phycology*, 39, 1008-1018.

PREDIERI, S., DI VIRGILIO, N., 2007, *In vitro mutagenesis and mutant multiplication* In: S. Mohan Jain, H.Haggman. Protocols for Micropropagation of Woody Trees and fruits: Springer Publishers 323-324.

PROCHAZKOVA, D., SAIRAM, R.K., SRIVASTAVA, G.C., SINGH, D.V., 2001, Oxidative stress and antioxidant activity as the basis of senescence in maize leaves, *Plant Science*, 161, 765-771.

PUCHOOA, D., 2005, *In vitro* mutation breeding of Anthurium by gamma radiation, *International Journal of Agriculture & Biology*, 7(1): 11-20.

RAHNAMA, H., EBRAHIMZADEH, H., 2004, The effect of NaCl on proline accumulation in potato seedlings and calli, *Acta Physiologiae Plantarum*. 26, 263-270.

RAZAVIZADEH, R., EHSANPOUR, A.A., AHSAN, N., KOMATSU, S., 2009, Proteome analysis of tobacco leaves under salt stress, *Peptides*, 30, 1651-1659.

REDDY, A.R., CHAITANYA, K.V., VIVEKANANDAN, M., 2004, Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants, *Journal of Plant Physiology*, 161, 1189-1202.

REJILI, M., TELAHIGUE, D., LACHIHEB, B., MRABET, B.L., FERCHICHI, A., 2008, Impact of gamma radiation and salinity on growth and K⁺/Na⁺ balance in two

populations of *Medicago sativa* (L.) cultivar Gabès, *Progress in Natural Science*, 18, 1095-1105.

RILEY, P.A., 1994, Free Radicals in Biology: Oxidative Stress and the Effects of Ionizing Radiation, *International Journal of Radiation Biology*, 65(1), 27-33.

SALEKI, R., YOUNG, P.G., LEFEBVRE, D.D., 1993, Mutants of *Arabidopsis thaliana* capable of germination under saline condition, *Plant Physiology*, 101, 839-845.

SARIOĞLU, M., 1976, Tütünlerin kalite nitelikleri. Tekel Genel Müdürlüğü, 40 EAG/DKY 12, İstanbul.

SAYED, O.E.E., RIZKALLA, A.A., SABRI, S.R.S., 2007, *In vitro* mutagenesis for genetic improvement of salinity tolerance in wheat, *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 4(5), 377-383.

SCEBBA, F., SEBASTIANI, L., VITAGLIANO, C., 2001, Activities of antioxidant enzymes during senescence of *Prunus armeniaca* leaves, *Biologia Plantarum*, 44, 41–46.

SCHWIMMER, S., BURR, H.K., HARRINGTON, W.O., WESTON, W.J., 2008, Gamma irradiation of potatoes: Effects on sugar content, chip color, germination, greening, and susceptibility to mold. *American Journal of Potato Research*, 31-41.

SEN, C.K., PACKER, L., 2000, Thiol homeostasis and supplements in physical exercise, *American Journal of Clinical Nutrition*, 72, 653-669.

SHANNON M.C., GRIEVE C.M., FRANCOIS L.E., 1994, Whole plant response to salinity, In: Wilkinson, R.E. (Ed.), *Plant-Environment Interactions*. Marcel Dekker, New York, pp. 199-244.

SHANNON, M.C. 1996, New insights in plant breeding efforts for improved salt tolerance, *Hort Technology*, 6, 96-99.

SHANNON, M.C., GRIEVE, C.M., 1999, Tolerance of vegetable crops to salinity, *Scientia Horticulturae*, 78, 5-38, 1999.

SHARMA, Y.K., DAVIS, K.R., 1997, The effects of ozone on antioxidant responses in plants, *Free Radical Biology & Medicine*, 23(3), 480-488.

SHI, H., ZHU, J.K., 2002. Regulation of expression of the vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter gene AtNHX1 by salt stress and ABA, *Plant Molecular Biology*, 50, 543-550.

SHI, Q., LI, C., ZHANG, F., 2006, Nicotine synthesis in *Nicotiana tabacum* L. induced by mechanical wounding is regulated by auxin, *Journal of Experimental Botany*, 57(11), 2899-2907.

SIGURBJÖRNSSON, B., 1977, Introduction: Mutations in Plant-Breeding Programmes. Manual on Mutation Breeding. Technical Reports Series N: 19, International Atomic Energy Agency, Vienna, pp 1-5.

SILVA-ORTEGA, C., OCHOA-ALFARO, A.E., REYES-AGÜERO, J.A., AGUADO-SANTACRUZ, G.A., JIMÉNEZ-BREMONT, J.F., 2008, Salt stress increases the expression of *p5cs* gene and induces proline accumulation in cactus pear, *Plant Physiology and Biochemistry*, 46, 82-92.

SKOPELITIS, D.S., PARANYCHIANAKIS, N.V., PASCHALIDIS, K.A., PLIAKONIS, E.D., DELIS, I.D., YAKOUMAKIS, D.I., KOUVARAKIS, A., PAPADAKIS, A.K., STEPHANOU, E.G., ROUBELAKIS-ANGELAKIS, K.A., 2006, Abiotic stress generates ROS that signal expression of anionic glutamate dehydrogenases to form glutamate for proline synthesis in tobacco and grapevine, *The Plant Cell*, 18, 2767-2781.

SLATER, A., SCOTT, N.W., FOWLER, M.R., 2004, *Plant Biotechnology*, The genetic manipulation of plants. Oxford University Press, New York, pp.206-208.

SONG, X.S., HU, W.H., MAO, W.H., OGWENO, J.O., ZHOU, Y.H., YU, J.Q., 2005, Response of ascorbate peroxidase isoenzymes and ascorbate regeneration system to abiotic stresses in *Cucumis sativus* L, *Plant Physiology and Biochemistry*, 43, 1082-1088.

SÖNMEZ B., 2003, *Türkiye Çoraklık Kontrol Rehberi*, Toprak ve Gübre Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Teknik Yayın No: 33, Ankara 2003.

STADLER, L.J., 1928, Genetic effects of X-rays in maize, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 69-75.

SUPRASANNA, P., RUPALI, C., DESAI, N.S., BAPAT, V.A., 2008, Partial desiccation augments plant regeneration from irradiated embryogenic cultures of sugarcane, *Plant Cell Tissue Organ Culture* 92, 101-105.

SUDHIR, P., MURTHY, S.D.S., 2004, Effects of salt stress on basic processes of photosynthesis, *Photosynthetica*, 42(4), 481-486.

TABOSA, J.N., COLAÇO, W., REIS, O.V., SIMPLICIO, J.B., DIAS, F.M., 2007, Sorghum genotypes tolerant to soil salinity-Progenies developed under gamma rays doses, *SAT e-journal*, 5(1), 1-5.

TANER, V., KUNTER, B., BEŞIRLI, G., YANMAZ, R., 2004, Sarımsakta (*Allium sativum* L.) radyasyonla mutasyon ıslahına yönelik olarak “etkili mutasyon dozunun” belirlenmesi, *Bahçe*, 33(1-2): 95-99.

THOMSON, J.A., Genetic engineering in plants. Biotechnology. Horst Werner Doelle Edgar J. DaSilva (Ed.) <http://www.eolss.net/ebooks/Sample%20Chapters/C17/E6-58-03-04.pdf> [Ziyaret Tarihi: 22. 06.2010]

TRINCHANT, J.C., BOSCARI, A., SPENNATO, G., SYPE, G.V., RUDULIER, D.L., 2004, Proline betaine accumulation and its metabolism in alfalfa plants under sodium

chloride stress. Exploring its compartmentalization in nodules, *Plant Physiology*, 135, 1583-1594.

TRIVEDI, S., GALIBA, G., SANKHLA, N., ERDEI, L., 1991, Responses to osmotic and NaCl stress of wheat varieties differing in drought and salt tolerance in callus cultures, *Plant Science*, 73(2), 227-232.

TÜRKAN, İ., DEMİRAL, T., 2009, Recent developments in understanding salinity tolerance, *Environmental and Experimental Botany*, 67(1), 2-9.

ÜNLÜKARA, A., CEMEK, B., KARADAVUT, S., 2006, Farklı çevre koşulları ile sulama suyu tuzluluğu ilişkilerinin Domatesin büyüme, gelişme, verim ve kalitesi üzerindeki etkileri. GOÜ, *Ziraat Fakültesi Dergisi*, 23(1), 15-23.

UMEZAWA, T., FUJITA, M., FUJITA, Y., YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K., SHINOZAKI, K., 2006, Engineering drought tolerance in plants: discovering and tailoring genes to unlock the future, *Current Opinion in Biotechnology*, 17, 113-122.

UPADHYAY, A., JAYADEV, K., MANIIMEKALAI, R., PARTHASARATHY, V.A., 2004, Genetic relationship and diversity in Indian coconut accessions based on RAPD markers, *Scientia Horticulturae*, 99, 353-362.

VANDENHOVE, H., VANHOUDT, N., WANNIJN, J., HEES, M.V., CUYPERS, A., 2009, Effect of low-dose chronic gamma exposure on growth and oxidative stress related responses in *Arabidopsis thaliana*, *Radioprotection*, 44(5), 487-491.

VENKATACHALAM, L., SREEDBAR, R.V., BHAGYALAKSHMI, N., 2007, Genetic analyses of micropropagated and regenerated plantlets of banana as assessed by RAPD and ISSR markers, *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 43, 267-274.

VILARINHOS, A.D., BARROS, E.G., PALVA, E., SEDIYAMA, C.S., MOREIRA, M.A., 1994, Use of the random amplified polymorphic DNA technique to characterize

soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) genotypes, *Brazilian Journal of Genetics*, 17(3), 287-290.

VOLLMAN, J., GRAUSGRUBER, H., STIFT, G., DRYZHURUK, V., LELLEY, T., 2005, Genetic diversity in camelina germplasm as revealed by seed quality characteristics and RAPD polymorphism, *Plant Breeding*, 124, 446-453.

WANG, X. S., HAN, J. G., 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), 431-440.

WADA, H., KOSHIBA, T., MATSUI, T., SATÔ, M., 1998, Involvement of peroxidase in differential sensitivity to γ -radiation in seedlings of two *Nicotiana* species, *Plant Science*, 132, 109-119.

WATANABE, S., KOJIMA, K., IDE, Y., SASAKI, S., 2004, Effects of saline and osmotic stress on proline and sugar accumulation in *Populus euphratica* *in vitro*, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 199-206.

WELSH, J., MCCLELLAND, M., 1990, Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers, *Nucleic Acid Research*, 18, 6531-6535.

WI, A.G., CHUNG, B.Y., KIM, J.S., KIIM, J.H., BAEK, M.H., LEE, J.W., KIM, Y.S., 2007, Effects of gamma irradiation on morphological changes and biological responses in plants, *Micron*, 38, 553-564.

WILLIAMS, J.G.K., KUBELIK, A.R., LIVAK, K.J., RAFALSKI, J.A., TINGEY, S.V., 1990, DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers, *Nucleic Acid Research*, 18, 6531-6535.

WITJAKSONO, LITZ, R.E., 2004, Effect of gamma irradiation on embryogenic avocado cultures and somatic embryo development, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 77, 139-147.

XI, X.Y., LI, C.J., ZHANG, F.S., 2005, Nitrogen supply after removing the shoot apex increases the nicotine concentration and nitrogen content of tobacco plants, *Annals of Botany*, 96, 793-797.

XINWEN, X., HAILIANG, X., YANLING, W., XIAOJING, W., YONGZHI, Q., BO, X., 2008, The effect of salt stress on the chlorophyll level of the main sand-binding plants in the shelterbelt along the Tarim desert Highway, *Chinese Science Bulletin*, 53(11), 109-111.

YANG, S.L., LAN, S.S., GONG, M., 2009, Hydrogen peroxide-induced proline and metabolic pathway of its accumulation in maize seedlings, *Journal of Plant Physiology*, 166, 1694- 1699.

YANG, W.J., RICH, P.J., AXTELL, J.D., WOOD, K.V., BONHAM, C.C., EJETA, G., MICKELBART, M.V., RHODES, D., 2003, Genotypic variation for glycine-betaine in Sorghum, *Crop Science*, 43, 881-889.

YAZICI, I., TURKAN, I., SEKMEN, A.H., DEMIRAL, T., 2007, Salinity tolerance of purslane (*Portulaca oleracea* L.) is achieved by enhanced antioxidative system, lower level of lipid peroxidation and proline accumulation, *Environmental and Experimental Botany*, 61, 49-57.

YEH, F.C., YANG, R.C., BOYLE, T.B.J., YE, Z.H., MAO, J.X., 1999, Popgene, the user friendly shareware for population genetic analysis, Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, CANADA.

YOKOI, S., BRESSAN, R.A., HASEGAWA, P.M., 2002, Salt stress tolerance of plants, *JIRCAS Working Report*. 25-33.

ZHU, J.K., 2001, Cell signalling under salt, water and cold stresses, *Current Opinion in Plant Biology*, 4, 401-406.

ÖZGEÇMİŞ

1979 yılında İstanbul'da doğdum. Lisans eğitimimi 1997-2001 yılları arasında İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde tamamladım. Aynı sene Haliç Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde Araştırma Görevlisi kadrosunda akademik hayatıma başladım. Yüksek lisans eğitimimi 2005 senesinde Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda tamamladıktan sonra İstanbul Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı Radyobiyoloji Anabilim Dalı'nda doktora eğitimime başladım. 2007 senesinde İstanbul Kültür Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde Araştırma Görevlisi kadrosunda çalışmaya başladım. Halen İstanbul Kültür Üniversitesi'ndeki görevime devam etmekteyim. SCI'ya dahil dergilerde 6 adet özgün makale, 4 adet özet yayın, uluslararası hakemli dergilerde 3 adet basılı makalem var. 2004 senesinden beri Op. Dr. Caner Çelik ile evliyim.