

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ
DOKTORA TEZİ

FARKLI KORUNGA (*Onobrychis viciifolia* Scop.) EKOTİPLERİNİN TUZA
TOLERANSININ BELİRLENMESİ VE *IN VITRO* MUTAGENESİS TEKNİĞİ
ARACILIĞIYLA YENİ KORUNGA HATLARININ GELİŞTİRİLMESİ

Ramazan BEYAZ

Danışman Öğretim Üyesi
Prof. Dr. Cengiz SANCAK

EKİM

2014

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının; akademik kural ve etik ilkelere bağlı kalınarak hazırlandığını, çalışmada yararlanılan ve bu çalışma ürünü olmayan bütün bilgiler için kaynak yayınlara atıfta bulunulmuş olduğunu beyan ederim.

Ramazan BEYAZ

İmzası

ONAY

Prof. Dr. Cengiz SANCAK danışmanlığında Ramazan BEYAZ tarafından hazırlanan bu çalışma 09/10/2014 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Cengiz SANCAK

İmza:

(Ankara Üniversitesi)

Üye: Prof. Dr. Mustafa YILDIZ

İmza:

(Ankara Üniversitesi)

Üye: Prof. Dr. Ş. Şebnem ELLİALTIOĞLU

İmza:

(Ankara Üniversitesi)

Üye: Prof. Dr. Zeki ACAR

İmza:

(Ondokuz Mayıs Üniversitesi)

Üye: Prof. Dr. Sebahattin ALBAYRAK

İmza:

(Süleyman Demirel Üniversitesi)

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Aykut ÖZKUL

Enstitü Müdürü

ÖZET

Doktora Tezi

Farklı Korunga (*Onobrychis viciifolia* Scop.) Ekotiplerinin Tuza Toleransının Belirlenmesi ve *In vitro* Mutagenesis Tekniği Aracılığıyla Yeni Korunga Hatlarının Geliştirilmesi

Ramazan BEYAZ

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Danışman: Prof. Dr. Cengiz SANCAK

Özet Metni

Bu araştırmada, farklı korunga (*Onobrychis viciifolia* Scop.) ekotiplerinin ('Koçaş', 'Malya', 'Altınova' ve 'Ulaş') tuza (NaCl) tepkilerinin belirlenmesi ve *in vitro* mutagenesis tekniği aracılığıyla tuza (NaCl) toleranslı yeni korunga hatlarının geliştirilmesine yönelik çalışmalar yürütülmüştür. Araştırmada korunga ekotipleri; tohum çimlenme yüzdesi, fide ve kök boyu, fide yaş ve kuru ağırlık, klorofil a, klorofil b, toplam klorofil, antioksidatif enzimler (SOD, CAT, APX ve GR), lipid peroksidasyon (MDA) ve prolin bakımından değerlendirilmiştir. Artan tuz stresine bağlı olarak; incelenen morfolojik parametrelerin birim değerlerinde azalış ve incelenen fizyolojik parametrelerin birim değerlerinde ise artış saptanmıştır. Araştırma sonucunda, tuza tolerans bakımından Koçaş ekotipi öne çıkmıştır.

In vitro mutagenesis oluşturmak amacıyla, korunga ekotiplerinin tohumları kobalt-60 gama işın kaynağı ile işınlanmıştır. Işınlanan tohumların seleksiyonu, 150 mM NaCl iğereren MS0 besi ortamından *in vitro* koşullar altında yapılmıştır. Daha sonra, seraya aktarılan bitkilere tekrar 150 mM NaCl uygulanarak ikinci defa seleksiyon yapılmıştır. Çalışma sonucunda tuza tolerans bakımından üstün 49 adet bitki tarlaya aktarılmıştır.

2014, 108 sayfa

Anahtar kelimeler: Korunga, Tuza (NaCl) tolerans, *In vitro* mutagenesis ve seleksiyon.

ABSTRACT

PhD Thesis

Determination of Salt Tolerance of Different Sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.)
Ecotypes and Improvement of New Sainfoin Lines via *In vitro* Mutagenesis Technique

Ramazan BEYAZ

Ankara University Biotechnology Institute

Supervisor: Prof. Dr. Cengiz SANCAK

Abstract Text

In this research, the studies related to determination of salt tolerance of different sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) ecotypes ('Koçaş', 'Malya', 'Altınova' and 'Ulaş') and improvement of new sainfoin lines via *in vitro* mutagenesis technique, have been carried out. In the research, in term of seed germination percentage, seedling and root length, seedling wet and dry weight, chlorophyll a, chlorophyll b, total chlorophyll, antioxidant enzymes (SOD, CAT, APX and GR), lipid peroxidation (MDA) and proline, sainfoin ecotypes were evaluated. Depending on the increased salt stress; reduction in unit values of the observed morphological parameters and increase in unit values of the observed physiological parameters were determined. As a result of research, in term of salt tolerance, Koçaş ecotype came to the fore.

To create mutagenesis, seeds of sainfoin ecotypes were irradiated by Cobalt-60 (⁶⁰Co) source. Selection of irradiated seeds were made from MS0 medium containing 150 mM NaCl under *in vitro* conditions. After that, plants, which are transferred to the greenhouse, were selected again. In conclusion, 49 plants, which are superior for salt tolerance, were transferred to the field.

2014, 108 pages

Keywords: Sainfoin, Salt (NaCl) tolerance, *In vitro* mutagenesis and selection

TEŞEKKÜR

Tez konumun seçiminden, araştırmanın yürütülmesine ve değerlendirilmesine kadar geçen sürede hiçbir zaman yardımlarını esirgemeyen ve hem yüksek lisans eğitimim hem de doktora eğitimim sırasında güçlü desteğini hissettiğim değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Cengiz SANCAK (Ankara Üniversitesi)'a,

Tüm çalışmalarımnda her yönüyle desteğini esirgemeyen değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Mustafa YILDIZ (Ankara Üniversitesi) ve eşi Dr. Çiğdem YILDIZ (Türkiye Atom Enerjisi Kurumu)'a, Sayın Prof. Dr. Ş.Şebnem ELLİALTIOĞLU (Ankara Üniversitesi)'na,

Çalışmalarımnda benden bilgisini ve desteğini esirgemeyen değerli hocalarım Yrd. Doç. Dr. Şebnem KUŞVURAN (Çankırı Karatekin Üniversitesi)'a ve eşi Yrd. Doç. Dr. Alpaslan KUŞVURAN (Çankırı Karatekin Üniversitesi)'a,

Tez çalışmamı '113Z399'nolu "Farklı Korunga (*Onobrychis viciifolia* Scop.) Ekotiplerinin Tuza Toleransının Belirlenmesi ve *In vitro* Mutagenesis Tekniği Aracılığıyla Yeni Korunga Hatlarının Geliştirilmesi" proje kapsamında maddi olarak destekleyen Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)'na, teşekkür ederim.

Son olarak eğitim hayatım boyunca benden desteklerini hiç esirgemeyen aileme sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Ramazan BEYAZ

ANKARA, EKİM 2014

İÇİNDEKİLER

| | |
|---|-------------|
| ETİK BEYAN | I |
| ONAY | II |
| ÖZET | III |
| ABSTRACT | IV |
| TEŞEKKÜR | V |
| İÇİNDEKİLER | VI |
| SEKİLLER DİZİNİ | VIII |
| ÇİZELGELER DİZİNİ | IX |
| SİMGELER DİZİNİ | XII |
| ÖNSÖZ | XIII |
| 1.GİRİŞ | 1 |
| 2. KURAMSAL TEMELLER | 16 |
| 2.1. Bitkilerde Tuz Stresine Karşı Tepkilerin Belirlenmesi | 16 |
| 2.2. <i>In Vitro</i> Mutagenesis Tekniği Aracılığıyla Tuza Toleranslı Bitkilerin Geliştirilmesi | 30 |
| 3. GEREKÇE VE AMAÇ | 36 |
| 3.1. Hipotezler | 36 |
| 4. MATERYAL VE YÖNTEM | 37 |
| 4.1. Materyal | 37 |
| 4.1.1. Bitki materyali | 37 |
| 4.1.2. Işınlama materyali | 37 |
| 4.2. Yöntem | 37 |
| 4.2.1. Tuz dozları ve uygulamasının yapılması | 37 |
| 4.2.2. Gama dozları ve <i>in vitro</i> seleksiyon uygulamasının yapılması | 39 |
| 4.2.3. Sera şartlarında bitkilere tuz uygulaması ve seleksiyonu | 43 |
| 4.3. Korunma Ekotiplerinin Tuza Tepkilerinin Belirlenmesinde Yapılan Ölçüm ve Analizler | 45 |
| 4.3.1. Morfolojik ölçümler | 45 |
| 4.3.2. Fotosentetik aktivitenin belirlenmesi | 45 |
| 4.3.3. Lipid peroksidasyonu | 46 |
| 4.3.4. Antioksidatif enzim analizleri | 46 |
| 4.3.5. Prolin analizi | 48 |
| 4.4. Verilerin İstatistiksel Değerlendirilmesi | 48 |
| 5. ARAŞTIRMA BULGULARI | 49 |
| 5.1. Farklı Korunma Ekotiplerinin Tuza (NaCl) Tepkilerinin Belirlenmesi Çalışmaları | 49 |

| | |
|---|-----------|
| 5.1.1. Farklı tuz (NaCl) dozlarının korunga ekotiplerinde morfolojik parametreler üzerine etkisi..... | 49 |
| 5.1.2. Farklı tuz (NaCl) dozlarının korunga ekotiplerinde fizyolojik parametreler üzerine etkisi..... | 57 |
| 5.2. <i>In vitro</i> mutagenesis, <i>In vitro</i> ve Sera Seleksiyon Çalışmaları..... | 77 |
| <u>6. TARTIŞMA VE SONUÇ.....</u> | 80 |
| 6.1. Morfolojik Parametreler | 80 |
| 6.2. Fizyolojik Parametreler..... | 81 |
| 6.3. <i>In vitro</i> Mutagenesis, <i>In vitro</i> ve Sera Seleksiyon Çalışmaları..... | 86 |
| 6.4. Sonuç..... | 87 |
| <u>KAYNAKLAR</u> | 89 |
| <u>ÖZGEÇMİŞ.....</u> | 96 |

ŞEKİLLER DİZİNİ

| | |
|---|----|
| Şekil 1.1. <i>Onobrychis viciifolia</i> | 1 |
| Şekil 1.2. Enerji transferi vasıtasıyla Reaktif Oksijen Türlerinin (ROT) oluşumu | 4 |
| Şekil 1.3. Glutatyon redüktaz ve hücrel redoks | 6 |
| Şekil 1.4. Bitki hücresinde reaktif oksijen türlerine karşı savunma mekanizmaları veya yolları..... | 7 |
| Şekil 1.5. Prolin biyosentez yolağı | 8 |
| Şekil 1.6. Linoleik (18:2) ve linolenik (18:3) yağ asitlerinin oksidasyonu (ROT: Reaktif oksijen türleri)..... | 9 |
| Şekil 1.7. Bitki hücresinde reaktif oksijen türlerinin oluşum ve yok etme yollarının lokalizasyonu..... | 11 |
| Şekil 1.8. Gama ışınlarının oluşumu..... | 14 |
| Şekil 4.1. Tuz uygulama denemesinin kurulmasından genel bir görünüm..... | 38 |
| Şekil 4.2. 'Koçaş' Ekotipine ait ışınlanmamış (kontrol) ve ışınlanmış tohumların 150 mM NaCl tuzu içeren MS0 seleksiyon ortamlarındaki 0. gün ve 10. gün görünüşleri. | 40 |
| Şekil 4.3. 10. gün sonunda seçilmiş bitkiciklerin NaCl içermeyen MS0 ortamına aktarılması ve aktarıldıktan 14 gün sonraki durumları..... | 41 |
| Şekil 4.4. NaCl içermeyen MS0 besi ortamından bitkiciklerin toprağa aktarılması işlemlerinden genel bir görünüm..... | 42 |
| Şekil 4.5. Kontrollü büyüme kabiniinde <i>in vitro</i> koşullardan gelen bitkilere tekrar NaCl uygulamasının yapılması ve hayatta kalan bitkilerin seçimi..... | 43 |
| Şekil 4.6. Kontrollü büyütme kabinlerinde tuz uygulamasından sonra hayatta kalan bitkiciklerin toprağının yenilenmesi işlemlerinden ve seraya götürülen seçilmiş bitkilerden genel bir görünüm..... | 44 |
| Şekil 4.7. Klorofil analizi için hazırlanan örnekler ve spektrofotometrede okuma işlemi | 46 |
| Şekil 4.8. Prolin analizi için hazırlanan örnekler | 48 |
| Şekil 5.1. Tarlaya şaşırtılmış tuza tolerans bakımından üstün bitkiler (Yer: Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü Arazisi, Fotoğraf bitkiler tarlaya şaşırtıldıktan 3 gün sonra çekilmiştir)..... | 77 |
| Şekil 5.2. Tarlaya şaşırtılmış tuza tolerans bakımından üstün bitkiler (Yer: Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü Arazisi, Fotoğraf bitkiler tarlaya şaşırtıldıktan 1.5 ay sonra çekilmiştir)..... | 78 |
| Şekil 5.3. Tarlaya şaşırtılmış tuza tolerans bakımından üstün bitkiler (Yer: Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü Arazisi, Fotoğraf bitkiler tarlaya şaşırtıldıktan 2 ay sonra çekilmiştir)..... | 78 |
| Şekil 5.4. Hasat zamanı gelmiş tarlaya şaşırtılan tuza tolerans bakımından üstün bitkilerden genel bir görünüm | 79 |
| Şekil 5.5. Vejetatif fazdan generatif faza geçiş yapamayan mutant bitki..... | 79 |

ÇİZELGELER DİZİNİ

| | |
|--|----|
| Çizelge 1.1. Türkiye topraklarının tuzluluk derecesi ve alanları _____ | 3 |
| Çizelge 1.2. Reaktif oksijen türlerini (ROT) yok eden önemli enzimler _____ | 5 |
| Çizelge 1.3. Farklı radyasyon kaynakları ile geliştirilmiş mutant çeşitlerin resmi sayısı _____ | 13 |
| Çizelge 5.1. Korunganın 'Koçaş' ekotipinde, farklı tuz dozlarının sera şartlarında tohum çimlenmesi, fide ve kök boyları, fide yaş ve kuru ağırlıkları üzerine etkisi ile 0 mM'dan 200 mM'a artan tuz dozlarında incelenen parametrelerde gözlenen değişim oranı _____ | 50 |
| Çizelge 5.2. Korunganın 'Malya' ekotipinde, farklı tuz dozlarının sera şartlarında tohum çimlenmesi, fide ve kök boyları, fide yaş ve kuru ağırlıkları üzerine etkisi ile 0 mM'dan 200 mM'a artan tuz dozlarında incelenen parametrelerde gözlenen değişim oranı _____ | 52 |
| Çizelge 5.3. Korunganın 'Altınova' ekotipinde, farklı tuz dozlarının sera şartlarında tohum çimlenmesi, fide ve kök boyları, fide yaş ve kuru ağırlıkları üzerine etkisi ile 0 mM'dan 200 mM'a artan tuz dozlarında incelenen parametrelerde gözlenen değişim oranı _____ | 52 |
| Çizelge 5.4. Korunganın 'Ulaş' ekotipinde, farklı tuz dozlarının sera şartlarında tohum çimlenmesi, fide ve kök boyları, fide yaş ve kuru ağırlıkları üzerine etkisi ile 0 mM'dan 200 mM'a artan tuz dozlarında incelenen parametrelerde gözlenen değişim oranı _____ | 54 |
| Çizelge 5.5. Farklı tuz dozlarının dört korunga ekotipinde tohum çimlenmesi ve 0 mM'dan 200mM'a yüzdesel (%) değişim oranı üzerine etkisi _____ | 54 |
| Çizelge 5.6. Farklı tuz dozlarının dört korunga ekotipinde fide boyu ve 0 mM'dan 200mM'a yüzdesel (%) değişim oranı üzerine etkisi _____ | 56 |
| Çizelge 5.7. Farklı tuz dozlarının dört korunga ekotipinde kök boyu ve 0 mM'dan 200mM'a yüzdesel (%) değişim oranı üzerine etkisi _____ | 56 |
| Çizelge 5.8. Farklı tuz dozlarının dört korunga ekotipinde fide yaş ağırlık ve 0 mM'dan 200mM'a yüzdesel (%) değişim oranı üzerine etkisi _____ | 58 |
| Çizelge 5.9. Farklı tuz dozlarının dört korunga ekotipinde fide kuru ağırlık ve 0 mM'dan 200mM'a yüzdesel (%) değişim oranı üzerine etkisi _____ | 58 |
| Çizelge 5.10. Korunganın 'Koçaş' ekotipinde, farklı tuz dozlarının sera şartlarında gelişen fidelerin yapraklarında klorofil a, klorofil b ve toplam klorofil kapsamları üzerine etkisi ile 0 mM'dan 200 mM'a artan tuz dozlarında incelenen karakterlerde gözlenen değişim oranı _____ | 59 |
| Çizelge 5.11. Korunganın 'Koçaş' ekotipinde, farklı tuz dozlarının antioksidatif enzimler Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), askorbat peroksidaz (APX) kapsamları üzerine etkisi ile 0 mM'dan 150 mM'a artan tuz dozlarında incelenen parametrelerde gözlenen değişim oranı _____ | 59 |
| Çizelge 5.12. Korunganın 'Koçaş' ekotipinde, farklı tuz dozlarının antioksidatif enzim glutatyon redüktaz (GR), lipid peroksidasyon (MDA) ve prolin kapsamları üzerine etkisi ile 0 mM'dan 150 mM'a artan tuz dozlarında incelenen parametrelerde gözlenen değişim oranı _____ | 61 |
| Çizelge 5.13. Korunganın 'Malya' ekotipinde, farklı tuz dozlarının sera şartlarında gelişen fidelerin yapraklarında klorofil a, klorofil b ve toplam klorofil kapsamları üzerine etkisi ile 0 mM'dan 200 mM'a artan tuz dozlarında incelenen parametrelerde gözlenen değişim oranı _____ | 61 |
| Çizelge 5.14. Korunganın 'Malya' ekotipinde, farklı tuz dozlarının antioksidatif enzimler Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), askorbat peroksidaz (APX) kapsamları üzerine etkisi ile 0 mM'dan 150 mM'a artan tuz dozlarında incelenen parametrelerde gözlenen değişim oranı _____ | 63 |

- Çizelge 5.15. Korunganın 'Malya' ekotipinde, farklı tuz dozlarının antioksidatif enzim glutatyon redüktaz (GR), lipid peroksidasyon (MDA) ve prolin kapsamları üzerine etkisi ile 0 mM'dan 150 mM'a artan tuz dozlarında incelenen parametrelerde gözlenen değişim oranı_ 63
- Çizelge 5.16. Korunganın 'Altınova' ekotipinde, farklı tuz dozlarının sera şartlarında gelişen fidelerin yapraklarında klorofil a, klorofil b ve toplam klorofil kapsamları üzerine etkisi ile 0 mM'dan 200 mM'a artan tuz dozlarında incelenen parametrelerde gözlenen değişim oranı_ 64
- Çizelge 5.17. Korunganın 'Altınova' ekotipinde, farklı tuz dozlarının antioksidatif enzimler Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), askorbat peroksidaz (APX) kapsamları üzerine etkisi ile 0 mM'dan 150 mM'a artan tuz dozlarında incelenen parametrelerde gözlenen değişim oranı _____ 64
- Çizelge 5.18. Korunganın 'Altınova' ekotipinde, farklı tuz dozlarının antioksidatif enzim glutatyon redüktaz (GR), lipid peroksidasyon (MDA) ve prolin kapsamları üzerine etkisi ile 0 mM'dan 150 mM'a artan tuz dozlarında incelenen parametrelerde gözlenen değişim oranı_ 66
- Çizelge 5.19. Korunganın 'Ulaş' ekotipinde, farklı tuz dozlarının sera şartlarında gelişen fidelerin yapraklarında klorofil a, klorofil b ve toplam klorofil kapsamları üzerine etkisi ile 0 mM'dan 200 mM'a artan tuz dozlarında incelenen parametrelerde gözlenen değişim oranı_ 66
- Çizelge 5.20. Korunganın 'Ulaş' ekotipinde, farklı tuz dozlarının antioksidatif enzimler Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), askorbat peroksidaz (APX) kapsamları üzerine etkisi ile 0 mM'dan 150 mM'a artan tuz dozlarında incelenen parametrelerde gözlenen değişim oranı _____ 67
- Çizelge 5.21. Korunganın 'Ulaş' ekotipinde, farklı tuz dozlarının antioksidatif enzim glutatyon redüktaz (GR), lipid peroksidasyon (MDA) ve prolin kapsamları üzerine etkisi ile 0 mM'dan 150 mM'a artan tuz dozlarında incelenen parametrede gözlenen değişim oranı _____ 67
- Çizelge 5.22. Farklı tuz dozlarının dört korunga ekotipinde klorofil a kapsamı ve 0 mM'dan 200 mM'a artan tuz dozlarında gözlenen değişim oranı üzerine etkisi _____ 69
- Çizelge 5.23. Farklı tuz dozlarının dört korunga ekotipinde klorofil b kapsamı ve 0 mM'dan 200 mM'a artan tuz dozlarında gözlenen değişim oranı üzerine etkisi _____ 69
- Çizelge 5.24. Farklı tuz dozlarının dört korunga ekotipinde toplam klorofil kapsamı ve 0 mM'dan 200 mM'a artan tuz dozlarında gözlenen değişim oranı üzerine etkisi _____ 70
- Çizelge 5.25. Farklı tuz dozlarının dört korunga ekotipinde süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi üzerine etkisi ile 0 mM'dan 150 mM'a artan tuz dozlarında incelenen parametrede gözlenen değişim oranı _____ 72
- Çizelge 5.26. Farklı tuz dozlarının dört korunga ekotipinde katalaz (CAT) aktivitesi üzerine etkisi ile 0 mM'dan 150 mM'a artan tuz dozlarında incelenen parametrede gözlenen değişim oranı _____ 72
- Çizelge 5.27. Farklı tuz dozlarının dört korunga ekotipinde askorbat peroksidaz (APX) aktivitesi üzerine etkisi ile 0 mM'dan 150 mM'a artan tuz dozlarında incelenen parametrede gözlenen değişim oranı _____ 73
- Çizelge 5.28. Farklı tuz dozlarının dört korunga ekotipinde glutatyon redüktaz (GR) aktivitesi üzerine etkisi ile 0 mM'dan 150 mM'a artan tuz dozlarında incelenen parametrede gözlenen değişim oranı _____ 73
- Çizelge 5.29. Farklı tuz dozlarının dört korunga ekotipinde lipid peroksidasyon (MDA) aktivitesi üzerine etkisi ile 0 mM'dan 150 mM'a artan tuz dozlarında incelenen parametrede gözlenen değişim oranı _____ 75
- Çizelge 5.30. Farklı tuz dozlarının dört korunga ekotipinde prolin aktivitesi üzerine etkisi ile 0 mM'dan 150 mM'a artan tuz dozlarında incelenen parametrede gözlenen değişim oranı ____ 75

Çizelge 5.31. Korunga ekotiplerinde 0'dan 150 mM'a ölçülen SOD, CAT, APX, GR, MDA ve Prolin miktarlarının yüzde (%) değerler üzerinden sıralanması _____ 76

Çizelge 5.32. Korunga ekotiplerinde 150 mM'daki ölçülen SOD, CAT, APX, GR, MDA ve Prolin miktarlarının rakamsal değerleri üzerinden sıralanması _____ 76

SİMGELER DİZİNİ

| | |
|-----------|--------------------------------------|
| APX | Askorbat peroksidaz |
| CAT | Katalaz |
| dak | dakika |
| g | Gram |
| GR | Glutasyon Redüktaz |
| Gy | Gray |
| ha | hektar |
| MDA | Malondialdehit |
| mg | Miligram |
| ml | Mililitre |
| mM | Milimol |
| MS | Murashige ve Skoog basal besi ortamı |
| μ mol | Mikromol |
| μ g | Mikrogram |
| NaCl | Sodyum Klorür |
| ROT | Reaktif oksijen türleri |
| SOD | Süpeoksit dismutaz |
| T.A. | Taze Ağırlık |
| TBA | Tiobarbütirik asit |
| TCA | Trikloroasetik asit |
| U | Ünite |

ÖNSÖZ

650 cins ve 18000 tür ile çiçekli bitkilerin 3. büyük familyası olan baklagiller (Fabaceae veya Leguminosae) dünyada geniş bir yayılım alanı göstermektedir. Baklagiller dünyaki bitkisel üretimin yaklaşık % 27'sini oluşturan en önemli ikinci familyadır. Yeryüzündeki baklagillerden insan yiyeceği, hayvan yemi, yeşil gübre, kereste, sakız ve yağ endüstri ham maddesi gibi çeşitli yönlerden yararlanılmaktadır. Türkiye dünyadaki en önemli baklagillerin gen merkezlerinden birisidir. Türkiyede yonca ve fiğ'den sonra yem bitkileri tarımı açısından üçüncü sırada yer alan korunga (*Onobrychis viciifolia* Scop.) bu önemli familyanın üyelerinden birisidir. Hem Avrupa'da hem de Türkiye'de çok geniş bir alanda yayılım göstermektedir.

Tuzluluk, bundan 4000 yıl önce tarım yapılan Mezopotamya topraklarında da var olduğu iyi bilenen, o zamandan beri küçük ama devam eden, hem sulanan hem de kurak bölgelerde görülen, önemli bir sorundur. Bu sorun gittikçe artmaktadır. Çünkü tarımını yaptığımız kültür bitkilerinin çoğu tuzluluğa karşı dayanıksızdır (93). Dolayısıyla bu sorunla mücadele için kültürünü yaptığımız bitkilerin öncelikle bu probleme karşı toleranslarının belirlenmesi ve daha sonra çeşitli bilimsel yaklaşımlar ile (özellikle biyoteknolojik) tuzluluğa toleranslı bitki çeşitlerinin geliştirilmesi hem dünya hem de Türkiye tarımı için önem arz etmektedir.

Bu çalışmamızda Türkiye'de korunga türleri içerisinde en geniş yayılım alanı gösteren *Onobrychis viciifolia* Scop. türünün dört farklı ekotipine ait bireylerin tuz stresine karşı olan tepkilerinin belirlenmesi ve tuza toleranslı hatlarının geliştirilmesi noktasında araştırmalar yürütülmüştür.

Avrupa'da önemli ve büyük projelere (COST:Action, web: [http://sainfoin.eu/healthy-hay-project -online](http://sainfoin.eu/healthy-hay-project-online)) konu olan ve çeşitli yönleriyle bilimsel araştırmaları yapılan önemli bir yem bitkisi olan korunga için yürütmüş olduğumuz bu çalışma ile bilimsel literatüre katkı sağlamak ve ayrıca dünyada ve Türkiye'de korunga bitkisi için yapılacak tuzluluk ile ilgili bilimsel çalışmalara kaynak oluşturmak mutluluk vericidir. Gelecekte bu konu üzerinde çalışacak olan araştırmacılara faydalı olmasını dilerim.

1.GİRİŞ

Korunga, çok eski yıllardan bu yana tarımı yapılan bir baklagil yem bitkisidir. Korunga türleri Baltık Denizi'nden, Akdeniz, Ön Asya ve Sibirya'ya kadar olan geniş bir alanda doğal yayılım göstermektedir (1). Bu bitkinin yayılma alanı içerisinde yer alan Türkiye'de 52 adet türü bulunmakta olup, bunların da 27 tanesi endemiktir (2). Geniş bir yayılış alanı gösteren korunganın dünyada ve Türkiye'de en fazla kültürü yapılan türü ise *Onobrychis viciifolia* Scop. = *Onobrychis sativa* Lam.'dır (Şekil 1.1.).



Şekil 1.1. *Onobrychis viciifolia* (3)

Korunga önemli tarımsal özellikleri ile yem bitkilerinin kralı olarak tanınmaktadır. Yoncannın yetişemediği kıraç, zayıf, çakıllı, kireçli topraklarda yetiştirilebilir ve tuza dayanımı yüksektir (4). Kurak şartlarda diğer baklagil yem bitkilerine göre daha verimlidir ve suyun problem olduğu birçok iklim ve toprak şartlarında yetişebildiği için ekim nöbeti planlamasında önemli bir yere sahiptir. Korunganın besleme değeri yüksek olup, yemi azotsuz öz maddeler, ham yağ ve ham protein bakımından zengindir. Hazım olmayı olumsuz yönde etkileyen lignin maddesi korunga otunda yoncadan daha azdır (5). Dolayısıyla korunga saf ve karışım halinde kıraç şartlarda, yapay mera karışımlarında

kullanılabilen bir yem bitkisidir. Bu bitkinin otlatma bakımından diğer önemli bir özelliği de ilkbaharda erken gelişmeye başlamasıdır. Böylece diğer bitkiler gelişmeye başlamadan hayvanlara yem sağlayabilmektedir.

Korunga arıcılık ve bal üretiminde de önemli bir bitkidir. Korunganın gösterişli çiçeklerinde bol miktarda bal özü (nektar) bulunmaktadır. Korunga bitkisi hayvanlara iyi bir yem kaynağı olması yanında toprakların ıslahı açısından da büyük önem taşımaktadır. Kökleri çok kuvvetli olduğu için derinlere doğru ilerleyerek ana kayayı parçalar ve toprak oluşumunu hızlandırır. Derinlere giden kökleri ile toprağı havalandırır ve besin elementlerini kullanır. Köklerinin katyon değişim kapasitesi yüksek olduğundan verimsiz topraklarda rahatlıkla yetiştirilebilir. Bunun yanında bir baklagil yem bitkisi olması nedeniyle simbiyotik fiksasyonla havanın serbest azotunu bağlayarak toprağın azotça zenginleşmesini sağlar (5). Türkiye’de engebeli topografik alanlardan oluşmuş milyonlarca hektar mera arazisi, ağır ve zamansız kullanım sonucu bitki örtüsünün önemli bir kısmını yitirmiş ve erozyona açık duruma gelmiştir. Korunga, kuvvetli gelişen kök sistemi sayesinde bu alanlarda güvenle kullanılabilir. Korunga Türkiye’de yoncadan ve fiğden sonra üçüncü en çok tarımı yapılan yem bitkisidir. Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) verilerine göre Türkiye’de 2013 yılı içerisinde 1.914.391 (yeşil ot) dekarlık alanda 1.630.572 ton yeşil ot, 14.420 (tohum) dekarlık alanda 636 ton korunga tohum üretimi gerçekleştirilmiştir (6). Birçok kültür bitkisinin kolay kolay yetiştirilemediği kireçli ve kuru, kıraç toprakların değerlendirilmesi için korunganın kullanılması onun çok önemli bir özelliğidir (4). Korunga bitkisi kurak ortamlarda yetişebilmekte ve bu alanlarda tuzluluk sorunu ile karşılaşmaktadır.

Tuzluluk dünya topraklarının önemli sorunlarından birisidir. Dünyada her yıl 10 milyon ha arazinin tuzluluk etkisiyle elden çıkması, sorunun boyutunu daha iyi göz önüne sermektedir (7). Tuzluluk problemi kurak ve yarı kurak bölgelerde ve yağışın yetersiz olduğu bölgelerde doğal olarak bulunmaktadır.

Kurak ve yarı kurak bölgeler dünyadaki toplam alanın yaklaşık % 46’sını kaplar. Bu iklim bölgelerinde sulanan alanların yaklaşık % 50’sinde ise değişik düzeylerde tuzluluk sorunu vardır. FAO/UNESCO tarafından hazırlanan raporlarda, Dünya Toprak Haritası verilerine dayanarak, dünya genelinde 954 milyon ha tuzdan etkilenmiş ve üretkenliği kısıtlanmış toprak bulunduğu bildirilmektedir. Bu tip sorunlu topraklar, Afrika’da 80.5 milyon,

Avrupa'da 50.8 milyon, Avustralya'da 357.3 milyon, Amerika'da 146.9 milyon ve Asya kıtasında 319.3 milyon ha alan kaplamaktadır (8).

Türkiye toprakları, kurak ve yarı kurak bölgeler içerisinde yer almaktadır. Bu sorun Türkiye topraklarını da önemli ölçüde etkilemektedir. Türkiye Geliştirilmiş Toprak Haritası etüdlerinde kullanılan tuzluluk ve alkalilik kriterlerine göre Türkiye'de 1.518.722 ha alanda tuzluluk ve alkalilik (çoraklık) sorunu tespit edilmiştir (Çizelge 1.1.) (8).

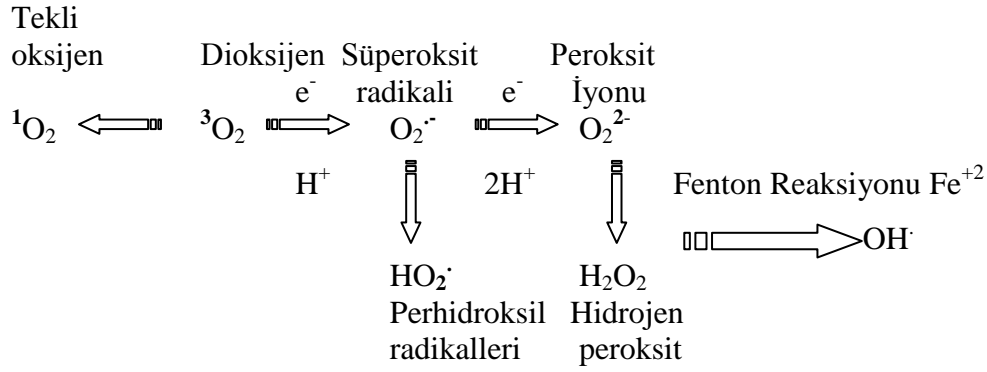
Çizelge 1.1. Türkiye topraklarının tuzluluk derecesi ve alanları (8)

| Tuzluluk derecesi | Alan (ha) | Toplamdaki %'si |
|--------------------|-----------|-----------------|
| Hafif Tuzlu | 614.617 | 41 |
| Tuzlu | 504.603 | 33 |
| Alkali | 8.641 | 0.5 |
| Hafif Tuzlu Alkali | 125.863 | 8 |
| Tuzlu Alkali | 264.958 | 17.5 |
| Toplam | 1.518.722 | 100 |

Yapılan bir araştırmaya göre önümüzdeki 75 yıl içerisinde tarım arazilerinin yaklaşık, sadece % 10 artabileceği, buna karşın dünya nüfusun iki katına çıkacağı ve bu artışın büyük bir kısmının, tuzluluğun yaygın olduğu dünyanın kurak ve yarı kurak bölgelerinde olması konunun ciddiyetini göstermektedir (8).

Bitkiler tuz stresinin zararlı etkilerinden korunmak için birçok biyokimyasal ve moleküler mekanizmaya sahiptir. Temel biyokimyasal mekanizmalar: i) antioksidatif enzimlerin uyarılması, ii) iyon dengesi ve iii) osmolitlerin (prolin, birden çok hidroksil grubu içeren alkoller ve glisin-betain) biyosentezidir (9).

i) Antioksidatif savunma sistemi: Tuzluluk ile uyarılan oksidatif stres sırasında, birçok sitotoksin ROT'lar (nükleik asitlerin, yağların ve proteinlerin oksidatif yıkımı vasıtasıyla normal metabolizmayı bozabilen) mitokondri, peroksizom ve sitoplazma gibi organellerde sürekli olarak üretilmektedir. ROT'lar atmosferik oksijen molekülünün (O_2) kademeli olarak indirgenmesi ile oluşurlar. Süperoksit ($O_2^{\cdot-}$) radikalleri, hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikalleri (OH^{\cdot}) ve tek oksijen (1O_2) bu kademeli indirgenen biyokimyasal reaksiyonun ara ürünleri olarak meydana gelmektedir (Şekil 1.2.) (9).



Şekil 1.2. Enerji transferi vasıtasıyla Reaktif Oksijen Türlerinin (ROT) oluşumu (10).

Evrin süreci içerisinde bitki hücreleri kendilerini tuz stresi ve onun oluşturduğu oksidatif strese karşı korumak için enzimatik (SOD, APX, GPX, GR, CAT, vb.) ve enzimatik olmayan (askorbat, glutatyon, karotenoid ve flavonid vb.) karmaşık antioksidant savunma sistemleri oluşturmuştur. Birçok bitkide antioksidatif enzim aktivitesi ve ekspresyon seviyesi farklıdır. Bu farklılık tuz stresine karşı bazı genotiplerin daha toleranslı, bazı genotiplerin ise daha hassas olmasından kaynaklanmaktadır (9).

Süperoksit dismutaz (SOD), süperoksitlerin ($\text{O}_2^{\cdot-}$) oksijene ve hidrojen peroksitlere dönüşümünü katalizleyen bir metallo enzimdir (Çizelge 1.2.) (9). Süperoksitlerin uzaklaştırılmasını sağlar. Böylece, metal ile katalizlenmiş Haber-Weiss tipi reaksiyon yolu ile süperoksitlerden daha tehlikeli olan hidroksil radikallerinin oluşum riskini azaltır. Bu reaksiyon doğal dismutasyondan 10000 kat daha hızlı gerçekleşir. Çeşitli çevresel streslerin ROT miktarını artırması sonucunda oluşan toksik etkiye karşı antioksidatif savunmanın ilk hattı olarak SOD enzimleri görev alır. Ayrıca bitkilerde stres toleransında önemli bir rolü olduğu bilinmektedir. SOD'lar metal kofaktörlerine göre 3 gruba (Cu/Zn-SOD, Mn-SOD ve Fe-SOD) ayrılırlar. Bu izoenzimler farklı hücresel kompartımanlarda (Fe-SOD kloroplastlarda, Mn-SOD mitokonri ve peroksizomlarda, Cu/Zn-SOD kloroplast ve sitozollerde) lokalize olmuşlardır (10).

Katalazlar (CAT), H_2O_2 'yi doğrudan olarak H_2O ve O_2 'ye parçalayan yapısında demir grubu bulunduran tetramerik enzimlerdir (Çizelge 1.2.). Katalazlar diğer antioksidatif enzimler içerisinde en hızlı şekilde mevcut oranını artıran enzimlerdir. Bir katalaz enzimi (veya katalaz molekülü) yaklaşık 6 milyon hidrojen peroksit (H_2O_2) molekülünü bir dakika içerisinde parçalayabilme kapasitesine sahiptir. Katalazlar peroksizomlar ve gliksizomlarda lokalize olmuşlardır. Peroksizomlarda gerçekleşen pürin katabolizması ve

fotorespirasyon ile yağ asitlerinin oksidasyonu sonucunda oluşan H₂O₂'lerin uzaklaştırılmasında önemli görevleri vardır (10).

Çizelge 1.2. Reaktif oksijen türlerini (ROT) yok eden önemli enzimler (10)

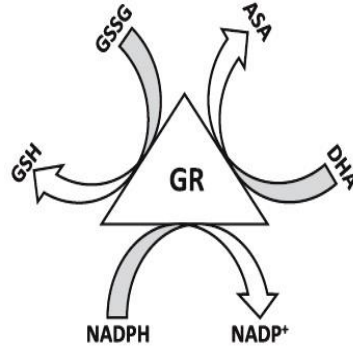
| Antioksidan enzim | Enzim Kodu | Katalizlediği Reaksiyon |
|---------------------------|-------------------|--|
| Süperoksit dismutaz (SOD) | EC 1.15.1.1 | $O_2^{\cdot -} + O_2^{\cdot -} + 2H^+ \rightarrow 2H_2O_2 + O_2$ |
| Katalaz (CAT) | EC 1.11.1.6 | $H_2O_2 \rightarrow H_2O + \frac{1}{2}O_2$ |
| Askorbat peroksidaz (APX) | EC 1.11.1.11 | $H_2O_2 + AA \rightarrow 2H_2O + DHA$ |
| Glutasyon redüktaz (GR) | EC 1.6.4.2 | $GSSG + NAD(P)H \rightarrow 2GSH + NAD(P)^+$ |

Askorbat peroksidaz (APX), yüksek yapılı bitkilerin, alglerin, öglena ve diğer organizmaların hücrelerinde ROT'ların yok edilmesinde en önemli rolü oynamaktadır. APX H₂O₂'nin yok edilmesinde, su-su ve askorbat-glutasyon döngülerinde görev yapmaktadır. Ayrıca yine bu iki döngüde askorbatdan elektron verici olarak faydalanmaktadır. APX enzim ailesi, tilakoid-APX (tAPX) ve glioksizom-APX (gmAPX) ve kloroplast stroma-APX (sAPX) dahil olmak üzere en az beş farklı izoforma sahiptir. APX'in, H₂O₂'ye afinitesi (ilgisi) CAT'dan daha yüksektir. ROT'ların yok edilmesinde diğer antioksidatif enzimlere göre daha önemli bir rol almaktadır (10).

Glutasyon redüktaz (GR), hem prokaryotlarda hem de ökaryotlarda bulunan bir flavo-protein oksiredüktazdır. ASH-GSH döngüsünün temel enzimidir. ASH-GSH döngüsünde GSH'ın indirgenmiş durumunun sürekliliğini sağlamaktadır. Böylece ROT'lara karşı savunma sisteminde önemli rol oynamaktadır. Esas olarak kloroplastlarda bulunmakla beraber bir miktar mitokondri ve sitozolde de bulunmaktadır. GR, glutasyon-disülfid (GSSG)'in glutasyona (GSH) dönüşmesini sağlar (Şekil 1.3.). GR oksidatif strese karşı savunma sisteminde görev alırken, glutasyon sülfidril (-SH) gruplarının ve glutasyon S-transferazlar enzimleri için substrat devamlılığını sağlayarak hücre sistemi içerisinde önemli rol oynamaktadır. GR ve glutasyon strese toleranslı bitkilerin belirlenmesinde çok önemli rol oynamaktadır (10).

Tuzluluk, kuraklık ve sıcaklık gibi abiyotik stresler altındaki bitkilerde bulunan ve streslere cevap veren ROT savunma mekanizmaları Şekil 1.4.'de gösterilmektedir. Bu savunma mekanizmalar hemen hemen birçok hücrel kompartımanlarda bulunmaktadır. Su-su

döngüsü kroloplastlarda (Şekil 1.4.-A), askorbat-glutatyon döngüsü kloroplast, sitozol, mitokondri, apoplast ve peroksizomlarda (Şekil 1.4.-B), glutatyon peroksidaz döngüsü (Şekil 1.4.-C) ve katalaz (CAT) (Şekil 1.4.-D) peroksizomlarda bulunmaktadır.

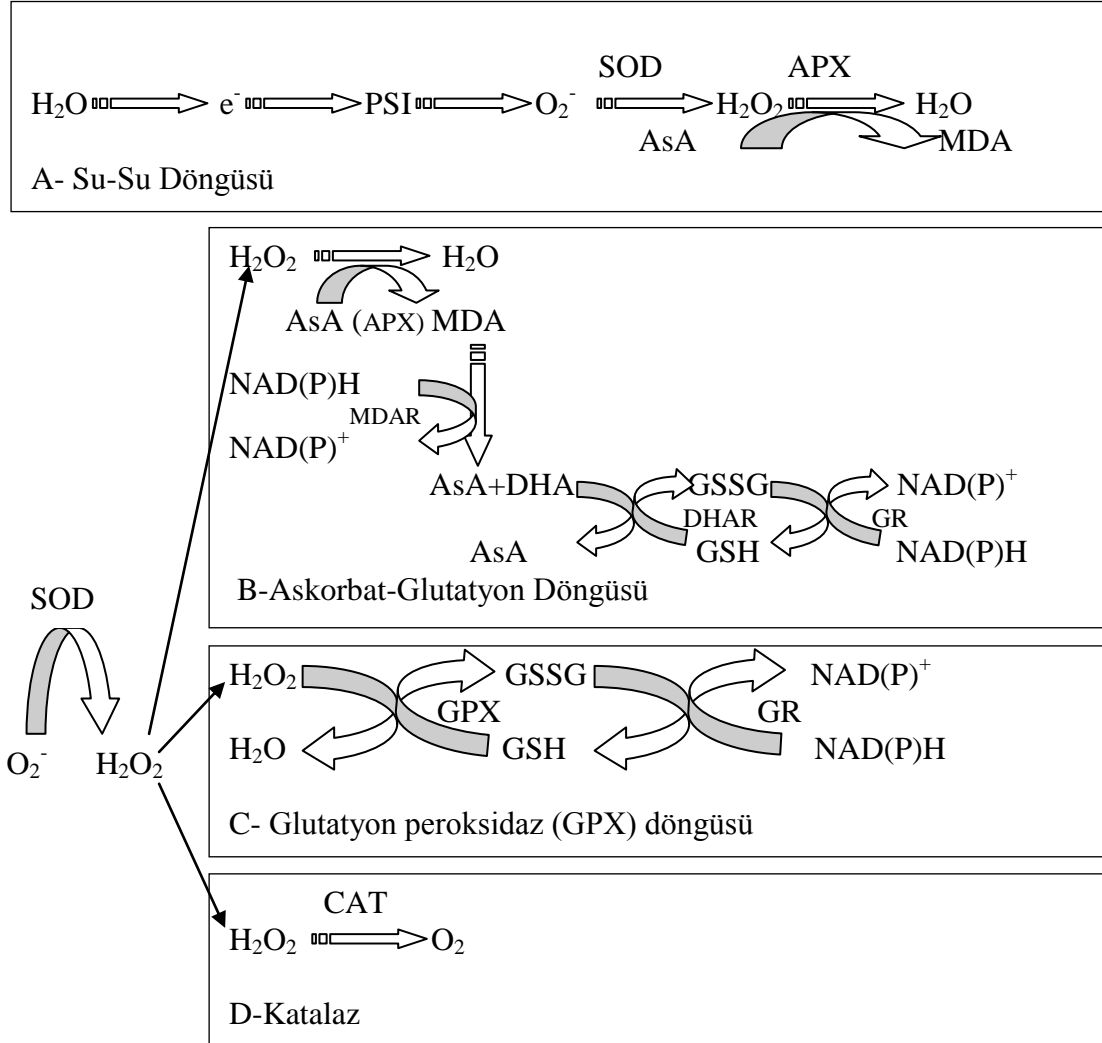


Şekil 1.3. Glutatyon redüktaz ve hüresel redoks (ASA: Askorbat, DHA: Dihidroksi askorbat, GSH: redükte glutatyon, GSSH: okside glutatyon) (10)

Süperoksit dismutaz (SOD) süperoksit radikallerinin (O_2^-) hidrojen peroksitine (H_2O_2) dönüşümünde ilk rolü oynar. Daha sonra bunu takiben hidrojen peroksitin (H_2O_2) deoksidasyonu için APX, GPX ve CAT enzimleri devreye girer. Katalazın (CAT) aksine APX ve GPX enzimleri askorbat ve/veya glutatyon oluşum döngüsüne ihtiyaç duyarlar (Şekil 1.4.A-C). Bu döngü elektronları direkt olarak kloroplastlardan ve/veya NAD(P)H indirgenmesinden açığa çıkan enerjiden kullanır.

ii) İyon dengesi: Tuzluluk, K^+/Na^+ oranının değişimi sonucunda oluşan artan Na^+ ve Cl^- konsantrasyon ile bitkilerde iyon spesifik streslere neden olmaktadır. Bitkilerde iyon oranının değişimi K^+/Na^+ oranının bozulmasıyla oluşmaktadır. Bitkilerin yüksek tuz konsantrasyonunda büyümelerini sürdürebilmeleri için sitozoldeki K^+/Na^+ oranı anahtar rol oynamaktadır. Bitkiler, sitozoldeki K^+/Na^+ oranını korumak için: Na^+ iyonlarının hücre içerisine girişini azaltmak, Na^+ iyonlarını hücre dışında tutmak ve Na^+ iyonlarını vakuollerde biriktirmek gibi farklı stratejiler kullanmaktadır. Bu iyon mekanizmaları düşük NaCl konsantrasyonlarında tolerans için bir derece olarak sağlansa da, yüksek tuz konsantrasyonlarında anahtar metabolik yolların ve büyümenin inhibasyonu sonucu bu mekanizmalar çalışmamaktadır (11).

iii) Osmolitlerin biyosentezi: Tuz stresi altında, bitkiler tuz alınımını kısıtlar ve osmolitlerin biyosentezi ile osmotik basıncı ayarlar.

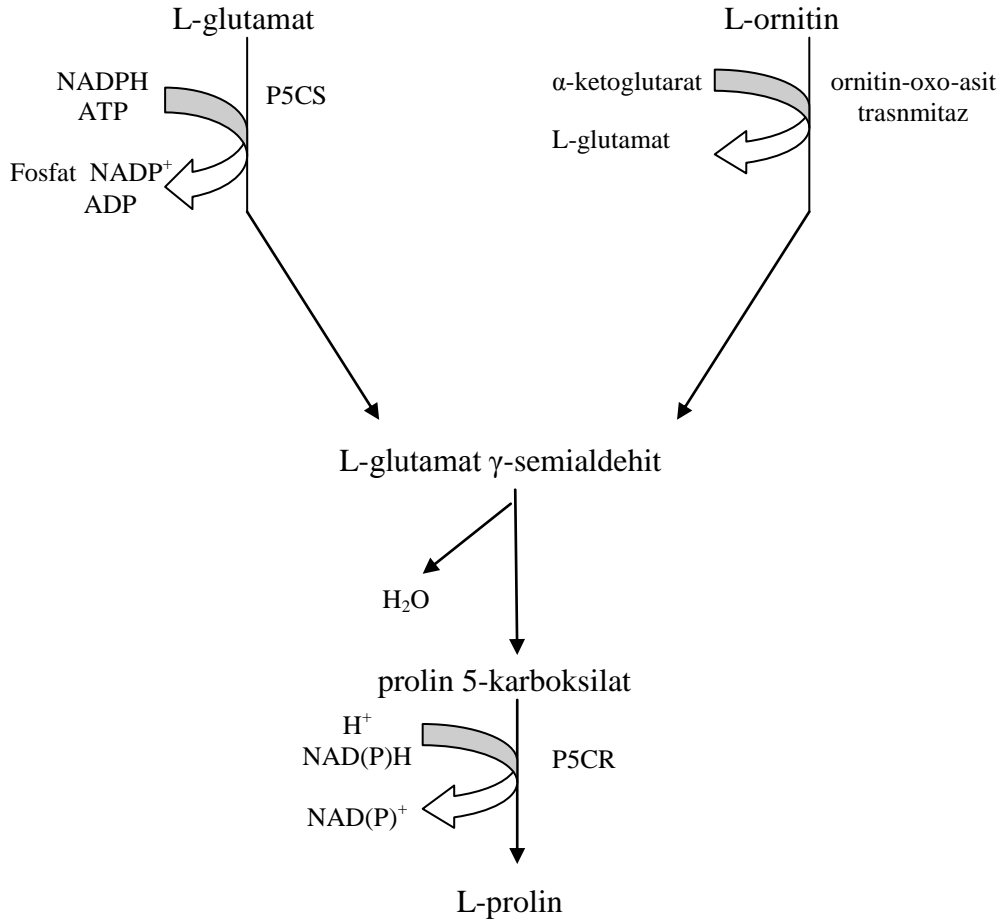


Şekil 1.4. Bitki hücresinde reaktif oksijen türlerine karşı savunma mekanizmaları veya yolları (12). A) Su-su döngüsü. B) Askorbat-glutatyon döngüsü. C) Glutatyon peroksidaz döngüsü. D) Katalaz aktivitesi. Kısaltmalar: PSI, fotosistem I; AsA, askorbat; MDA, monodihidroaskorbat; DHA, dihidroaskorbat; DHAR, dihidroaskorbat redüktaz ; GSH, redükte glutatyon; GSSH, okside glutatyon; MDAR, MDA redüktaz.

Osmolitler düşük moleküler ağırlığı ve hücre içerisinde yüksek konsantrasyonda bile genellikle toksik olmayan yüksek çözünürlükleri olan moleküllerdir (9). Bu osmolitler prolin, sükröz, hidroksil grubu içeren alkoller, trehaloz ve glisin- betain, kuanerter amonyum (Glisin betain, alenin betain, prolin betain, hidroksilprolin betain ve kohlin O-sülfat) dur (13). Prolin bitkileri osmotik stresten koruyan en önemli osmolitlerden biridir. Tuz stresi altında, doku içerisinde biriken prolinin osmotik basıncı ayarlama, strese direnç sonrası büyüme için karbon ve azot rezervi, amonyumların detoksifikasyonu, hücre zarının stabilizasyonu, foto sentetik aktivite ve mitokondriyal fonksiyonların korunması ve serbest

radikallerin yok edilmesi gibi birçok fonksiyonu vardır. Ayrıca prolin miktarı (birikimi) türlere göre değişmektedir (9).

Bitki hücreleri içerisinde prolin birikimi; diğer amino, imino asitler ve protein yapısına katılmayan amino asitlerden olan sitrulin ve ornitin (ornithine) gibi amino asitlere göre daha fazladır. Prolin birikimi normal olarak sitozol içerisinde oluşur. Osmotik olarak çok aktif olan prolin özellikle NaCl'nin bitki hücresinin membranında oluşturacağı zararı azaltır ve hücre membranının stabilitesinin korunmasına yardımcı olur. Yüksek yapılı bitkilerde prolin biyosentezi L-ornitin (ornithine) ve L-glutamat (glutamate) olmak üzere iki alternatif yol ile gerçekleştirilir (Şekil 1.4.). Ayrıca bitkilerde olduğu gibi, memelilerde ve mikroorganizmalarda da L-glutamat (glutamate) ve L-ornitin (ornithine) prolin biyosentezindeki öncü moleküllerdir (14).

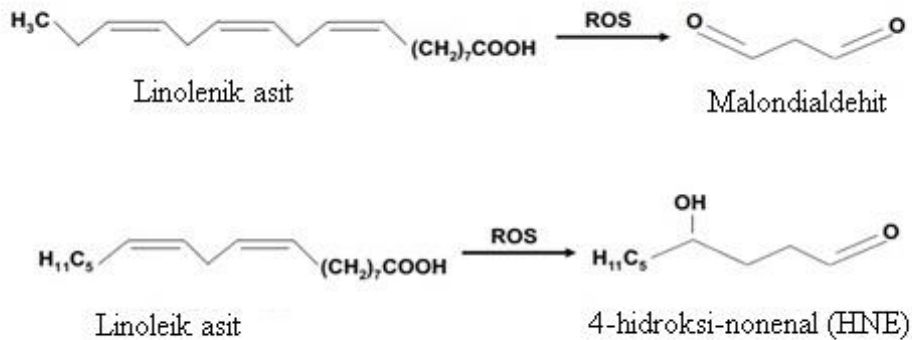


Şekil 1.5. Prolin biyosentez yolağı (14)

İki enzim prolin-5-karbolsilat sentetaz (P5CS) ve prolin-5-karbolsilat redüktaz (P5CR) prolin biyosentez yolağında temel rol oynamaktadır (Şekil 1.5.). Prolin miktarı bitkilerin

tuz stresine karşı toleransının belirlenmesi noktasında önemli bir parametre olarak literatürde gösterilmektedir.

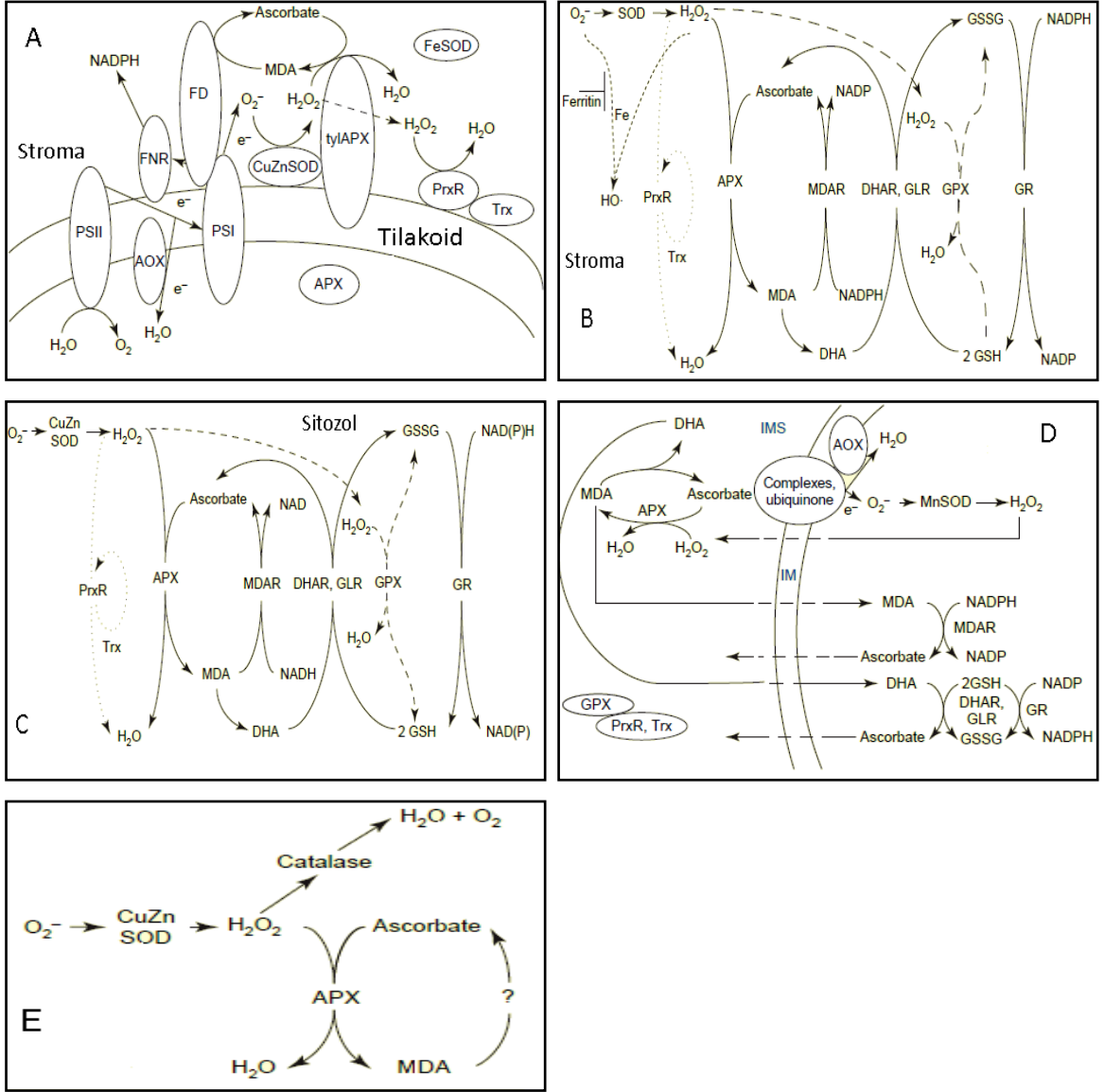
Literatürde gösterilen bir diğer önemli parametre ise hücre zarında bulunan yağların (lipidlerin) peroksidasyonudur. Yağların peroksidasyonu, yaşayan her canlı organizmada meydana geldiği bilinen en zarar verici işlemler olarak nitelendirilmektedir. Çeşitli stresler altında, hücre zarındaki yıkımı, bazen lipid yıkım seviyesinin tek belirleyicisi olarak ele alınır. Şimdilerde, lipid peroksidasyon sırasında seviyesinin belirlenmesinde çoklu doymamış öncü maddelerin (ketonlar, malondialdehit (MDA) ve ilişkili diğer bileşenler gibi küçük hidrokarbon fragmentleri) kullanılabileceği fark edilmiştir. Bu bileşiklerden bazıları tiobarbitürik asit (TBA) ile renk oluşturacak bir bileşik için etkileşime girerler. Lipid peroksidasyon başlama, ilerleme ve sonuçlanma olmak üzere 3 aşamada gerçekleşir. Linoleik (18:2) ve linolenik (18:3) doymamış yağ asitleri hücre zarına akışkanlık özelliği kazandıran temel bileşenlerdir (9). Reaktif oksijen türleri (özellikle HO· ve 1O_2 gibi) doymamış yağ asitlerine saldırıda bulunurlar. Devam eden lipid peroksidasyon, hücre zarındaki akışkanlık, geçirgenlik ve hücre zarında bulunan proteinlerin yapısının bozulmasına neden olur. Bu yağ asitlerini peroksidasyonu sonucu keto yağ asitleri, 4-Hidroksi-2-nonenal (HNE) ve malondialdehit (MDA) oluşur (Şekil 1.6.). Aldehitlerin kırılması sonucu oluşan bileşikler DNA ve proteinler ile etkileşime girerler. Çeşitli abiyotik streslere maruz kalan bitkilerde reaktif oksijen türlerinin oluşması nedeniyle lipid peroksidasyonda (LPO) artış olduğu belirlenmiştir.



Şekil 1.6. Linoleik (18:2) ve linolenik (18:3) yağ asitlerinin oksidasyonu (ROS: Reaktif oksijen türleri) (9).

Reaktif oksijen türleri kuraklık ve tuz stresleri sırasında bitki hücresinin farklı organellerinde oluşur. Kloroplastlarda fotosistem-I ve fotosistem-II reaksiyonlarının merkezi olan tilakoidler, ROT'ların oluştuğu önemli bir yerdir. ROT'ların foto-ürünleri fizyolojik ve çevresel faktörlerden geniş ölçüde etkilenmektedir. Su stresi altında, stomaların kapanması nedeniyle mevcut karbondioksit (CO₂)'in azalması ve sürekli aşırı ışığa maruz kalma ,elektronların moleküler oksijene transfer edilmesi, ile süperoksit iyonu Mehler reaksiyonu vasıtasıyla fotosistem-I de oluşur. Membranda bulunan bakır-çinko bağlı süperoksitaz (Cu/Zn SOD) oksijen radikallerini hidrojen peroksit (H₂O₂) çevirir daha sonra membrana bağlı bir askorbat peroksitaz (tlyAPX) bu H₂O₂'yi suya çevirir. Bu işlem su-su döngüsü olarak adlandırılır (Şekil 1.7.-A). Bu işlemde, askorbat (AsA) monodehidroaskorbat (MDA)'a okside olur. Okside olan bu MDA daha sonra ferradoksinin (FD) indirgenmesi veya monodehidroaskorbat redüktaz (MDAR) enzimi vasıtasıyla NADP(H)'in katalizlenmesi sonucunda tekrar askorbata (AsA) indirgenir. Dehidroaskorbat (DHA), MDAR'ın MDA'yı AsA'a indirgemesinde başarısız olduğunda oluşur ve indirgenmiş glutatyon (GSH)'dan elektron alan dehidroaskorbat redüktaz (DHAR) enzimi vasıtasıyla askorbata (AsA) indirgenir. PrxRs ve tiyrodoksin (Trx)'le birlikte tilakoid membranı ile ilişki halindedir. Bu ikili kloroplastlarda fotokimyasal olarak üretilmiş H₂O₂'in detoksifikasyonu için su-su döngüsüne alternatif bir antioksidan koruma sağlayabilir. Pereyodoksinin (Prx) ve tiyrodoksinin (Trx) kuraklık ve oksidatif stres sırasında önemli rol oynadıkları gösterilmiştir (15). Tek oksijen (¹O₂), fotosistem-II'de oluşur (Şekil 1.7.-A). ¹O₂'nin sitotoksitesi, lipid peroksidasyona ve yapraklarda foto-oksidatif şartlar altında geniş doku hasarlarına neden olur. Ayrıca büyümeyi engelleyici ve letaliteyi uyarıcı metabolik yolları (genetik programları) aktif hale geçirebilir. Peroksizomlar bir çok metabolik işlem sırasında yüksek oranda H₂O₂ ve O₂⁻ üretirler (Şekil 1.7.-E). Peroksizomlardaki reaktif oksijen türleri miktarı, üretme ve yok etme mekanizmaları arasındaki çok hassas bir denge ile düzenlenmektedir. Su stresi altında, mezofil hücrelerinde mevcut su ve karbondioksit (CO₂) azalır. Kloroplastlarda ise fotorespirasyon ve glutatyon artar. Peroksizomlarda glutatyon redüktaz vasıtasıyla glutatyonun oksidasyonu, fotorespirasyon sırasında oluşan H₂O₂'nin miktarını için hesaplanır. Peroksizomlardaki diğer H₂O₂ kaynakları da yağ asitleri, flavin oksidaz yolağı ve süperoksit radikallerinin dismutasyonudur. Katalazlar (CAT) esas olarak peroksizomlarda lokalize olmuş H₂O'ın detoksifikasyonunda görev alan önemli antioksidatif enzimlerdir. Askorbat ve indirgenmiş glutatyon döngüsü ayrıca peroksizomlardaki H₂O₂'nin yok edilmesin de katkıda bulunabilir. Mitokondriler,

kloroplastlar ve peroksisomlar ile kıyaslandığında daha az miktarda reaktif oksijen türleri üretseler de, bir ROT kaynağı olarak bilinirler. Mitokondrilerdeki, elektron taşıma sistemleri olan kompleks-I ve kompleks-III'ler ROT'ların bulunduğu önemli yerlerdir (Şekil 1.7.-D) (15).



Şekil 1.7. Bitki hücreinde reaktif oksijen türlerinin oluşum ve yok etme yollarının lokalizasyonu (16). A) Kloroplast tilakoidi, B) Kloroplast stroması, C) Sitozol, D) Mitokondri, E) Peroksisom Kısaltmalar: PSI, fotosistem-I; PSII, fotosistem-II; MDA, monodialdehit; tly, tilakoid; CuZn SOD, bakır-çinko bağlı süperoksitdismutaz; Fe-SOD, demir bağlı süpeoksitdismutaz; Fd, ferrodoksin; FNR, ferrodoksin NADPH redüktaz; APX, askorbat peroksidaz; tly-APX, tilakoid askorbat peroksidaz; Prx, perodoksin; Trx, tiyerodoksin; AOX, alternatif oksidaz; GSSG, glutatyon disülfid; GSH, indirgenmiş glutatyon; GR, glutatyon redüktaz; GPX, glutatyon peroksidaz; MDAR, MDA redüktaz; DHAR, DHA redüktaz; DHA, dihidroaskorbat; GLR, glutiyerodoksin; IM, membran içi; IMS, membran içi bölge.

Mutasyon, genlerin yeni varyantlarının (allel genler) oluşmasını sağlayan doğal bir işlemdir. Mutasyon tüm organizmalarda (bitkilerde dahil) genetik varyasyonun birincil kaynağıdır. Varyasyon (çeşitlilik), doğal seleksiyon ve evrimin itici gücü için ham madde oluşumunu sağlamaktadır (17).

Bir populasyonda bitkiler arasındaki genetik varyasyon (çeşitlilik) başarılı bir bitki ıslahı için ön koşuldur. Bitki ıslahında doğal genetik varyasyon, ham madde olarak uzun zaman kullanılmıştır. Böyle varyasyonlar kendiliğinden oluşan mutasyon ve hibridizasyonun ürünleridir. Bunu takiben rekombinasyon ve doğal seleksiyon gelmektedir. Hibridizasyon, rekombine karakterleri ve seleksiyon için istenilen genetik varyasyonu oluşturmak üzere uzun bir süre kullanılmıştır. Ancak mutasyonların, evrimdeki itici gücü henüz bu yüzyılın başında anlaşılabilmiştir (18).

Mutagenesis, bitkilerde çeşitli biyotik ve abiyotik stres faktörlerine karşı kalitatif ve kantitatif özellikleri geliştirmek amacıyla faydalanılan, hem doğal hem de insanlar tarafından oluşturulan bir tekniktir. Doğal yollarla oluşan mutasyon basit olmasına rağmen, oluşan mutasyon frekansı düşüktür ve öldürücü niteliği yüksektir. Bu yüzden seleksiyon çok zordur (19).

Bitkilerde öncelikle mutasyon oluşturmak için X ışınları kullanılmıştır. Bundan çok sonraları gama (γ) ışınları ve ayrıca hızlı ve termal nötronlar kullanılmaya başlanmıştır (18). Birçok mutasyon oluşturma çalışmalarında, gama (γ) ve X ışınları kullanılmaktadır (Çizelge 1.3). Burada ana faktör ışınlama sırasında bitki materyelinin dayanabileceği doz (bitki materyelinin absorblayabileceği radyasyon miktarı) dur. Radyasyon doz miktarının birimi gray (Gy) dir. Bir gray (Gy), ışınlanan materyalin her bir kilogramının absorbladığı 1 J (Joule)'lük enerjiye eşittir. Radyasyon dozları, yüksek (> 10 kGy), orta (1-10 kGy), düşük (< 1 kGy) olmak üzere 3 kategoriye ayrılmaktadır (20). Yüksek dozlar gıda sterilizasyon için, düşük dozlar (genellikle 60-700 Gy) ise tohum materyallerinde mutasyon oluşturmak için kullanılmaktadır (18). Işınlanabilecek bitki materyalleri; kuru ve dormant tohumlar, yumrular, bitki soğanı, çiçek soğanı, bitki filizi, polen taneleri, dokular veya hücrelerdir. Kuru ve dormant tohumlar mutasyon indüklenmesi (uyarılması) için kullanılan en yaygın biyolojik materyallerdir. Çünkü kuru ve dormant tohumlardaki hücrelerin büyük bir bölümü hücresel bölünme fazı (G_1) bakımından senkron haldedirler (18).

Gama ışınları, biyolojik çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Gama ışınları radyoaktif atom çekirdeğinin parçalanması ve atom altı parçacıklarının bozulması sonucu oluşurlar (Şekil 1.8.).

Çizelge 1.3. Farklı radyasyon kaynakları ile geliştirilmiş mutant çeşitlerin resmi sayısı (21)

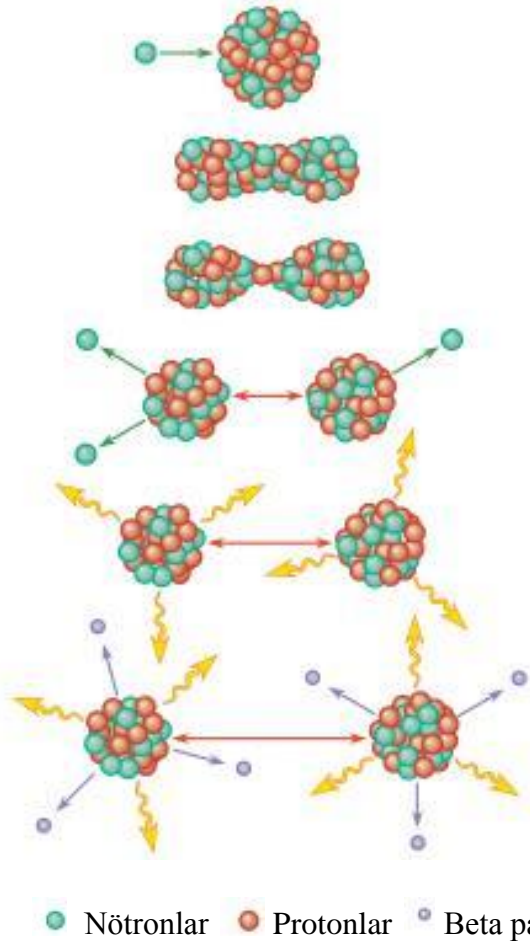
| Mutajen Tipi | Oluşturulan mutant çeşitler | Toplamdaki yüzdesi (%) |
|------------------|-----------------------------|------------------------|
| Radyasyon* | 1411 | 100.00 |
| Gama ışınları* | 910 | 64.49 |
| X ışınları* | 311 | 22.04 |
| Gama kronik | 61 | 4.32 |
| Hızlı nötronlar | 48 | 3.40 |
| Termal nötronlar | 22 | 1.56 |
| Diğerleri | 24 | 1.70 |

* Çeşitli radyasyon uygulamaları dahil

Gama ışınlarının biyolojik etkisinin temeli atomlar veya moleküller ile karşılıklı etkileşime girmesidir (22). Özellikle su ile etkileşime girerek serbest radikallerin oluşumunu sağlar. Bu serbest radikaller bitki hücrelerini yıkarlar veya hücre içeriğini önemli modifikasyonlara uğratırlar. Ayrıca bu radikaller gama ışın dozuna bağlı olarak bitkilerde morfolojik, anatomik, biyokimyasal ve fizyolojik farklılaşmalara neden olurlar (22). Gama ışınları ile ışınlama fizyolojik ve genetik değişkenliğin oluşumunda yeni bir yaklaşım sağlamaktadır. Böylece, kantitatif kalıtsal karakterlerin oluşumunda kullanılmaktadır. Bitkiler üzerinde kullanılan düşük doz iyonize radyasyon ile birlikte *in vitro* çalışmalar; hücre çoğalması, hücre bölünmesi, enzim aktivitesi, stres direnci ve mutasyon uyarılmasının hızlandırıldığını göstermiştir. Mutasyon uyarılması, ekonomik öneme sahip türlerin çeşitliliğinin artırılması noktasında fırsatlar veya yüksek verimliliğe sahip potansiyel genotiplerin geliştirilmesini sağlayabilmektedir.

Bitki türlerini geliştirmekte kullanılan ıslah, genetik varyasyon ve seleksiyon olmak üzere iki temel prensibe dayanır (23). İstenilen özellikleri taşıyan kültür bitkilerini geliştirmek için bitki ıslahı genetik varyasyona ihtiyaç duyar. Radyasyon veya kimyasallar gibi mutajenik ajanlar mutasyonu sağlamak ve genetik varyasyonu oluşturmak için kullanılabilir. Bu mutajenler farklı etki mekanizmalarına sahiptirler (24). Kimyasal ve/veya radyasyon tabanlı *in vitro* mutagenesis ile *in vitro* seleksiyon farklı bitkilerde tuzluluk ve

kuraklık gibi agronomik özelliklerin geliştirilmesinde başarı ile kullanılmaktadır. Şu anda bu teknikler klasik ıslah metodlarının önemli bir tamamlayıcısı olarak görülmektedir.



Nötron çekirdeğe vurur ve çekirdek tarafından absorblanır (emilir).

Absorblanan (emilen) nötron çekirdekte deformasyona neden olur.

Yaklaşık 10^{-14} saniye içerisinde deformasyon çekirdeğin tekrar eski haline gelemeyecek duruma getirir.

Çekirdek fizyonu ile iki veya üç nötron salınımı gerçekleşir.

Yaklaşık 10^{-12} saniye içerisinde, fizyon fragmenti kinetik enerjisini kaybeder ve gama ışınları etrafa yayılır. Bu fragmentlere fizyon ürünleri denir.

Fizyon ürünleri radyoaktivite ile enerjilerini kaybeder, partiküller uzun bir zaman periyodu içerisinde yayılmaya devam eder (saniyelerden yıllara doğru).

Şekil 1.8. Gama ışınlarının oluşumu (25).

Bitki hücre, doku ve organlarının içerisinde seleksiyon ajanı içeren besi ortamında *in vitro* kültürü, istenilen özellikleri taşıyan bitkilerin seleksiyonu ve rejenerasyonu için fırsat sağlamaktadır. Ayrıca bu teknikten, istenilen fenotipin büyümesi ve yaşamasına izin veren bazı seleksiyon ajanları kullanılarak toleransın uyarılması için etkili bir şekilde faydalanılmaktadır (26). *In vitro* seleksiyon için genel olarak kullanılan ajanlar: NaCl (tuza tolerans için), PEG veya mannitol (kuraklığa tolerans için), spesifik fungal kültür, fusarik asit ile patojenin kendisi gibi fitotoksinlerdir. Eksplantlar kültür ortamlarına ilave edilmiş bu geniş aralıktaki seleksiyon ajanlarına maruz bırakılır. Sadece bu ortamlarda yaşayabilme kabiliyeti olan eksplantlar seçilir. İki tür seleksiyon metodu önerilmiştir (26).

i) Adım adım kademeli olarak kültürün maruz bırakıldığı seleksiyon ajanının konsantrasyonunu artırmak (Uzun dönem uygulaması).

ii) Kùltürü direkt yüksek konsantrasyonda seleksiyon ajanına maruz bırakmak. Burada yaşayan kùltür seleksiyon ajanına toleranslıdır (Şok uygulama) (26).

In vitro seleksiyon ile seleksiyon ortamından istenilen özellik kısa bir zaman ve minimum çevre etkileşimi içerisinde selekte edilebilir ve *in vitro* seleksiyon tarla seleksiyonunun tamamlayıcısı olabilir (27).

Mutagenesis (mutasyon oluşturma) baklagil bitkilerinde genetik çeşitliliğin artırılmasında da güçlü bir araçtır. Gama ışınlanması, baklagil türlerinde abiyotik strese toleranslı mutantların oluşturulmasında başarıyla kullanılmaktadır (22) . Baklagiller dünya çapında tarımı yapılan bitkiler arasında en önemlisidir. Baklagillerin çevre, tarım, insan ve hayvan beslenmesi üzerine önemli etkileri vardır. Biyotik ve abiyotik stresler baklagillerde önemli ürün kayıplarına neden olmakta ve verimliliklerini önemli bir şekilde etkilemektedir (28). Doku kùltürü, *in vitro* mutagenesis, genetik transformasyon gibi biyoteknolojik araçlar bu kısıtlamaların çözülmesinde veya azaltılmasında katkıda bulunmaktadır. Toprak tuzluluğu dünya çapındaki baklagillerin üretimini sınırlandıran birçok abiyotik stres faktörlerinden biridir. Bu sorun kurak ve yarı kurak bölgelerde daha şiddetli görülmektedir. Tuzlu topraklar drenaj sistemlerinin kurulması, uygun su idaresi ve yıkama gibi yöntemlerle ıslah edilebilirlerse de bu son derece zor ve masraflıdır (7). Bu nedenle, tuzlu alanlarda yetiştirilen ürünler için tuza toleranslılık zorunlu hale gelmiştir. Dünyada genişleyen tuzlu alanlarda tuza toleranslı bitkilerin tuza hassas olanların yerine tercih edilmesi hala uygulanmaktadır. Tuza toleranslı bitkileri geliştirmek tuzluluk görülen bölgelerden faydalanmanın en etkili ve ekonomik yoludur.

Bu tez çalışmasında, yetiştirilen yem bitkileri içerisinde tuza en dayanıklı tür ve baklagiller familyasından olan korunga (*Onobrychis viciifolia* Scop.) bitkisinin ekotiplerinin NaCl tuzluluğuna karşı tepkilerinin belirlenmesi, gama radyasyonu kullanılarak oluşturulacak mutagenesis ile tuza toleranslı yeni korunga genotiplerinin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Çalışmamızın nihai hedefi; toprak ve su tuzluluğu stres faktörüne karşı toleransı yüksek yerli korunga hatlarının geliştirilmesi ve çeşit ıslahıdır.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Bitkilerde Tuz Stresine Karşı Tepkilerin Belirlenmesi

Yüksek ve düşük sıcaklık, kuraklık, alkalilik ve tuzluluk gibi geniş bir aralıktaki çevresel stres faktörleri bitkiler için potansiyel birer tehdittirler. Bitki gelişimini ve verimliliğini önemli ölçüde sınırlayabilen toprak ve sudaki tuz stresi, özellikle kurak ve yarı kurak alanlarda görülen temel stres faktörlerinden biridir.

Tuzluluğun bitki büyümesi üzerine zararlı etkileri: 1) Topraktaki düşük osmoz potansiyeli (su stresi), 2) besin dengesizliği, 3) spesifik iyon etkisi (tuz stresi) veya bu faktörlerin kombinasyonu şeklinde sıralanabilir. Bütün bu faktörler bitkinin büyümesi ,fizyolojik ve biyokimyasal seviyedeki gelişimi üzerine olumsuz etkilere neden olur (29). Tuz stresi altında gelişimi devam ettiren bitkilerde, fotosentez, protein sentezi, enerji ve yağ metabolizmaları gibi bütün temel veya önemli işlemler etkilenmektedir. Bitkilerde çevresel streslere karşı direnç oluşurken bu durumdan kurtulmasına olanak sağlayan ya tolerans ya da bir mekanizma ortaya çıkmaktadır. Bitkiler hayat döngüsü sırasında streslerden kaçınmak için bütün bir bitki mekanizması kullanıyor olmasına rağmen, tolerans hücresele seviyede de oluşabilmektedir. Tuz stresi sırasında bitkiler ya dormanside kalmalı ya da hücresele seviyede ayarlama yapmalıdırlar. Hücresele seviyede ayarlamaya örnek, hücre içerisine su alınımının ve hücre içi turgorun devamı için hücre içi osmotik potansiyelin düşük seviyelerde tutulması işlemidir (14).

Bitkilerde tuz stresine karşı toleransın belirlenmesinde moleküler, fizyolojik, biyokimyasal ve tarımsal olmak üzere çok sayıda parametre kullanılmaktadır. Ancak moleküler tepkilerin karmaşık bir yapı göstermesi ve bu tepkilerin tam anlaşılammış olması nedeniyle bitkilerde tuza toleransın belirlenmesinde diğer fizyolojik, biyokimyasal ve tarımsal parametreler kullanılmaktadır. Tuza toleranslı bitkileri belirlemede ürün miktarı, bitki boyu, yaprak yüzeyi, yapraktaki yaranma, hayatta kalma, bağıl büyüme oranı ve bağıl büyüme gibi klasik tarımsal parametreler kullanılmaktadır (30). Ancak fizyolojik parametreler, tarımsal parametrelere göre daha objektif ve güvenilir sonuçlar vermektedir (30). Bu fizyolojik parametreler; antioksidatif enzimler başta olmak üzere, enzimatik olmayan antioksidanlar (Askorbat, vitamin C, α -tokoferoller), K^+/Na^+ ve Ca^{2+}/Na^+ oranı, fotosentez (klorofil miktarı), bağıl su potansiyeli, osmolitler ve osmotik koruyucular

(aminoasitler (prolin), kuarterner amanyum bileşikler (glisin-betain), plioller (mannitol), karbonhidratlar (trehaloz ve sükröz) ve hücre membranlarındaki yağların peroksidasyonu dur.

Bitkiler yüksek miktarda tuz bulunan ortamlarda gelişim veya büyüme yeteneklerine göre glikofitler ve halofitler olarak sınıflandırılmaktadırlar. Birçok bitki glikofitler sınıfına girmektedirler ve bunlar tuz stresine karşı toleranslı değillerdir. Baklagil familyasında (Fabaceae veya Leguminosae) özellikle tuzluluğa karşı duyarlıdır (31). Baklagiller çiçekli bitkilerin 3. büyük familyasıdır. 650 cins ve 18000 türe sahiptir (32). Yeryüzündeki baklagillerden insan yiyeceği, hayvan yemi, yeşil gübre, kereste, sakız ve yağ endüstri ham maddesi gibi çeşitli yönlerden yararlanılmaktadır. Türkiye dünyadaki en önemli baklagillerin gen merkezlerinden biridir.

Korunmasında içerisinde bulunduğu bu önemli bitki familyasının üyeleri ve bazı bitki türlerinde yapılan tuz stresine karşı tepkilerin belirlenmesine ait kaynak özetleri tarih sırasına göre aşağıda özetlenmiştir.

Hernandez ve arkadaşları (1999), bezelyede (*Pisum sativum* cv. Puget) farklı NaCl dozlarının (0, 70, 90, 110, 130, 140, 150 ve 160 mM) bitki yaprağındaki su içeriği ile antioksidatif enzimler (SOD, APX, GR, MDHAR ve DHAR) üzerine etkisini araştırmışlardır. Çalışmalarında ayrıca mineral (Na, K, Mg, Fe, Cu ve Zn) içeriği, askorbat ve glutatyon ile klorofil içeriğini analiz etmişlerdir. Analiz sonucunda tuz stresinin klorofil içeriğinde hızlı bir düşüşe neden olduğunu, osmotik potansiyel ve yaprak su içeriğinde azalma olduğunu, antioksidatif enzimlerin aktivitelerinde artma olduğunu, 160 mM NaCl dozunda tilakoid ve kloroplastlarda yıkım oluşmaya başladığını bildirmişlerdir. 130 ile 160 mM NaCl dozları arasında tuz stresine maruz kalmış bitkilerde, tuz stresinin tetiklediği oksidatif stresin üstesinden, oluşan antioksidan tepki ve büyümelerinde meydana getirdikleri yavaşlama ile gelebildiklerini rapor etmişlerdir (33).

Hernandez ve arkadaşları (2000), nohutta (*Cicer arietinum* L.) uzun süreli tuz stresinin antioksidatif savunma mekanizması üzerine etkisini araştırdıkları çalışmada, iki nohut çeşidi ('Challi' ve 'Granada') kullanmışlardır. Bu çeşitlere 15 gün boyunca 70 mM NaCl uygulaması yapmışlardır. Çalışmalarında antioksidatif enzimler (SOD, APX, GR, MDHAR, DHAR ve PHGPX) ve bu enzimlerin gen ekspresyon seviyelerini analiz

etmişlerdir. Tuza daha duyarlı olan 'Challi' çeşidinin tuz stresi karşısında GR, MDHAR ve APX gibi enzimlerinin aktivitelerinin ve bu enzimlerin gen ekspresyon seviyelerinin önemli derecede artmadığını tespit etmişlerdir. Her iki çeşitte de askorbat-glutasyon içeriğinin azaldığını bulmuşlardır. Tuza toleranslı çeşitte 'Granada' mitokondri ve kloroplastlarda bulunan SOD, GR ve APX aktivitesinin önemli derecede arttığını bildirmişlerdir (34).

Hernandez ve Almansa (2002), bezelyede (*Pisum sativum* L.) kısa dönem tuz stresinin büyümeye, su içeriği ve bazı antioksidatif enzimlerin (SOD, APX, GR) aktivitesi üzerine etkisini araştırmışlardır. 48 saat boyunca denemedeki bitkilere 70 mM NaCl uygulamışlardır. Çalışma sonucunda 48 saatten sonra SOD aktivitesinde önemli bir artış olduğunu, APX aktivitesinin stres koşulları boyunca değişmediğini ancak stres kalktıktan 8 saat sonra kontrol grubuna göre % 48'lik bir artış gösterdiğini saptamışlardır. GR aktivitesinin 24 saat geçtikten sonra % 71'lik bir önemli artış gösterdiğini ve stres koşulları bittikten sonra bile bu önemli derecede artışın devam ettiğini tespit etmişlerdir. Büyüme ve su içeriğinin iyon dengesine bağlı olarak azaldığını ifade etmişlerdir. Lipid peroksidasyonun stres başladıktan 8 saat sonra hızlı bir şekilde arttığını, yine daha sonra stres sırasında hızlı bir oranda azaldığını ifade etmişlerdir. Süpriz bir şekilde bitki, stresten kurtulduktan 8 saat sonra lipid peroksidasyonun % 78'lik bir artış gösterdiğini bildirmişlerdir (35).

Meloni ve arkadaşları (2003), sodyum klorür (NaCl) stresinin iki hibrid pamuk çeşidinde (Guazuncho ve Pora) antioksidan enzimler (SOD, GR ve POD), lipid peoksidasyon (MDA), gaz değişimi ve klorofil içeriği üzerine etkisini araştırmışlardır. 0, 50, 100 ve 200 mM NaCl uygulamasını 21 gün boyunca bitkilere uygulamışlardır. Araştırmaları sonucunda artan NaCl dozuna bağlı olarak antioksidan enzimlerin aktivitelerinde ve lipid peroksidasyon miktarında artış, gaz değişimi ve klorofil içeriğinde azalış tespit etmişlerdir (36).

Agarwal ve Pandey (2004), baklagil familyasından olan sinameki (*Cassia angustifolia* Vahl.) bitkisinde yaptıkları çalışmada tuz stresinin antioksidan enzimlerin üzerine etkisini araştırmışlardır. Araştırmalarında bitkilere 0, 20, 50 ve 100 mM NaCl tuzunu 7 gün boyunca uygulamışlardır. Çalışmada büyüme parametrelerini, içsel Na⁺ ve Cl⁻ iyon konsantrasyonunu, antioksidan sistemi, lipid peroksidasyonu, H₂O₂ içeriğini ve prolin

miktarını analiz etmişlerdir. Analizler sonucunda tuzluluğun büyüme parametrelerini önemli derecede azalttığını, yine artan enzim aktivitesine bağlı olarak H₂O₂ içeriği ile askorbatın azaldığını saptamışlardır. Artan tuz dozuna bağlı olarak prolin ve lipid peroksidasyonun arttığını tespit etmişlerdir (37).

Bandeoğlu ve arkadaşları (2004), mercimekte (*Lens culinaris* M.) tuzun (NaCl) yaprak ve kök hücrelerinde bulunan antioksidan mekanizma üzerine etkisini araştırdıkları çalışmalarında, mercimek bitkisine 0, 100 ve 200 mM NaCl uygulamışlardır. Araştırmada kök ve yaprak dokularındaki hücrelerde meydana gelen antioksidatif enzimlerin (CAT, APX ve GR) aktivitesindeki değişimleri, lipid peroksidasyonu, sürgün ve kök uzunlukları ile yaş ve kuru ağırlıklarını, H₂O₂ içeriğini, prolin miktarını, iyonlardaki değişme sonucu meydana gelen elektriksel iletkenliği analiz etmişlerdir. Çalışma sonucunda kökte bulunan hücrelerde antioksidan mekanizmanın daha aktif bir şekilde çalıştığını, özellikle süperoksit dismutaz (SOD) ve askorbat peroksidaz (APX) enzimlerinin aktivitesinin hızla arttığını tespit etmişlerdir. Ayrıca artan tuz dozlarında hem kökte hem de sürgünde boyların kısaldığı, yaş ve kuru ağırlığının azaldığı, kök ve yaprak hücrelerinde ise prolin miktarının arttığını belirtmişlerdir. Yaprak hücrelerinde H₂O₂ içeriğine bağlı olarak lipid peroksidasyonun ve elektriksel iletkenliğin arttığını, kök hücrelerinde ise bu parametrelerin daha az etkilendiğini rapor etmişlerdir (38).

Gomez ve arkadaşları (2004), bezelyede (*Pisum sativum* cv. Puget) kloroplast organelinde bulunan süperoksit dismutaz (SOD) ve askorbat peroksidaz (APX) enzimleri ve bunların izoformlarının uzun süreli tuz stresi altında tuz stresinden nasıl etkilendikleri ve lokalizasyonları üzerine yaptıkları araştırmalarında, bitkilere 2 hafta boyunca 0, 70, 90 ve 110 mM NaCl dozu uygulamışlardır. Araştırmada SOD ve APX enzimleri ile bunların izoformlarını analiz etmişlerdir. Araştırma sonucunda tilakoidte bulunan Fe-SOD izoformunun 70 mM ve üzerinde aktif hale geldiğini, CuZn-SOD'un ise 90 mM ve üstünde aktif hale geldiğini tespit etmişlerdir. NaCl stresi aynı zamanda stromada bulunan bu iki SOD izoformunu da aktif hale getirdiğini saptamışlardır. APX izo-formlarının ise tuz stresi altında tilakoid ve stromada farklı davrandıklarını, 70 mM ve üzerinde stromada APX aktivitesinin oluştuğunu tespit etmişlerdir. Tilakoid de 70 ve 110 mM arasındaki tuz dozunda APX'in aktivitesini önemli derecede kaybettiğini rapor etmişlerdir (39).

Jungklang ve arkadaşları (2004), tuza toleranslı bir baklagil bitkisi olan *Sesbania* (*Sesbania rostrata* Brem. & Oberm.)’da tuz stresine karşı yaprak ve kök hücrelerinde bulunan antioksidatif enzim mekanizmasının verdiği yanıtı tespit etmek amacıyla yürüttükleri çalışmada, bitkilere 12 gün boyunca 0, 50 ve 100 mM dozlarında tuz uygulaması yapmışlardır. Aynı uygulamayı kıyaslama amacıyla aynı familya içerisinde yer alan başka bir baklagil bitkisi olan fasülye (*Phaseolus vulgaris*)’de yapmışlardır. Araştırmada süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), askorbat peroksidaz (APX) ve glutasyon redüktaz (GR) antioksidatif enzimler ile yapraklarda bulunan klorofil içeriğini analiz etmişlerdir. Analiz sonucunda artan tuz dozlarında *Sesbania* (*Sesbania rostrata* Brem. & Oberm.) da hem yaprak, hem de kök hücrelerinde bulunan antioksidatif enzim aktivitesinin ve yapraklardaki klorofil içeriğinin arttığını tespit etmişlerdir. Yüksek tuz dozunda (100 mM) fasülye bitkisinin de ise analiz için yeterli materyal elde edilemediğini rapor etmişlerdir (40).

Jebara ve arkadaşları (2005), tuz stresi altında fasülye (*Phaseolus vulgaris*) genotipinin (BAT477) nodüllerindeki (*Rhizobium tropici* 'CIAT899' ile inoküle edilmiş) antioksidatif enzimlerin (APX, CAT, SOD ve POX) değişimi incelemek amacıyla yaptıkları araştırmalarında, bitkilere 50 mM NaCl tuzu uygulamışlardır. Çalışmada bitki büyümesi, nodülasyon ve azot fiksasyon aktiviteleri ile antioksidatif enzimleri analiz etmişlerdir. Tuz stresi altında bitki büyümesi, azot fiksasyonu ve antioksidan savunma enzimlerinin aktivitesinin etkilendiğini tespit etmişlerdir. Bitkinin, özellikle SOD ve POX’un birlikte çalışması ile tuzun olumsuz etkilerinden korunabileceğini bildirmişlerdir (41).

Azevedo-Neto ve arkadaşları (2006), iki mısır genotipinde tuz stresinin antioksidatif enzimler (CAT, APX, GR, GPX ve SOD) ve lipid peroksidasyon üzerine etkisini araştırdıkları çalışmalarında 100 mM sabit NaCl dozunu 21 gün boyunca uygulamışlar ve belirli zaman aralıklarında enzimlerde ve lipid peroksidasyonda meydana gelen değişimleri incelemişlerdir. İnceleme sonucunda belirli bir artışın olduğunu bildirmişlerdir (42).

Sumithra ve arkadaşları (2006), iki börülce (*Vigna radiata*) çeşidinde ('Pusa Bold' ve 'CO 4') tuz stresinin bitki büyümesine, prolin metabolizmasına ve antioksidatif enzimlerin (APX, CAT, GR, SOD ve MDAR) aktivitesi üzerine etkisini ve hangi çeşidin tuz stresine karşı daha toleranslı olduğunu araştırdıkları çalışmalarında, bitkilere dört farklı NaCl dozunu (0, 100, 200 ve 300 mM) 30 gün boyunca uygulamışlardır. Ölçümleri yaprak ve

kök dokularında yapmışlardır. Araştırmada ayrıca dokulardaki K^+ / Na^+ oranını ve lipid peroksidasyonu ölçmüşlerdir. Tuz stresi altında 'Bold' çeşidinin kök dokusunda K^+ / Na^+ oranını daha yüksek olduğunu, her iki çeşitte de düşük seviyede lipid peroksidasyon ve H_2O_2 içeriği olduğunu, prolin ve glisin-betain miktarının çok yüksek olduğunu, antioksidatif enzimlerin aktivitesinde artış olduğunu tespit etmişlerdir. Araştırma sonucunda tuz stresi altında oluşan oksidatif strese karşı en etkin antioksidatif parametrelere 'Pusa Bold' çeşidinin sahip olduğunu, buna bağlı olarak tuz stresine karşı daha toleranslı olduğunu bildirmişlerdir (43).

Cavalcantia ve arkadaşları (2007), kısa süreli tuz (NaCl) stresi altında börülce (*Vigna unguiculata*) bitkisinin yaprakları ve köklerindeki antioksidatif aktivitenin karşılaştırılması amacıyla yaptıkları çalışmada, bitkileri 3 farklı protokolle 6 gün boyunca 200 mM NaCl ile sulamışlardır. Araştırmalarında yaprak ve kök hücrelerindeki antioksidatif enzimlerin (CAT, SOD ve POX) aktivitesini, Na içeriğini ve lipid peroksidasyonu analiz etmişlerdir. Araştırma sonucunda tuz uygulamasının sürekli ve kesikli olmasına bağlı olarak antioksidatif aktivitenin önemli derece değiştiğini rapor etmişlerdir (44).

Eyidoğan ve Öz (2007), nohutta (*Cicer arietinum* L. cv. Gökçe) tuz stresinin kök ve yaprak hücrelerindeki, antioksidatif enzimler (APX, CAT ve GR), prolin miktarı, lipid peroksidasyon (MDA), klorofil ve H_2O_2 içeriği ile bitki büyüme parametreleri (sürgün boyu, yaş ve kuru ağırlık gibi), üzerine etkisini araştırdıkları çalışmalarında, bitkilere 4 gün boyunca 0.1, 0.2 ve 0.5 M NaCl uygulamışlardır. Artan tuz dozuna bağlı olarak bitki boyu, yaş ve kuru ağırlığının azaldığını, yaprak hücrelerindeki lipid peroksidasyonun ve prolinin önemli derecede değiştiğini, yine yaprak hücrelerinde klorofil ve H_2O_2 içeriğinin azaldığını, yaprak ve kök hücrelerinde antioksidatif enzimlerin arttığını tespit etmişlerdir. Analiz sonuçlarında nohutta bitki gelişiminde tuz stresine karşı özellikle antioksidatif enzimlerden olan süperoksit dismutaz (SOD) ve katalazın (CAT) önemli rol oynadığını rapor etmişlerdir (45).

Ahmad ve arkadaşları (2008), bezelyenin (*Pisum sativum* L.) iki çeşidinin ('EC 33866' ve 'Puget') tuza tepkisini belirlemek amacıyla yaptıkları araştırmalarında, her iki çeşide 0 (Kontrol), 50, 100, 150 ve 200 mM tuz (NaCl) uygulaması yapmışlardır. Çalışmalarında klorofil stabilitesi, prolin miktarı, lipid peroksidasyon, iyon içeriği (K^+ , Ca^+ ve Mg^+) ve antioksidatif enzimlerin (SOD, APX, CAT, GR, DHAR) analizini yapmışlardır. Analizler

sonucunda artan tuz dozlarına bağı olarak antioksidatif enzimlerin aktivitesinin ve prolin miktarının arttığını, bu karşın klorofil stabilitesinin ve iyon içeriğinin azaldığını, lipid peroksidasyonun ise tuza daha toleranslı çeşitte daha az olduğunu tespit etmişlerdir. Araştırmaları sonucunda 'EC 33866' çeşidinin 'Puget' çeidine göre tuza daha toleranslı olduğunu bildirmişlerdir (46).

Özaslan-Parlak ve Parlak (2008), sulama suyu tuzluluğunun korunganın (*Onobrychis viciifolia* Scop.) verimi ve kalitesi üzerine olan etkilerini ortaya koymak amacıyla yaptıkları araştırmada, 5 sulama suyu tuzluluğu (0.27, 3.5, 7, 10 ve 13 dS m⁻¹) ve iki alkalilik düzeyi (SAR= 0.35 ve 10) kullanmışlardır. Artan tuz miktarı ve alkalilikle beraber bitki boyunun kısaldığını, kuru ot verimi ve ham protein oranı azaldığını tespit etmişlerdir. En yüksek tuz konsantrasyonu ve alkalilikte canlı bitki kalmadığını ve sulama suyu tuzluluğunun artışına bağı olarak toprak tuzluluğunun artış gösterdiğini rapor etmişlerdir (47).

Yaşar ve arkadaşları (2008), 'Gevas sirk' (GS57) ve 'Fransiz' (4F-89) fasülye genotiplerinde tuz stresinin antioksidan enzimler (CAT, APX ve GR), lipid peroksidasyon ve klorofil miktarı üzerine etkisini belirlemek amacıyla bir çalışma yapmışlardır. Çalışmalarında bitkilere 7 gün boyunca 0, 50 ve 100 mM NaCl uygulamışlardır. Araştırma sonucunda, tüm NaCl dozlarında tuza hassas genotip olan '4F-89' GR miktarının azaldığını, tuza toleranslı genotip olan 'GS57' de ise 50 ve 100 mM NaCl dozlarında GR aktivitesinin arttığını tespit etmişlerdir. CAT ve APX enzimlerinin aktivitelerinin artan NaCl dozlarına bağı olarak her iki genotipte de arttığını, ayrıca yine her iki genotipte MDA miktarının arttığını fakat bu artışın tuza hassas genotipte daha fazla olduğunu saptamışlardır. Klorofil miktarı bakımından ise artan tuz stresinde hassas genotipte klorofil miktarının azaldığını, buna karşın toleranslı genotipte aynı kaldığını bildirmişlerdir (48).

Yıldırım ve arkadaşları (2008), araştırmalarında 11 adet bezelye genotipi ile 2 adet bezelye çeşidinin tuza toleransını belirlemeye çalışmışlardır. Denemedeki bitkilere 0, 25 ve 75 mM NaCl uygulamışlardır. Çalışmalarında bitki kök, sürgün boyunu, taze yaprak ağırlığını, malondialdehiti (MDA) ve klorofil miktarını ölçmüşlerdir. Ölçümleri sonucunda genotip '10431', '101917' ve '1103220'ın tuza daha toleranslı olduğunu saptamışlardır (49).

Arulbalachandran ve arkadaşları (2009), 3 börülce (*Vigna radiata*, *V. mungo* ve *V. unguiculata*) çeşidinde tuz stresine bağlı olarak antioksidan enzim aktivitesi ve metabolitlerdeki değişimi ölçmek amacıyla yaptıkları çalışmada, bitkileri 15 gün boyunca 0, 50, 100, 75, 125 ve 150 mM NaCl'ye maruz bırakmışlardır. Araştırmalarında klorofil içeriği, prolin miktarı ve peroksidaz enzimlerini analiz etmişlerdir. Analiz sonucunda, artan tuz stresine bağlı olarak her 3 çeşitte klorofil miktarının azaldığını, prolin ve enzim aktivitesinin arttığını tespit etmişlerdir. Ayrıca analizleri sonucunda *V. unguiculata* çeşidinin diğer iki çeşide göre tuza karşı daha toleranslı olduğunu tespit etmişlerdir (50).

Azooz (2009), çalışmasında mısırdaki yetiştirilen iki farklı bakla (*Vicia faba L.*) genotipinin ('115' ve '125') tuzluluğa olan tepkisini ve 0.2 mM salisilik asitin tohum çimlenmesi üzerine etkisini araştırmıştır. Bakla genotiplerine 0 ve 140 mM NaCl tuz uygulaması yapmıştır. Araştırmasında klorofil a, klorofil b, toplam klorofil, antioksidatif enzimler (CAT, POD, APX ve GR), iyon içeriği ve malondialdehiti (MDA) analiz etmiştir. Analizler sonucunda, genotip '115'in genotip '125'e göre tuza daha toleranslı olduğunu belirtmiştir (51).

Noreen ve Ashraf (2009), genetik olarak farklı 9 bezelye (*Pisum sativum*) çeşidinde antioksidatif enzimler ile enzimatik olmayan antioksidantların aktivitelerindeki değişimin tuza toleransın belirlenmesinde bir belirteç olarak kullanılıp kullanılmayacağını araştırdıkları çalışmalarında, 9 farklı bezelye çeşidine 0, 40, 80 ve 120 mM NaCl tuz uygulaması yapmışlardır. Araştırmalarında bitki taze biyokütlesi, malondialdehit (MDA), toplam çözümlü proteinler, hidrojen peroksit (H_2O_2) içeriği ve önemli antioksidatif enzimlerin (SOD, CAT ve POD) analizlerini yapmıştır. Araştırma sonucunda, tuz uygulamasının tüm bezelye çeşitlerinde oksidatif stresi oluşturmasına rağmen, 9 farklı bezelye çeşidinde tuza toleranslı veya hassas çeşitlerin belirlenmesi noktasında yukarıda belirtilen ve analizleri yapılan parametrelerin tutarlı sonuçlar vermediğini rapor etmişlerdir. Buna karşın sadece antioksidatif enzimlerden olan katalaz (CAT)'ın tutarlı bir sonuç verdiğini 9 bezelye çeşidinde tuza toleransın belirlenmesinde güvenilir bir parametre olarak kullanılabileceğini bildirmişlerdir (52).

Rubio ve arkadaşları (2009), moleküler çalışmalarda bir model organizma olarak kullanılan gazalboynuzu (*Lotus japonicus*)'nda tuz stresinin antioksidan genler ve proteinler üzerine olan etkisini araştırdıkları çalışmalarında, iki farklı S protokolü (S1-150

mM NaCl 7 gün boyunca; S2-50, 100 ve 150 mM NaCl 6 gün boyunca) kullanarak bitkilere tuz uygulaması yapmışlardır. Araştırmalarında bitki yaprak hücrelerindeki antioksidan genlerin ekspresyonu (ifadesi), iyon (Na, Cu, K, Ca, Mg, P, S, Zn ve Fe) değişimi veya içeriği, lipid peroksidasyon, prolin miktarını ve klorofil içeriğini, yine kök hücrelerinde de antioksidan genlerin ekspresyonu analiz etmişlerdir. Analiz sonucunda antioksidatif enzimleri kodlayan 20'nin üzerinde gen olduğunu tespit etmişlerdir. S1 protokolünde yapraklarda SOD ve GR enzimlerini kodlayan genlerin daha aktif olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca S2 protoklünde yaprakların içeriğindeki Na⁺ ve Ca⁺² iyonlarının, prolin ve lipid peroksidasyonun arttığını bulmuşlardır. Tüm analiz sonuçlarını değerlendirdiklerinde (*Lotus japonicus*)'un diğer baklagillere göre tuza daha toleranslı olduğunu bildirmişlerdir (53).

Wang ve arkadaşları (2009), araştırmalarında 3 farklı yonca (*Medicago sativa*), sarı taşıyoncası (*Melilotus officinalis*) ve geven (*Astragalus adsurgens*) bitkilerinde çimlenme fazında tuz stersine karşı verdikleri fizyolojik ve antioksidan yanıtları belirlemek ve kıyaslamak amacıyla yaptıkları çalışmada, bitkilere 0, 50, 100, 200 ve 300 mM NaCl uygulamışlardır. Çalışmada çimlenme yüzdesi, antioksidatif enzimler (SOD, CAT, GR, APX ve POD) ile malondialdehiti (MDA) analiz etmişlerdir. En yüksek NaCl dozunda çimlenme yüzdesi bakımından taşıyoncası (*Melilotus officinalis*)'nın diğerlerine göre daha yüksek değer verdiğini, MDA miktarında ise en yüksek değeri yonca (*Medicago sativa*)'nın verdiğini, antioksidatif enzimlerin ise her 3 baklagil bitkisinde farklı değerler verdiğini saptamışlardır (54).

Wang ve arkadaşları. (2009), çevresel streslere (tuz ve kuraklık) karşı yoncanın (*Medicago sativa* L.) adaptasyon yeteneğini anlamak amacıyla altı yonca çeşidinde ('Victor', 'Northstar', 'Golden Empress', 'Algonquin', 'Xinmu No.1' ve 'Xinjiang Daye') yaptıkları çalışmada, çimlenme sırasında, tuzluluk ve kuraklık stresleri altında bulunan bitkilerde çimlenme oranı, yapraklardaki H₂O₂ miktarı ile bitkilerin sürgün ve köklerindeki lipid peroksidasyon ve antioksidatif enzimleri (CAT, SOD ve APX) analiz etmişlerdir. Kuraklık stresi oluşturmak için %35'lik polietilen glikol (PEG) ve tuz stresi oluşturmak içinde 200 mM NaCl kullanmışlardır. Araştırmaları sonucunda, altı yonca çeşidi içerisinde 'Xinmu No.1' çeşidini tuza ve kuraklığa daha toleranslı bulurken, 'Northstar' çeşidini daha duyarlı bulmuştur. Toleranslı olan çeşitte antioksidatif enzim aktivitesinin diğer çeşitlere göre daha fazla olduğunu tespit etmişlerdir (55).

Wang ve Han (2009), iki yonca (*Medicago sativa* L.) çeşidinde ('Defi' ve 'Zhongmu 1') prolin içeriğinin ve antioksidan enzimlerin (SOD, CAT, POD ve APX) tuz stresine karşı bitkileri koruyucu özelliklerini araştırmak amacıyla yaptıkları çalışmada, bitkilere 7 gün boyunca 0, 70, 140 ve 210 mM NaCl uygulamışlardır. Araştırmalarında ayrıca antioksidan enzimlerin izoformlarını, lipid peroksidasyonu ve biyokütleyi (sürgün, kök ve yaprak büyümesi gibi) analiz etmişlerdir. Stres sonrasında her iki çeşitte antioksidan enzimler ve bunların izoformlarının geniş bir aralığa değiştiğini tespit etmişlerdir. Çeşitler arasında prolin miktarının 210 mM NaCl dozunda 'Defi' çeşidinde daha fazla olduğunu saptamışlardır. Kök ve sürgün uzunluğunun, yaprak kuru ağırlığının 'Zhongmu 1' çeşidinde daha fazla olduğunu bulmuşlardır (56).

Maia ve arkadaşları (2010), börülcenin (*Vigna unguiculata* L.) tuza toleranslı ('Pitiuba') ve tuza hassas ('Perola') çeşitlerinde antioksidatif enzimlerin (SOD, CAT, APX ve POX) aktivitesindeki değişiklikleri kıyaslama amacıyla bir araştırma yürütmüşlerdir. Bitkilere 8 gün boyunca 100 mM NaCl uygulamışlardır. Araştırmada su içeriği, elektriksel iletkenlik ve lipid peroksidasyonu analiz etmişlerdir. Analizleri sonucunda, her iki çeşitte yapraklarda su içeriğinin azaldığını, elektriksel iletkenliğin arttığını tespit etmişlerdir. Tuz stresine bağlı olarak tuza toleranslı çeşitte SOD, APX ve POC enzimlerinin aktivitelerindeki artışın daha yüksek değerde olduğunu saptamışlardır (57).

Amirjani (2010), soya fasülyesinde (*Glycine max*) tuz stresinin büyümeye, mineral (Na^+ , K^+ , Ca^+ ve Mg^{+2}) ve prolin içeriğine, antioksidan enzimlerin (CAT, POD ve SOD) aktivitesi üzerine etkisini araştırdığı çalışmasında, bitkilere 0, 50, 100 ve 200 mM NaCl uygulamıştır. Araştırması sonucunda, artan tuz dozuna bağlı olarak bitki boyu ve yaş ağırlığının, nitrogenaz enzim aktivitesinin ve minerallerden K^+ , Ca^+ ve Mg^{+2} 'nin azaldığını, prolin ve minerallerden Na^+ içeriğinin ve antioksidatif enzimlerin aktivitesinin arttığını tespit etmiştir. Ayrıca antioksidatif enzimlerin 100 mM NaCl dozuna kadar artış gösterdiğini 200 mM NaCl'de ise aktivitelerinde keskin bir düşüş olduğunu saptamıştır (58).

Babakhani ve arkadaşları (2011), NaCl'nin yonca (*Medicago sativa* L.) çeşidi 'Yazdi' (toleranslı) ve 'Diabolorude' (duyarlı) üzerine olan etkisini araştırdıkları çalışmada, yonca çeşitlerine farklı NaCl (0, 100, 150 ve 200 mM) dozları uygulamışlardır. Tuz stresi altındaki bitkilerde çimlenme oranı, antioksidan enzimler (CAT, APX, ve SOD), lipid

peroksidasyon ve yapraklardaki şeker içeriğini ölçmüşlerdir. Artan tuz dozlarında yapraklardaki şeker içeriğinin azaldığını, CAT, APX ve SOD enzim aktivitelerinin arttığını, ancak en yüksek dozda SOD aktivitesinin azaldığını tespit etmişlerdir. Her iki çeşitte de tuzun yaratmış olduğu oksidatif stres nedeniyle lipid peroksidasyonda artış gözlemlenmiştir. Ancak, lipid peroksidasyon seviyesinin duyarlı çeşitte 'Diabolorude' daha yüksek seviyede olduğunu tespit etmişlerdir. Araştırmaların sonucunda, tuza toleranslı çeşidin reaktif oksijen türlerinin (ROT) yok edilmesi noktasında daha iyi bir mekanizmaya sahip olduğunu bildirmişlerdir (59).

Beyaz ve arkadaşları (2011), korunganın iki türünün (*Onobrychis viciifolia* ve *Onobrychis oxyodonta* var. *armena*) tuz stresine karşı tepkilerini belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada, bitkilere 0, 5, 10, 20 ve 30 dS/m dozlarında NaCl uygulamışlardır. Çalışmalarında *in vivo* ve *in vitro* şartlara yürütmüşlerdir. Araştırmalarında tohum ortalama çıkış hızına, fide yaş ve kuru ağırlık, fide ve kök boyu, kuru madde miktarı gibi parametrelere bakmışlardır. Ayrıca polen çimlenme yüzdesinde yine farklı tuz dozlarında hesaplamışlardır. Araştırmalarının sonucunda, artan tuz stresine bağlı olarak tüm parametrelerde önemli ölçüde azalış olduğunu bu azalışın 10 dS/m NaCl dozundan sonra keskinleştiğini saptamışlardır. *Onobrychis oxyodonta* var. *armena* türünün polen çimlenme yüzdesi bakımından diğer türe göre daha iyi olduğunu belirlemişlerdir (60).

Hu ve arkadaşları (2012), iki İngiliz çimi (*Lolium perenne*) tuza toleranslı 'Quickstart II' genotipi ile tuza duyarlı 'DP1' genotipinde, tuz (NaCl) stresi karşısında antioksidant genlerin, proteinlerin ve enzimlerin (SOD, POD, APX ve CAT) vermiş olduğu tepkileri belirlemek amacıyla bir çalışma yürütmüşlerdir. 12 gün boyunca genotiplere 0 (Kontrol) ve 250 mM NaCl uygulaması yapmışlardır. Ayrıca araştırmalarında her iki genotipte de lipid peroksidasyon (MDA), elektriksel iletkenlik ve H₂O₂ içeriğini analiz etmişlerdir. Analiz sonuçlarında tuza duyarlı olan genotipte MDA, elektriksel iletkenlik ve H₂O₂ içeriğini toleranslı genotipe göre daha fazla artış gösterdiğini, aynı zamanda antioksidant genlerin, proteinlerin ve enzimlerin aktivitesinde de artış olduğunu tespit etmişlerdir. Bitkide sürekli çalışan genler ile stres durumunda aktive olan genlerin oranlaması vasıtasıyla tuza toleranslı genotiplerin belirlenmesinin, genotiplerdeki enzimlerin aktivitesindeki artış miktarının kıyaslanmasına göre daha güvenilir bir sonuç vereceğini bildirmişlerdir (61).

Köse (2012), 6 adet kırmızı mercimek (*Lens culinaris* M.) çeşidinde ('Çağıl', 'Çiftçi', 'Kafkas', 'Malazgirt', 'Seyran' ve 'Özbek') fizyolojik ve biyokimyasal parametreleri kullanarak tuz (NaCl) stresine duyarlı ve toleranslı çeşitleri belirlemek amacıyla bir uygulamıştır. Çalışmasında bitkilere 12 gün boyunca 0 (Kontrol), 100 ve 150 mM NaCl uygulaması yapmıştır. Antioksidatif enzimlerin (SOD, CAT, APX ve GR) ve toplam protein profillerinin analizlerini yapmıştır. Çalışma sonucunda 'Seyran' çeşidinin tuza toleranslı, 'Malazgirt' çeşidinin duyarlı olduğunu tespit etmiştir (62).

Ozturk ve arkadaşları (2012), bezelyede (*Pisum sativum* cv. *Rona*) uzun süreli tuz (NaCl+CaCl₂+MgSO₄) stresinin yapraklardaki klorofil içeriği, prolin miktarı, hidrojen peroksit (H₂O₂) miktarı, lipid peroksidasyon ve antioksidatif enzimlerin (SOD, CAT, POD ve APX) aktivitesindeki değişim üzerine etkisini inceledikleri çalışmalarında, sera şartlarında kurdukları denemelerdeki bitkileri altı farklı (0.7, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 ve 7.0 dS/m) tuz (NaCl+CaCl₂+MgSO₄) dozunda 7 hafta boyunca sulamış ve 7. hafta sonunda numuler alarak analizler yapmışlardır. Artan tuz dozlarında klorofil içeriğinin, malondialdehitin (MDA) ve hidrojen peroksitin (H₂O₂) miktarının azaldığını buna karşın yapraklardaki prolin miktarı, ve antioksidatif enzim aktivitesinin arttığını tespit etmişlerdir (63).

Shahid ve arkadaşları (2012), dokuz nohut (*Pisum sativum*) genotipinin tuza karşı tepkilerini belirlemek amacıyla yaptıkları araştırmada, 15 gün boyunca 0 (kontrol), 25, 50 ve 75 mM'lık NaCl tuz stresine maruz kalan bitkilerde; klorofil içeriği, membran stabilite indeksi, antioksidant enzimler (SOD, POD ve CAT) ve ozmolitleri (prolin, glisin-betain ve amino asitler), lipid peroksidasyonu (MDA), hidrojen peroksiti (H₂O₂) ve absisik asit (ABA) içeriğini, iyon (Na⁺, K⁺ ve P) değişimini, bitki yaş ve kuru ağırlıklarını ölçmüşlerdir. Ölçüm sonucunda, artan tuz dozuna bağlı olarak membran stabilitesini, klorofil içeriğinin, bitki yaş ve kuru ağırlıklarını azaldığı, lipid peroksidasyon, hidrojen peroksit içeriği, absisik asit ile prolin miktarının ve antioksidatif enzim aktivitesinin arttığını tespit etmişlerdir. 'Climax', 'Samarina zard' ve '9800-5' genotiplerinin gelişmiş antioksidant mekanizmaları sayesinde tuza karşı daha toleranslı olduğunu rapor etmişlerdir. Ayrıca nohut genotiplerinde yukarıda ölçülen parametrelerin tuza toleransın belirlenmesi noktasında kullanılabileceğini bildirmiştir (64).

Ashraf ve arkadaşları (2013), 3 börülce (*Vigna radiata*) çeşidinin ('NCM-209', 'NCM-89' ve 'NM-92') tuz stresi altında vermiş oldukları biyokimyasal değişimleri kıyaslamak ve

ölçmek amacıyla kurdukları saksı denemelerinde, bitkilere 0 (kontrol), 50, 100 ve 150 mM NaCl uygulamışlardır. Çalışmalarında H₂O₂ içeriğini, antioksidatif enzimleri (SOD, CAT, APX ve POX), malondialdehiti (MDA), fotosentetik pigment miktarını, iyon içeriğini (Na⁺, K⁺, Cl⁻, K⁺/Na⁺) ve bağıl su içeriğini analiz etmişlerdir. Analiz sonucunda, tuz stresinin köklerde bağıl su içeriğini, fotosentetik pigment miktarını, hücresel seviyede K⁺ iyonu ile K⁺/Na⁺ oranını azalttığını, buna karşın hücresel seviyede MDA miktarı, H₂O₂ içeriği ve antioksidatif enzimlerin aktivitesinin arttığını saptamışlardır. Topladıkları verilere bakarak şu değerlendirmede bulunmuşlardır: antioksidatif enzimlerin farklı çeşitlerde farklı aktivite seviyeleri gösterdiğini ve buna bağlı olarak tek bir enzim aktivitesine bakarak bürülce çeşitlerinde bu çeşit tuza daha toleranslıdır denemeyeceğini belirtmişlerdir (65).

Cha-um ve arkadaşları (2013), çalışmalarında iki önemli baklagil türü olan bürülcenin (*Vigna unguiculata* Walp.) ve fasüyenin (*Canavalia ensiformis* L.) tuz stresi karşı vermiş olduğu fizyolojik ve biyokimyasal cevapları araştırmışlardır. Çalışmada bitkilere 0, 50, 100, 150 ve 200 mM NaCl uygulamışlardır. Araştırmada klorofil içeriği (klorofil a ve klorofil b), prolin miktarı, elektriksel iletkenlik, su kullanım etkinliği, Na⁺ ve K⁺ iyon içeriği, çimlenme yüzdesi, bitki yaş ve kuru ağılıklarını analiz etmişlerdir. Çalışma sonucunda, iyon içeriği, prolin miktarı ve elektriksel iletkenliğin her iki türde de arttığını, 200 mM dozda bürülcede klorofil içeriği ile potasyum iyonunun hızlı bir şekilde azaldığını tespit etmişlerdir. Potasyum içeriği, su kullanım etkinliği ve klorofil pigmentlerindeki düşüşün fasülye de bürülcedekine göre daha az olduğunu saptamışlardır. Fasüyenin tuzlu toprakların iyileştirilmesi çalışmalarında yeşil gübre olarak kullanılabilir aday bir baklagil bitkisi olduğunu bildirmişlerdir (66).

Siddiqui (2013), mung fasüyesinde (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) tuz (NaCl) ve ağır metal (kurşun klorür ve kurşun nitrat) streslerinin birlikte antioksidan enzim aktivitesi üzerine etkisini araştırdığı çalışmada, bitkilere 0, 75, 150 ve 225 mM NaCl ve kurşun klorür ile kurşun nitratı birlikte uygulamıştır. Araştırmasında APX, CAT, GR, SOD ve GPX enzimlerini analiz etmiştir. Analiz sonucunda, birlikte uygulanan APX, GR, SOD, GPX enzimlerinin aktivitelerinin katalaz aktivitesine göre kıyaslandığında arttığını saptamıştır. SOD ve GR enzimlerinin birleştirilmiş stres faktörlerine karşı en yüksek aktivite değeri verdiğini belirtmiştir (67).

Talukdar (2013), altı farklı ('B1', 'BioL-212', 'PUSA-90-2', 'WBK-CB-14', mutant 'LR3' ve 'LR4') mürdümük (*Lathyrus sativus* L.) genotipi içerisinde tuza (NaCl) toleranslı genotipi belirlemek amacıyla yaptığı çalışmada, sera koşullarında kurduğu denemelerde saksı içerisindeki bitkilere 150 mM NaCl tuz içeren su ile uygulama yapmıştır. 15., 30. ve 60. gün olmak üzere 3 farklı günde bitkilerden numune alarak bu numunelerde, kök ve sürgünün yaş ve kuru ağırlıkları, klorofil a, klorofil b, klorofil a/b oranı, yapraklardaki Na^+/K^+ oranı, prolin ve H_2O_2 miktarı, lipid peroksidasyon, dokulardaki elektriksel iletkenlik, askorbik asit miktarı ve antioksidatif enzimlerin (CAT, APX ve SOD) ölçümünü yapmıştır. Tuz uygulamasının 'PUSA-90-2', 'WBK-CB-14' genotiplerinde büyüme potansiyeli üzerine önemli derecede olumsuz etki bıraktığını, ancak 'B1' ile 'BioL-212' ve mutant 'LR3' ile 'LR4' genotiplerinde önemli derecede olumsuz etki bırakmadığını rapor etmiştir (68).

Oufdou ve arkadaşları (2014), farklı rhizobia ('RhOF4' ve 'RhOF6') suşları ile inoküle edilmiş bakla (*Vicia faba* L.) bitkisinde tuz stresinin yaprak ve köklerdeki enzimlerin aktiviteleri üzerine etkisini araştırmışlardır. Sera şartlarında kurdukları denemlerdeki bitkilere 0, 75 ve 150 mM NaCl uygulaması yapmışlardır. Artan tuz dozlarında bitki büyümesinin azaldığını, toplam sürgün boy ve ağırlığının özellikle 150 mM NaCl de önemli derecede azaldığını tespit etmişlerdir. Ayrıca tuzun 'RhOF6' ile inoküle edilmiş bakla bitkisindeki enzimler üzerine etkisinin daha fazla olduğunu bildirmişlerdir. Tuz uygulanmış bitkiler ile kontrol grubunu kıyasladıklarında; tuz uygulanmış ve 'RhOF6' ile inoküle edilmiş bakla bitkilerinin kök hücrelerinde glutatyon peroksidaz (GPOX), süperoksit dismutaz (SOD), askorbat peroksidaz (APOX) ve monodihidriaskorbat peroksidaz (MDHAR) aktivitelerinin daha düşük olduğunu rapor etmişlerdir. Farklı rhizobia suşları ile inoküle edilmiş bakla bitkisindeki bu ortak yaşamın, bitki köklerinin tuz stresi karşı geliştirdiği savunma ile adaptasyon üzerine etkisinin önemli olduğunu bildirmişlerdir (69).

Yildiztugay ve arkadaşları (2014), baklagiller familyasında yer alan sarı meyan (*Thermopsis turcica*) bitkisinde, kısa (7 gün) ve uzun (14 gün) dönem tuz stresi altında fizyolojik parametrelerde meydana gelen değişimlerin tespiti ve tuz stresine karşı verilen antioksidant cevabın belirlenmesi amacıyla yaptıkları çalışmada, bitkilere 0, 100 ve 200 mM NaCl uygulamışlardır. Çalışmalarında bağıl büyüme oranı ve su içeriği, klorofil içeriği, membran geçirgenliği ile iyon konsantrasyonu, antioksidan enzimlerin (SOD,

CAT, APX ve GR) aktivitesi, ozmolit (prolin, betain ve kolin) miktarı ve lipid peroksidasyonu ölçmüşlerdir. Araştırma sonucunda, yüksek tuz dozunda (200mM) ozmolitlerin miktarının, lipid peroksidasyonun, membran geçirgenliği ile hücreler içerisindeki Na⁺ ve K⁺ iyonlarının ve antioksidatif enzimlerin (özellikle APX ve GR) aktivitelerinin önemli derecede arttığını, büyüme oranı ve su içeriğinin azaldığını tespit etmişlerdir. Genel olarak, diğer bitkilerde olduğu gibi tuz stresine karşı benzer cevap oluştuğunu ve yüksek APX ile GR aktivitesine bağlı olarak, orta şiddetteki (100-200 mM arası) tuz stresine kısa dönem içerisinde yeterli cevabın oluştuğunu bildirmişlerdir (70).

2.2. *In Vitro* Mutagenesis Tekniği Aracılığıyla Tuza Toleranslı Bitkilerin Geliştirilmesi

Bitki ıslahında önemli basamaklardan bir tanesinde istenilen agronomik özelliği bünyesinde taşıyan bitkilerin seçilmesi aşamasıdır. *In vitro* seleksiyon, çok büyük bir popülasyondan istenilen özellikleri taşıyan bireylerin, kısa zaman içerisinde, fazla iş gücü gerektirmeden ve az bir maliyet ile seçilmesine olanak sağlamaktadır. Bir popülasyonda istenilen karakterleri taşıyan bireylerin frekansı düşüktür. Bu frekans popülasyon içerisinde allel genlerin oluşmasını sağlayan mutasyon ile ilişkilidir. Doğal mutasyonun ile istenilen allel genleri oluşturması çok uzun zaman alabilmektedir. Dolayısıyla gen havuzu içerisinde istenilen alellerin oluşması için dışardan canlı organizmada mutasyon oluşturacak ve bu frekansı artıracak müdahaleler gerekir. Bu müdahaleler çeşitli yollar vasıtasıyla yapılmaktadır. Bu yollardan yaygın olarak kullanılanlardan bir tanesinde biyolojik materyallerin gama ışınları ile ışınlanmasıdır. Belirlenen etkin gama ışın dozları ile biyolojik materyalin DNA molekülüne zarar vermeden genlerin kendi içerisinde tekrar düzenlenmesine olanak sağlayan mutasyonlar oluşturulabilir. Bu olaya mutasyon oluşturma anlamına gelen mutagenesis denir. Mutagenesis tekniği ile bitkilerde birçok istenilen agronomik karakterlerin geliştirilmesi mümkündür. Mutagenesis ve seleksiyonun birlikte kullanımı ile istenilen özellikleri taşıyan birçok mutant bitki çeşidi geliştirilmiştir. Bu konu ile ilgili yapılan literatür çalışması tarih sırasına göre aşağıda verilmiştir.

Xu YY. ve arkadaşları (2001), yaptıkları çalışmada korunga (*Onobrychis vicaefolia* Scop.) bitkisinin NaCl tuzuna dayanımını uzay-mutagenesis tekniği ve *in vitro* seleksiyonu birlikte kullanarak artırmaya çalışmışlardır. Uzay mutagenesisine tabi tuttıkları korunga tohumlarını tarla şartlarında yetiştirmişlerdir. Bu bitkilerden eksplant olarak *in vitro* da

kallus kültürü yapmışlar % 1.5 NaCl tuzu içeren ortamlarda tuza dayanım gösteren kallusların seleksiyonunu gerçekleştirmişlerdir. Tuza dayanım gösteren kallus hatlarının normal bitkilerdeki gibi rejenerasyon yeteneklerini sürdürdüklerini tespit etmişlerdir. Tuza dayanım gösteren hatların stres koşullarında kontrole göre daha fazla miktarda prolin bulduklarını ancak stres olamayan koşullarda kontrol grubuna göre daha az prolin bulduklarını saptamışlardır. Tuza tolerans gösteren kalluslarda akrilamid gradient elektroforez ile yaptıkları analizde süperoksit dismutaz ve esteraz enzimlerinin iki farklı ve yeni (sırasıyla MW 175 kD ve 75 kD) izoenziminin varlığını tespit etmişlerdir. Çalışmaları sonucunda mutagenesis (uzay-indüklü, (mutasyon uzay çevre koşullarında oluşturuluyor)) tekniği ve *in vitro* kültürün birlikte kullanımı ile tuza toleranslı korunga hatlarının geliştirilebileceğini rapor etmişlerdir (71).

Saleem ve arkadaşları (2005), 'Bastima 370' çeltik (*Oryza sativa* L.) çeşidinde tuzluluğa karşı genetik varyasyonu yaratabilmek için ⁶⁰Co gama ışın kayanığını kullanarak embriyonik kallusları 50 Gy dozunda ışınlamışlardır. Işınlanan ve ışınlanmayan kallusların farklı NaCl dozları (4, 6, 8 ve 10 d/Sm) içeren MS0 besi ortamından *in vitro* şartlarda seleksiyonunu yapmışlardır. Işınlanan kallusların ışınlanmayanlara göre tuzlu ortama daha iyi adapte olduklarını tespit etmişlerdir. Araştırmaları sonucunda, tuza toleranslı iki aday mutant hat elde etmişlerdir. Elde ettikleri sonuçlara göre 'Bastima 370' çeltik çeşidinde gama ışınları ile *in vitro* teknikleri birleştirerek tuza toleranslı hatların geliştirilebileceğini rapor etmişlerdir (72).

Hossain ve arkadaşları (2006), *Chrysanthemum morifolium* Ramat.'ın stabil tuza toleranslı mutantını (R1) *in vitro* mutagenesis tekniğini kullanarak elde etmişlerdir. Tuza toleransı artırılmış mutant (R1) bitkide tuz stresine ile ilgili çeşitli antioksidan enzimlerin (süperoksit dismutaz, glutatyon redüktaz, monodehidroaskorbat redüktaz ve dehidroaskorbat redüktaz) aktivitelerine, klorofil ve karatonoid içeriğine, hücre duvarı hasarına bakmışlardır. Ayrıca mutant bitkilerdeki polimorfizmi belirlemek amacıyla RAPD-PCR tekniğini kullanmışlardır. Yaptıkları biyokimyasal analiz sonucunda antioksidan enzimlerin aktivitelerinin arttığını bulmuşlardır. Klorofil ve karatinoid içeriğinin ve hücre duvarı hasarının azaldığını tespit etmişlerdir. RAPD-PCR analizi sonucunda mutant bitkide iki polimorfik bant (956 bp, 1093 bp) elde etmişlerdir. Gama ışınları kullanılarak *in vitro* da geliştirilen mutantın tuz (NaCl) stresine toleransla ilgili

tüm parametrelerin pozitif yönde olduğunu rapor etmişleridir. Çalışmalarında *in vitro* mutagenesis ve seleksiyonu başarılı bir şekilde kullanmışlardır (73).

El Sayed ve arkadaşları (2007), yaptıkları çalışmada iki buğday çeşidinde ('Sakha 93' ve 'Sohag 3') tuza toleransta genetik değişimi göstermek amacıyla; embriyonik kallusları farklı dozlarda (0, 40, 80 ve 120 gray) ışınlamışlar ve ışınladıkları kalluslara farklı (%0,9 ve %1,2) NaCl dozları içeren MS0 besi ortamına almışlardır. Araştırmaları sonucunda, tuza toleranslı kalluslarda kontrole göre 9 kat daha fazla prolin miktarı tespit etmişlerdir. Dört enzimin (EST, PPO, ACP ve PRX) elektroforetik analiz sonucunda; iki buğday çeşidinde tuz stresi altında gama ışınlarının genetik etkinliğini görüntülemişlerdir. Işınlanan materyallerde analiz sonucunda yeni protein ve izoenzim bantları elde etmişlerdir. Yeni oluşan enzim ve/veya izoenzimlerin tuza dayanımda biyokimyasal belirteç (markör) olarak kullanılabileceğini rapor etmişlerdir (74).

Patade ve arkadaşları (2008), şeker kamışı (*Saccharum officinarum* L.) çeşidinde 'CoC-671' yaptıkları çalışmada embriyonik kallusları farklı dozlarda (10, 20, 30, 40 ve 50 Gy) gama ışını ile ışınlamışlar ve ışınlanan bu materyalleri farklı tuz (NaCl) dozları (42.8, 85.6, 128.3, 171.1, 213.9, 256.7, 299.5 ve 342.2 mM) içeren MS0 besi ortamına koymuşlardır. Bu ortamlarda tuz stresine tolerans gösteren kallusların *in vitro* seleksiyonunu yapmışlardır. En iyi sonucu 10 ve 20 Gy ile ışınlanan kalluslarda 85.6 mM NaCl içeren ortamlardan almışlardır. Farklı tuz seviyelerine dayanıklı toplam 147 bitki seçmişler ve bunların tarla denemelerini yapmışlardır (75).

Mosleh ve arkadaşları (2009), kanola (*Brassica Napus* L.) bitkisinin beş farklı genotipinde tuza toleranslı bitkileri elde etmek için yaptıkları çalışmada *in vitro* şartlarda hipokotil eksplantlarından elde ettikleri kallusları farklı gama ışın dozları (0, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 ve 120 Gy) ile ışınlamışlar, tuza tolerans gösteren materyalin 0, 80 ve 160 mM tuz (NaCl) içeren MS0 besi ortamından seleksiyonunu gerçekleştirmişlerdir. 30, 45 ve 120 Gy ile ışınlanan kalluslardan tuza toleranslı bitkiler elde etmişlerdir (76).

Patade ve Suprasanna (2009), yaptıkları çalışmada hindistan şeker kamışı (*Saccharum officinarum* L.) çeşidin 'Co 86032' de tuza toleranslı bitki hattı geliştirmek için *in vitro* radyasyon indüklü mutagensisi kullanmışlardır. İlk olarak latel dozu (LD 50) embriyonik kallus kültürü için 20 Gy olarak belirlemişlerdir. Embriyonik kallusları farklı tuz (NaCl)

dozlarına (85.6, 128.3, 171.1, 213.9 ve 256.7 mM) maruz bırakmışlardır. Buradan elde ettikleri sonuçlara göre 20 Gy ile ışınladıkları kallusları tuza tolerans için seleksiyon amacıyla 85.6 ve 171.1 mM NaCl ile muamele etmişlerdir. Çalışmaları sonucunda ışınlanan ve ışınlanmayan kallusların her ikisinde kendi kontrollerine göre büyüme oranlarının azaldığını tespit etmişleridir. Ancak bu büyüme oranının ışınlanmamış kalluslarda daha yüksek olduğunu gözlemlemişlerdir. Sonuç olarak *in vitro* mutagenesis ve seleksiyonun tuza toleranslı çeşit geliştirmede güçlü bir teknik olduğunu rapor etmişleridir (77).

Kumar ve arkadaşları (2010), araştırmalarında sert limonda (*Citrus jambhiri* Lush.) *in vitro* mutasyonu indüklemek için fiziksel (gama ışınları) ve kimyasal (etil metan sülfat ve metil metan sülfat) mutajenler kullanmışlardır. 40 ve 60 günlük kallusları 0, 10, 20, 30, 40, 50 ve 60 Gy dozlarında ışınlamışlar ve 45 ve 60 günlük kallusları farklı konsantrasyonlarında (%0.1, 0.2, 0.3 ve 0.4) kimyasal mutajenlerle (EMS ve MMS) muamele etmişlerdir. Araştırmalarının sonucunda, kallusların rejenerasyon potansiyeli ve hayatta kalma oranlarına göre 40 günlük kalluslar için eşik değeri olarak 10, 20 ve 60 günlük kalluslar için ise 20-30 gy gama ışın dozlarını uygun bulmuşlardır. Kimyasal mutajenler (EMS ve MMS) için eşik değerini 45 günlük kalluslarda % 0.1 bulmuşlar, 60 günlük kalluslarda ise mutajen uygulamasından sonra rejenerasyon olmadığını tespit etmişlerdir. Somaklonların ve mutantların *in vitro* seçimi için 25 mM NaCl tuz konsantrasyonunun optimum olduğunu rapor etmişlerdir. Dört somaklonu 25 mM NaCl tuz konsantrasyonundan elde etmişlerdir. Ayrıca 50 ve 100 mM NaCl tuz konsantrasyonlarının herbirinde ışınlanmadan 170 gün sonraki kalluslardan somaklonları elde etmişlerdir (24).

Bağcı ve Mutlu (2011), korunga (*Onobrychis sativa* Lam.)'da mutasyon ıslahı için kullanılabilir en uygun gama ışını dozunun saptamak için yaptıkları çalışmada, korunga tohumlarını farklı dozlarda (0, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 ve 800 Gy) gama ışını ile ışınlamışlar ve çalışma sonucunda tohumların çıkış oranı, fide yaş ve kuru ağılık, fide ve kök boyu parametreleri incelemişlerdir. Araştırma sonucunda, korungada çeşit geliştirmek veya varyasyon oluşturmak için kullanılan gama ışın dozunun genotiplere göre değişebileceğini belirtmekle birlikte, canlılıkta bir azalma olmaksızın uygulanabilecek en uygun gama ışın dozlarının 400-600 Gy arasında olduğunu bildirmişlerdir (78).

Chen ve arkadaşları (2011), doku kültürü (kallus kültürü) ve fiziksel mutajeni (gama ışını ^{60}Co) birlikte kullanarak *Zoysia matrella* L. Merr. 'de tuza toleranslı beş varyant elde etmişlerdir. Elde ettikleri bu varyantlarda tuz stresi ile ilgili fizyolojik parametreleri (prolin, süperoksit dismutaz, peroksidaz ve katalaz) ölçmüşler ve analiz etmişlerdir. Tuza tolerans gösteren varyantlarda antioksidan enzimlerinde artış olduğunu tespit etmişlerdir (79).

Helaly ve El-Hosieny (2011), limonda (*Citrus Limon* L. Burm.f.) tuza toleransı geliştirmek amacıyla gama ışınlarıyla ışınlanmış protoplastların etkinliği hakkında bir araştırma yapmışlardır. Bu amaçla taze izole edilmiş protoplastları, sürgün rejenerasyonu için gama ışınlarının farklı dozları (0, 5, 10, ve 20 krad) ile ışınlanmış ve bu ışınlanmış protoplastları farklı NaCl tuzu dozları (0, 2000, 4000, 6000 ve 8000 mg/L) içeren ortamlarda *in vitro* kültüre almışlardır. Protoplast canlılığı ve büyüme kriterlerini değerlendirmişlerdir. Dahası, tuza tolerans için rejenere olan sürgünlerin yetenekleri ve bunların antioksidan sistem ile olan ilişkilerini değerlendirmişlerdir. Elde ettikleri veriler, ışınlanmış protoplastların en yüksek NaCl tuzluluğu seviyesi olan 8000 mg/L'de büyümeye devam ettiklerini göstermiştir. Radyasyon duyarlılığı (LD) sadece 20 kradta elde etmişlerdir. Bununla birlikte, ışınlamanın daha yüksek tuzluluk seviyesinde tolerans için doku formları geliştirdiğini ve embriyonik kallus ve sürgün gelişimi üzerine yüksek tuz seviyesinin zararlı etkilerini hafiflettiğini tespit etmişlerdir. Benzer şekilde, ışınlamanın tuzluluğun toplam klorofil, şeker ve protein konsantrasyonu üzerindeki olumsuz etkilerini azalttığı buna karşın karotenoid ve tüm ozmoregülatörlerin (prolin, toplam çözünür fenol, glisin-betain ve K) artırdığını bulmuşlardır. Ayrıca, ışınlamanın lipid peroksidasyonunun ve hidrojenperoksit (H_2O_2) değerlerinin yanı sıra sodyum ve klor birikiminin azaltılmasıyla hücrel hasarı önlediğini belirtmişlerdir (80).

Talukdar (2011), araştırmasında iki önemli baklagil bitkisinde (*Clitoria ternatea* L. ve *Lathyrus sativus* L.) mutagenesis ve *in vitro* seleksiyon tekniklerini kullanarak tuza toleranslı mutant hatların izolasyonunu ve karakterizasyonunu yapmıştır. *Clitoria ternatea* L. ve *Lathyrus sativus* L. baklagil bitkilerinin tohumlarını mutasyon oluşturmak amacıyla farklı dozlarda (100, 150, 200, 250, 300 ve 350 Gy) gama ışınları ile ışınlamıştır. Daha sonra tuz (NaCl) stresine maruz bıraktığı ilk bitkilerden tuza dayanım gösteren 6 mutanti ön denemede seçmiştir. Bu mutantları 130 mM NaCl tuz stresine bırakmış ve elde ettiği 15 günlük sürgünlere morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal analizler yapmıştır. Ön

denemede elde ettiği 6 mutant içerisinde 2'sini analizler sonucunda diğerlerine göre daha tuza (NaCl) toleranslı olduğunu rapor etmiştir (81).

Yaycili ve Alikamanoğlu (2012), patatestede (*Solanum tuberosum* L.) cesium-137 gama ışınlarının farklı dozlarını (0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 ve 50 Gy) kullanarak tuza toleranslı mutantları *in vitro* şartlarda elde etmişlerdir. Tuza toleranslı mutantların seçimini 50, 100 ve 125 mM NaCl tuzu içeren ortamlarda *in vitro* seleksiyon ile başarmışlardır. Araştırmalarında mutant ve kontrol bitkiler arasında moleküler düzeydeki farklılığı göstermek için RAPD-PCR metodunu kullanmışlardır. Moleküler analiz sonucunda, mutantların genetik olarak kontrol bitkilerinden % 27.5'lik bir farklılığa sahip olduklarını tespit etmişlerdir. En büyük farklılığı % 47 olarak, 20 ve 30 gy gama ışınları ile ışınlanan ve 100 mM NaCl tuzu içeren seleksiyon ortamlarında rejenere olan mutantlar ile kontrol arasında olduğunu bulmuşlardır. Çalışmalarının sonucunda 15, 20 ve 30 gy gama ışınlarını kullanarak indükledikleri mutasyon ile tuza toleranslı patates bitkilerini başarılı bir şekilde elde etmişlerdir (82).

Song ve arkadaşları (2012), yaptıkları çalışmada *in vivo* ve *in vitro* teknikler kullanarak tuza toleranslı çeltik mutantlarını tespit etmeye çalışmışlardır. Sodyum/potasyum oranı, toplam klorofil ve karotenoid miktarı, antioksidan enzimleri, toplam aminoasit miktarı, lipid peroksidasyon, malondialdehit (MDA) gibi tuza toleransı belirlemede kullanılan fizyolojik parametrelere bakmışlardır. Gama ışını kullanarak ışınladıkları materyallerden tuza toleranslı iki mutant hat elde etmişlerdir. Yabani tip ile mutantlar arasındaki fizyolojik parametreleri değerlendirdiklerinde mutant hatların tuza (NaCl) daha toleranslı olduğunu göstermişlerdir (83).

Hassan ve Haleem (2014), kanola (*Brassica napus* L.) bitkisinin iki çeşidinde ('Serw 4' ve 'Serw 6') tuzlu koşullara dayanıklı çeşit geliştirme dahil bazı agronomik özellikleri geliştirmek amacıyla yaptıkları çalışmada, bitkinin kuru tohumlarını genetik çeşitliliği artırmak için 0, 5, ve 10 Kr (krad) gama ışın dozu ile ışınlamışlardır. Araştırma sonucunda, en yüksek genetik çeşitliliği 15 Kr gama ışın dozunda olduğunu saptamışlardır. Ayrıca M₂ jenerasyonunda ümit verici mutant bireyler elde etmişlerdir. Bu mutantlardan bir tanesinin yüksek verim kabiliyetiyle diğerinin ise erken çiçek açma özelliği ile ön plana çıktığını bildirmişlerdir (84).

3. GEREKÇE ve AMAÇ

Dünyada çapında küresel ısınmanın artması ve deniz seviyesinin yükselmesi, ekilebilir alanların sürekli olarak tuzluluk derecesinin artıyor olması, kullanılabilir suyun artan oranlarda azalması nedeniyle tuza toleranslı kültür bitkilerine acil olarak ihtiyaç duyulmaktadır (93).

Bu çalışmada, Türkiye'nin önemli bir yem bitkisi olan ve kıraç koşullarda tarımı yapılan korunga (*Onobrychis viciifolia* Scop.) bitkisinin Orta Anadolu'da yetiştirilen dört farklı ekotipinin ('Koçaş', 'Malya', 'Altınova' ve 'Ulaş') NaCl tuzluluğuna karşı tepkilerinin belirlenmesi ve gama radyasyonu kullanılarak oluşturulacak mutagenesis ile tuza toleranslı yeni korunga genotiplerinin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Çalışmamızın nihai hedefi; toprak ve su tuzluluğu stres faktörüne karşı toleransı yüksek yerli korunga hatlarının geliştirilmesi ve çeşit ıslahıdır.

3.1. Hipotezler

Hipotez 1: Bitkilerde tuza (NaCl) toleransın belirlenmesinde bazı önemli morfolojik ve fizyolojik seleksiyon karakterleri kullanılır. Dolayısıyla bu karakterleri kullanarak farklı korunga (*Onobrychis viciifolia* Scop.) ekotiplerinin ('Koçaş', 'Malya', 'Altınova' ve 'Ulaş') tuz stresine karşı verdikleri tepkiler ve toleransları belirlenebilir.

Hipotez 2: Farklı korunga (*Onobrychis viciifolia* Scop.) ekotiplerinde mutagenesis tekniği ile *in vitro* seleksiyon birlikte kullanılarak tuza toleranslı mutant korunga hatları geliştirilebilir. Dolayısıyla farklı korunga ekotiplerinin tohumlarının, farklı dozlarda gama radyasyonu (Kobalt 60 (Co-60)) ile ışınlanmasıyla tuza toleranslı bu mutant hatları elde etmek mümkündür.

4. MATERYAL ve YÖNTEM

4.1. Materyal

4.1.1 Bitki materyali

Türkiye’de yaygın olarak tarımı yapılan tescilli korunga çesidi bulunmamakta olup, tohumluk ihtiyacının büyük bir kısmı Devlet Tarım İşletme Müdürlükleri tarafından karşılanmaktadır. Bu nedenle bitki materyali olarak 'Koçaş' (Aksaray), 'Malya' (Kırşehir), 'Altınova' (Konya) ve 'Ulaş' (Sivas) Tarım İşletme Müdürlüklerinden elde edilen korunga ekotipleri kullanılmıştır.

4.1.2 Işınlama materyali

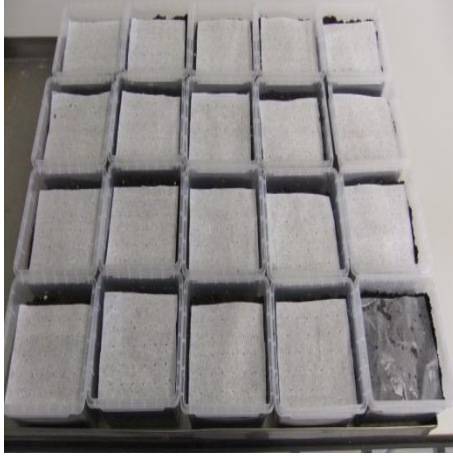
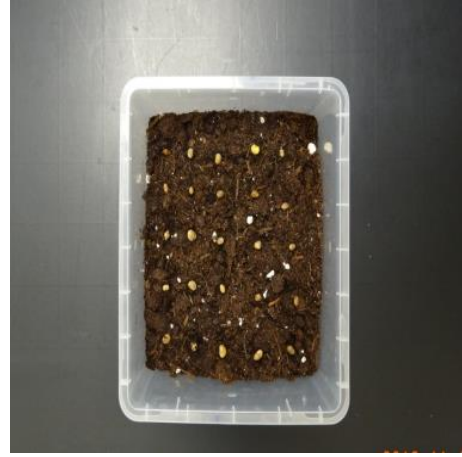
Araştırmada, Türkiye Atom Enerjisi Kurumu (TAEK), Sarayköy Nükleer Araştırma ve Eğitim Merkezi (SANAEM)’nde bulunan Kobalt 60 (Co-60) gama radyasyon kaynağı kullanılmıştır.

4.2. Yöntem

4.2.1. Tuz dozları ve uygulamasının yapılması

Araştırmada, tuz kaynağı olarak toprakta en çok bulunan NaCl (Sigma Aldrich-31434) kullanılmıştır. 0 tuz dozu kontrol olarak alınmıştır, 100, 150 ve 200 mM olmak üzere farklı 4 tuz (NaCl) dozunda incelemeler yapılmıştır.

Farklı korunga ekotiplerinin tuza (NaCl) toleransının belirlenmesi için farklı dozlarda (0-Kontrol, 100, 150 ve 200 mM) NaCl içeren çözeltide 100 adet (25 adet x 4 tekerrür) tohum 10 dakika çalkalanarak ön uygulamaya maruz bırakıldıktan sonra 250 gr torf bulunan 14x14 cm’lik magenta kaplarına ekilmiştir (Şekil 4.1.). Herbir tekerrüre 25 ml olacak şekilde 1 gün arayla 1 ay boyunca farklı dozlarda (0-Kontrol, 100, 150 ve 200 mM) NaCl içeren tuz çözeltisi verilmiştir. Daha sonra farklı NaCl dozları uygulanan bitkilerde morfolojik ölçümler ve fizyolojik analizler yapılmıştır.



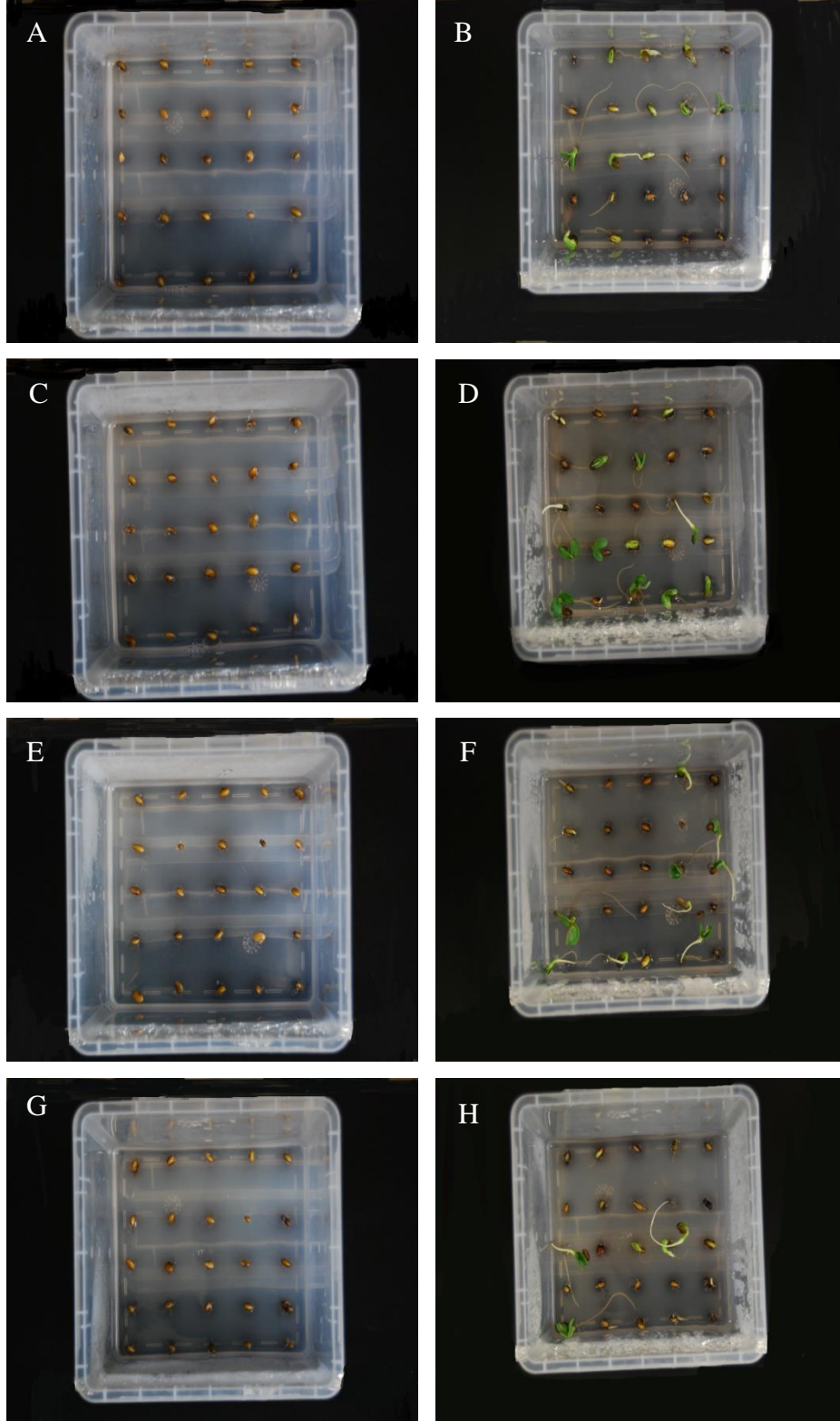
Şekil 4.1. Tuz uygulama denemesinin kurulmasından genel bir görünüm

4.2.2. Gama dozları ve *in vitro* seleksiyon uygulamasının yapılması

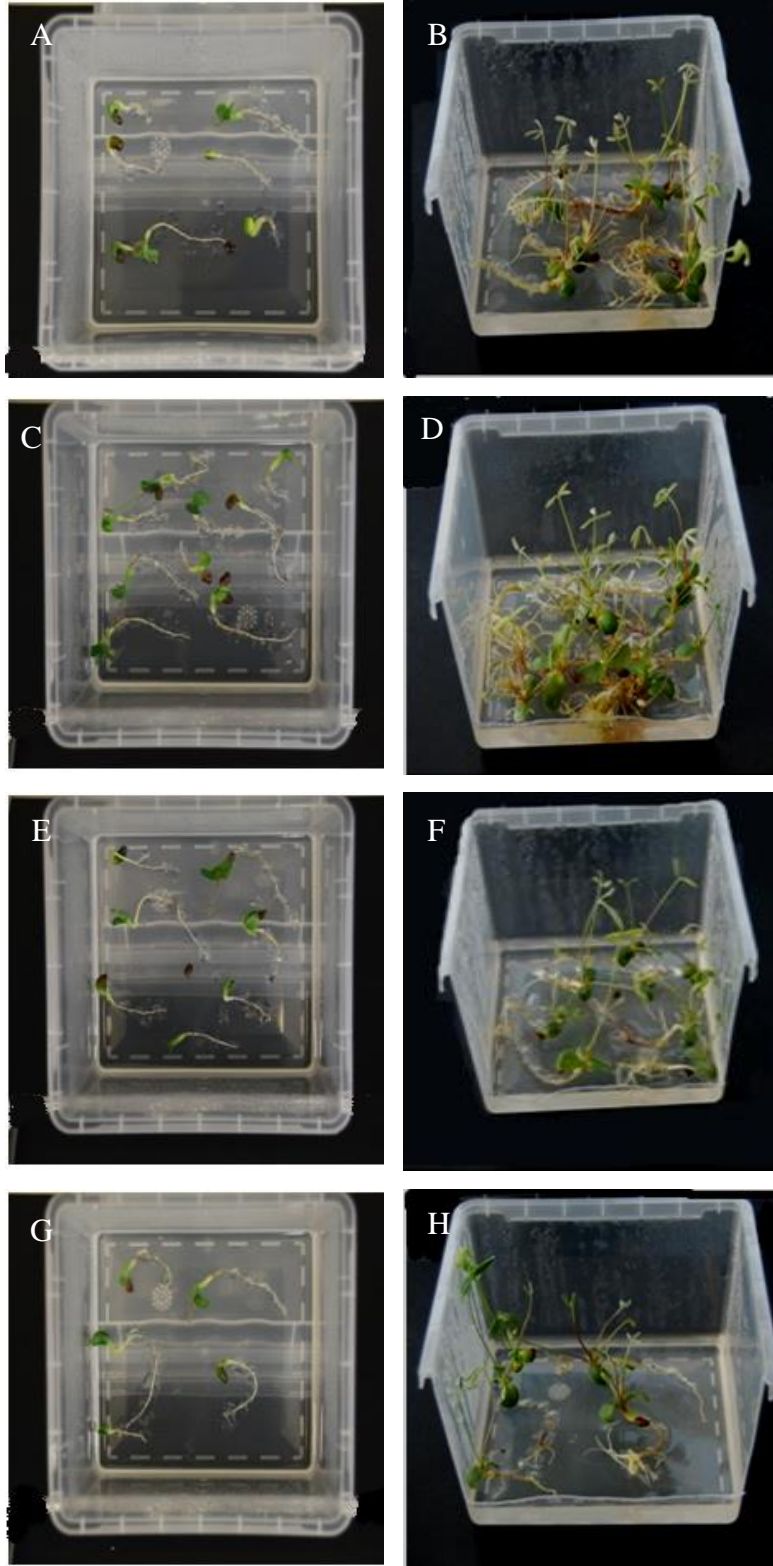
Araştırmada, korungada canlılıkta bir azalma olmaksızın çeşit geliştirmek ve varyasyon oluşturmak amacıyla uygulanabilecek en etkin gama ışın dozları olarak belirlenen 400 ile 600 Gray arasındaki dozlar kullanılmıştır (78). Kobalt-60 (^{60}Co) gama ışını kaynağı ile farklı korunga ekotiplerinin tohumları 0-Kontrol, 400, 500 ve 600 Gy (Gray) gama ışın dozları ile ışınlanmıştır

Belirlenen dozlarda (0-Kontrol, 400, 500 ve 600 Gy) ışınlanmış tohumlar, kabukları soyularak, yüzey sterilizasyonu için % 50 çamasır suyunda (% 5 sodyum hipoklorit içeren) 30 dakika tutulmuş ve daha sonra steril saf su ile 3 kez durulanmıştır. Steril edilen tohumlar, yine steril Magenta kapları içerisinde, belirlenen dozda (150 mM) NaCl, % 3 sukroz içeren ve % 0.7'lik agar ile katılaştırılan MS (Murashige ve Skoog 1962) (85) besin ortamında $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 16 saat ışık/8 saat karanlık fotoperiyotta çimlendirilmiştir. Her Magenta kabına 25 adet tohum yerleştirilmiştir.

Farklı gama ışınları ile ışınlanmış tohumların *in vitro* koşullar altında çimlenmeye alınmasından itibaren 10 gün bekletilmiştir (Şekil 4.2.). 10. gündeki çimlenen tohumlar seçilmiş ve NaCl içermeyen MS0 besi ortamına alınmıştır. Seçilen bitkicikler MS0 besi ortamında 14 gün boyunca stres koşullarından arı gelişmeleri için bekletilmiştir (Şekil 4.3.). Gelişen bitkicikler, içinde torf bulunan plastik bardaklara aktarılmış, nem kaybını azaltmak amacıyla bardakların üzeri plastik poşetlerle kapatılmıştır (Şekil 4.4.). Aktarılan bitkiler iklim dolabında yüksek nemde (% 90-95) iki hafta tutulduktan sonra yavaş yavaş normal nem seviyesine alıştırmıştır.



Şekil 4.2. 'Koçaş' Ekotipine ait ışınlanmamış (kontrol) ve ışınlanmış tohumların 150 mM NaCl tuzu içeren MS0 seleksiyon ortamlarındaki 0. gün ve 10. gün görünüşleri. A) Kontrol 0. gün, B) Kontrol 10. gün, C) 400 Gray 0. gün, D) 400 Gray 10. gün, E) 500 Gray 0. gün, F) 500 Gray 10. gün, G) 600 Gray 0. gün, H) 600 Gray 10.gün.



Şekil 4.3. 10. gün sonunda seçilmiş bitkiciklerin NaCl içermeyen MS0 ortamına aktarılması ve aktarıldıktan 14 gün sonraki durumları. Sırasıyla 10. gün MS0; A) 0 Gy, C) 400 Gy E) 500 Gy, G) 600 Gy; bitkiciklerin 14 gün sonraki MS0 ortamındaki durumları B) 0 Gy, D) 400 Gy, F) 500 Gy, H) 600 Gy



Şekil 4.4. NaCl içermeyen MS0 besi ortamından bitkiciklerin toprağa aktarılması işlemlerinden genel bir görünüm.

4.2.3. Sera şartlarında bitkilere tuz uygulaması ve seleksiyonu

Dış ortama alıştırılan bitkiler, içerisinde 150 mM NaCl tuzu içeren su ile 2 hafta boyunca her bir bitkinin bulunduğu plastik bardaklara 30 ml olacak şekilde 2 gün de bir su verilmiştir. Daha sonra hayatta kalan bitkiler seçilerek farklı bir saksıya aktarılmıştır (Şekil 4.5. ve Şekil 4.6.).



Şekil 4.5. Kontrollü büyüme kabininde *in vitro* koşullardan gelen bitkilere tekrar NaCl uygulamasının yapılması ve hayatta kalan bitkilerin seçimi. A) Uygulama öncesi bitkiler, B) Uygulama sırasında bitkiler, C) Uygulama sonrası bitkiler, D) Uygulama sonrasında hayatta kalan bitki.



Şekil 4.6. Kontrollü büyütme kabinlerinde tuz uygulamasından sonra hayatta kalan bitkiciklerin toprağının yenilenmesi işlemlerinden ve seraya götürülen seçilmiş bitkilerden genel bir görünüm. A) Hayatta kalan bitkinin köklerinin yıkanması, B) Kökleri yıkanmış bitkinin yeni bardaklara aktarılması, C) Yeni bardaklara aktarılmış bitkiler, D) Seraya götürülen bitkiler.

4.3. Korunga Ekotiplerinin Tuza Tepkilerinin Belirlenmesinde Yapılan Ölçüm ve Analizler

4.3.1. Morfolojik ölçümler

Tohum çimlenme yüzdesi, bitki boyu, kök boyu, bitki yaş ve kuru ağırlıkları deneme kurulduktan bir ay sonra hesaplanmıştır.

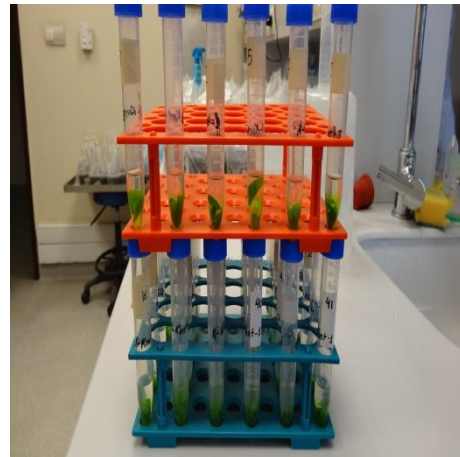
4.3.2 Fotosentetik aktivitenin belirlenmesi

Klorofil a, klorofil b ve toplam klorofil analizi Curtis ve Shetty (1996)'e göre gerçekleştirilmiştir (86). Bunun için 50 mg taze yaprak örneği, 3 ml metanol içerisinde 23C⁰ 'de karanlık bir ortamda 2 saat boyunca tutularak homojenize edilmiştir. Homojenize edilmiş sıvıdan 1.5 ml alınarak 650 ve 665 nm'de spektrofotometre aracılığıyla optik yoğunluğu (OD) ölçülmüş ve klorofil a, klorofil b ve toplam klorofil miktarları µg klorofil/g taze doku cinsinden ölçülmüş ve aşağıda verilen formüller ile hesaplanmıştır.

$$\text{Klorofil a} = (16.5 \times A_{665} - 8.3 \times A_{650}) \times 3 / 0.05$$

$$\text{Klorofil b} = (33.8 \times A_{650} - 12.5 \times A_{665}) \times 3 / 0.05$$

$$\text{Toplam klorofil} = (25.8 \times A_{650} - 4.0 \times A_{665}) \times 3 / 0.05$$





Şekil 4.7. Klorofil analizi için hazırlanan örnekler ve spektrofotometrede okuma işlemi

4.3.3. Lipid peroksidasyonu

Lutts ve arkadaşları (1996) tarafından anlatılan yöntem izlenerek lipid peroksidasyonunun ölçümü gerçekleştirilmiştir (87). 200 mg taze yaprak üzerine 5 ml % 0.1'lik trikloro asetik asit (TCA) ilave edilmiş, bu karışım 12500 rpm devir hızında 20 dakika süre ile santrifüj edilmiştir. 5 ml'lik ekstraktan 3 ml süpernatant alınmış, içinde % 20 TCA bulunan % 0.1'lik tiobarbütrik (TBA)'den 3 ml ilave edilmiştir. Bunun ardından A532 ve A600 nm'de absorbans değerlerinde spektrofotometrede okuma yapılmıştır.

4.3.4. Antioksidatif enzim analizleri

Tuzluluk stresi altındaki bitkilerde meydana gelen enzim değişimlerini saptamak için yaklaşık 1 g taze yaprak örneği sıvı azot içerisinde porselen havanlarda ezilmiş sonra içinde 0.1 mM Na-EDTA bulunan 50 mM'lık 10 ml fosfat tampon çözeltisi (pH=7.6) ile homojenize edilmiştir. Homojenize edilen örnekler 15 dakika süresince 15000 g'de santrifüj edilmiş sonra elde edilen santrifüjantlar enzim analizlerinde kullanılmıştır. Enzim analizlerinin yapılacağı örnekler analiz yapılıncaya kadar +4°C sıcaklıkta muhafaza edilmiştir. Enzim ölçümlerinde son hacimler tampon çözeltisiyle tamamlanmıştır.

4.3.4.1. Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi

Çakmak ve Marschner (1992) ve Çakmak ve arkadaşları (1994)'e göre NBT'nin (nitro blue tetrazolium kloridin) ışık altında O₂ tarafından indirgenmesi yöntemine göre Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi ölçülmüştür (88), (89). Tüm çözeltiler konulduktan

sonra reaksiyon ortamı son hacim 5 ml olacak şekilde, cam şişeler içerisine önce 0.1 mM Na-EDTA içeren 50mM'lık (pH: 7.6) fosfat (P) tamponu, daha sonra üzerine sırasıyla enzim ekstraktı (25-100 µl), 0.5 ml 50 mM Na₂CO₃ (pH: 10.2), 0.5 ml 12 mM L-methionine, 0.5 ml 75 µM P-nitro blue tetrazolium chloride (NBT) ve 10 µM riboflavine eklenmiştir. Örnekler 15 dakika ışık altında bekletildikten sonra, 560 nm'de ölçüm yapılmıştır.

4.3.4.2. Katalaz (CAT)aktivitesi

Katalaz aktivitesi (CAT), H₂O₂'nin 240 nm'de (E=39.4 mM cm⁻¹) parçalanma oranı esas alınarak ölçülmüştür. Bu enzim analizinde son hacim 1 ml olacak şekilde reaksiyon ortamına 0.1 mM EDTA içeren 50 mM'lık fosfat tamponu (pH: 7.6), 0.1 ml 100 mM H₂O₂ ve enzim ekstraktı ilave edilmiştir (88), (89).

4.3.4.3. Askorbat peroksidaz (APX) aktivitesi

Askorbat peroksidaz (APX) aktivitesi, Çakmak ve Marschner (1992), Çakmak ve arkadaşları (1994)'a göre, 290 nm'de (E=2.8 mM cm⁻¹) askorbatın oksidasyonu ölçülerek yapılmıştır. Buna göre, son hacmi 1 ml olacak şekilde ayarlanan reaksiyon ortamına, 0.1 mM EDTA içeren 50 mM'lık fosfat tamponu (pH:7.6), 0.1 ml 10 mM EDTA içeren 12 mM H₂O₂, 0.1 ml 0.25 mM L(-) askorbik asit ve enzim ekstraktı ilave edilmiş ve askorbat oksidasyonu 290 nm'de spektrofotometre aracılığıyla ölçülmüştür (88), (89).

4.3.4.4. Glutatyon redüktaz (GR) aktivitesi

Çakmak ve Marschner (1992), Çakmak ve arkadaşları (1994) 'e göre 340 nm'de (E=6.2 mM cm⁻¹) NADPH'nin oksidasyonu esas alınarak ölçülmüştür (88), (89). Buna göre, son hacmi 1 ml olacak şekilde ayarlanan reaksiyon ortamına 0.1 mM EDTA içeren 50 mM'lık fosfor tamponu (pH= 7.6), 0.1 ml 0.5 mM okside glutatyon (GSSG), 0.1 ml 0.12 mM NADPH ve enzim ekstraktı ilave edilerek NADPH oksidasyonu 340 nm'de ölçülmüştür.

4.3.5. Prolin analizi

Prolin ekstraksiyonu ve analizi Bates ve arkadaşları (1973)'e göre yapılmıştır (90). Buna göre taze bitki örneği alınmış % 3'lük sülfosalisilik asit ile parçalanmış ve daha sonra filtre edilmiştir. Filtre edilen örneklerde, ninhidrin reaktifi kullanılmış ve tüplere konulan örnekler 1 saat 100°C'de su banyosunda tutulmuş ve reaksiyon buz banyosunda sonlandırılmıştır. Soğuyan örneklerin üzerine 4 ml toluen eklenmiş, vortekslenmiş, 520 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak analiz edilmiştir.



Şekil 4.8. Prolin analizi için hazırlanan örnekler

4.4. Verilerin İstatistiksel Değerlendirilmesi

Denemeler tesadüf parselleri deneme desenine göre 4 tekerrür olacak şekilde kurulmuştur. Elde edilen veriler "IBM SPSS Statistics 21" programı yardımıyla varyans analizine tabi tutulmuştur. Uygulama ortalamaları % 5 önem seviyesinde "IBM SPSS Statistics 21" programı kullanılarak Duncan testi ile karşılaştırılmıştır. Ekotipler ve dozlar arasındaki interaksiyon için gerekli analiz "IBM SPSS Statistics 21" programı yardımı ile yapılmış olup, uygulama ortalamaları MSTAT-C bilgisayar programı kullanılarak Duncan testi ile karşılaştırılmıştır. Yüzde değerlere istatistiksel analizden önce arcsin transformasyonu uygulanmıştır (91).

5. ARAŞTIRMA BULGULARI

5.1. Farklı Korunga Ekotiplerinin Tuza (NaCl) Tepkilerinin Belirlenmesi Çalışmaları

Farklı korunga (*Onobrychis viciifolia* Scop.) ekotiplerinin ('Koçaş', 'Malya', 'Altınova' ve 'Ulaş') NaCl tuzuna olan tepkilerini belirlemek amacıyla, morfolojik (fide ve kök boy, fide yaş ve kuru ağırlığı, tohum çimlenme yüzdesi) ve fizyolojik (klorofil a, klorofil b, toplam klorofil, lipid peroksidasyon (MDA), antioksidatif enzimler (SOD, CAT, APX ve GR) ve prolin) parametreler kullanılmıştır. Çalışmada farklı tuz (NaCl) dozlarının (0, 100, 150 ve 200 mM) morfolojik ve fizyolojik parametreler üzerine etkisi incelenmiştir. İncelenen morfolojik ve fizyolojik özelliklere ilişkin veriler ve bu verilerin incelenmesi ile elde edilen sonuçlar herbir korunga ekotipi için ayrı başlıklar altında açıklanmıştır. Ayrıca morfolojik ve fizyolojik bulguların ekotipler arasında kıyaslanması amacıyla oluşturulan çizelgelerde ayrı başlıklar altında sunulmuştur.

5.1.1. Farklı tuz (NaCl) dozlarının korunga ekotiplerinde morfolojik parametreler üzerine etkisi

5.1.1.1. Farklı tuz dozlarının 'Koçaş' ekotipinde morfolojik parametreler üzerine etkisi

Farklı NaCl dozları uygulanan 'Koçaş' ekotipinin tohum çimlenme yüzdesi, fide ve kök boyu ile fide yaş ve kuru ağırlıklarına ait sonuçlar Çizelge 5.1.'de verilmiştir. Çizelge 5.1. görüldüğü gibi, tohum çimlenme yüzdesinde en yüksek değer % 91.00 ile kontrol grubundan, en düşük değer % 44 ile 200 mM NaCl dozundan elde edilmiş olup, 0 mM'dan 200 mM'a % 51.65'lik bir azalma olmuştur. Tuz uygulaması ile birlikte fide boyunda azalma meydana gelmiştir. En yüksek değer 9.30 cm ile kontrol grubundan, en düşük değer ise 4.90 cm ile 200 mM NaCl dozundan alınmıştır. 0 mM'dan 200 mM'a yüzde değişim oranı % 47.32 olarak hesaplanmıştır. Kök boyu bakımından en yüksek değer 11.53 cm ile kontrol grubundan, en düşük değer ise 9.36 cm ile 200 mM NaCl dozundan elde edilmiştir. Kontrol grubu ile 200 mM NaCl dozu arasındaki % 18.83'lik bir azalma olmuştur. NaCl dozlarındaki artışa paralel olarak fide yaş ve kuru ağırlıklarında azalma olmuştur. Buradaki en yüksek değerler sırasıyla, 0.817 g ve 0.542 g ile kontrol bitkilerinden, en düşük değerler sırasıyla, 0.647 g ve 0.422 g ile 200 mM NaCl dozu uygulanmış bitkilerde ölçülmüştür. Yüzdesele değişim sırasıyla, % 20.81 ve % 22.15 olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 5.1. Korunganın 'Koçaş' ekotipinde, farklı tuz dozlarının sera şartlarında tohum çimlenmesi, fide ve kök boyları, fide yaş ve kuru ağırlıkları üzerine etkisi ile 0 mM'dan 200 mM'a artan tuz dozlarında incelenen parametrelerde gözlenen değişim oranı

| NaCl Dozu | Çimlenme | | Fide | | Kök | | Fide | | Fide | |
|-----------------------|----------|-------------|-----------|-------------|-----------|-------------|-----------------|-------------|------------------|-------------|
| | (%) | Değişim (%) | Boyu (cm) | Değişim (%) | Boyu (cm) | Değişim (%) | Yaş Ağırlık (g) | Değişim (%) | Kuru Ağırlık (g) | Değişim (%) |
| 0 mM (Kontrol) | 91.00 a | | 9.30 a | | 11.53 a | | 0.817 a | | 0.542 a | |
| 100 mM | 84.00 a | | 7.50 b | | 10.46 b | | 0.759 a | | 0.489 ab | |
| 150 mM | 63.00 b | -51.65* | 5.53 c | -47.32 | 10.10 bc | -18.83 | 0.674 b | -20.81 | 0.397 bc | -22.15 |
| 200 mM | 44.00 c | | 4.90 d | | 9.36 c | | 0.647 b | | 0.422 c | |

*: (-) işareti değişimin azalış yönünde olduğunu ifade etmektedir

5.1.1.2. Farklı tuz dozlarının 'Malya' ekotipinde morfolojik parametreler üzerine etkisi

Farklı NaCl dozları uygulanan 'Malya' ekotipinin tohum çimlenme yüzdesi, fide ve kök boyu ile fide yaş ve kuru ağırlıklarına ait sonuçlar Çizelge 5.2.'de gösterilmiştir. Çizelge 5.2.'a bakıldığında, tohum çimlenme yüzdesi bakımından en yüksek değer % 89.00 ile kontrol grubundan, en düşük değer % 37.00 ile 200 mM NaCl dozundan elde edildiği görülmektedir. % 58.43'lik bir azalma hesaplanmıştır. Fide ve kök boyu parametreleri için en yüksek değerler sırasıyla, 8.13 ve 10.33 cm ile kontrol grubundan, en düşük değerler sırasıyla 5.06 ve 10.03 cm ile 200 mM NaCl dozundan elde edilmiş olup, kontrol grubu ile 200 mM NaCl arasında sırasıyla, % 37.77 ve % 2.91'lik bir azalma olmuştur. Fide yaş ve kuru ağırlık parametreleri açısından en yüksek değerler sırasıyla, 0.342 ve 0.229 g ile kontrol gruplarında, en düşük değerler sırasıyla, 0.273 ve 0.169 ile 200 mM NaCl dozlarında hesaplanmıştır. Bu parametrelerdeki kontrol grupları ve 200 mM NaCl dozları arasında sırasıyla, % 20.18 ve % 26.21'lik bir azalma olmuştur.

5.1.1.3. Farklı tuz dozlarının 'Altınova' ekotipinde morfolojik parametreler üzerine etkisi

Farklı NaCl dozları uygulanan 'Altınova' ekotipinin tohum çimlenme yüzdesi, fide ve kök boyu ile fide yaş ve kuru ağırlıklarına ait sonuçlar Çizelge 5.3.'de verilmiştir. Çizelge 5.3. incelendiğinde, tohum çimlenme yüzdesinin en yüksek değeri % 83.00 ile kontrol grubundan, en düşük değer % 12.00 ile 200 mM NaCl dozundan elde edildiği görülmektedir. Kontrol grubu ile 200 mM NaCl dozu arasında % 85.55 oranında azalış gerçekleşmiştir. Fide ve kök boyu parametreleri için en yüksek değerler sırasıyla, 6.53 ve 9.43 cm ile kontrol grubundan, en düşük değerler sırasıyla 4.50 ve 7.43 cm ile 200 mM NaCl dozundan elde edilmiş olup, kontrol grubu ile 200 mM NaCl arasında sırasıyla, % 31.09 ve % 21.21'lik bir azalma olmuştur. Fide yaş ve kuru ağırlık parametreleri açısından en yüksek değerler sırasıyla, 0.319 ve 0.188 g ile kontrol gruplarında, en düşük değerler sırasıyla, 0.258 ve 0.175 ile 200 mM NaCl dozlarında hesaplanmıştır. Bu parametrelerdeki kontrol grupları ve 200 mM NaCl dozları arasında sırasıyla, % 19.13 ve % 6.92'lik bir azalma olmuştur.

Çizelge 5.2. Korunganın 'Malya' ekotipinde, farklı tuz dozlarının sera şartlarında tohum çimlenmesi, fide ve kök boyları, fide yaş ve kuru ağırlıkları üzerine etkisi ile 0 mM'dan 200 mM'a artan tuz dozlarında incelenen parametrelerde gözlenen değişim oranı

| NaCl Dozu | Çimlenme | | Fide | | Kök | | Fide | | Fide | |
|-----------------------|----------|-------------|-----------|-------------|-----------|-------------|-----------------|-------------|------------------|-------------|
| | (%) | Değişim (%) | Boyu (cm) | Değişim (%) | Boyu (cm) | Değişim (%) | Yaş Ağırlık (g) | Değişim (%) | Kuru Ağırlık (g) | Değişim (%) |
| 0 mM (Kontrol) | 89.00 a | | 8.13 a | | 10.33 | | 0.342 a | | 0.229 a | |
| 100 mM | 83.00 a | | 8.26 a | | 10.46 | | 0.335 a | | 0.198 ab | |
| 150 mM | 53.00 b | -58.43* | 5.27 b | -37.77 | 11.46 | -2.91 | 0.263 b | -20.18 | 0.173 b | -26.21 |
| 200 mM | 37.00 c | | 5.06 b | | 10.03 | | 0.273 b | | 0.169 b | |

Çizelge 5.3. Korunganın 'Altınova' ekotipinde, farklı tuz dozlarının sera şartlarında tohum çimlenmesi, fide ve kök boyları, fide yaş ve kuru ağırlıkları üzerine etkisi ile 0 mM'dan 200 mM'a artan tuz dozlarında incelenen parametrelerde gözlenen değişim oranı

| NaCl Dozu | Çimlenme | | Fide | | Kök | | Fide | | Fide | |
|-----------------------|----------|-------------|-----------|-------------|-----------|-------------|-----------------|-------------|------------------|-------------|
| | (%) | Değişim (%) | Boyu (cm) | Değişim (%) | Boyu (cm) | Değişim (%) | Yaş Ağırlık (g) | Değişim (%) | Kuru Ağırlık (g) | Değişim (%) |
| 0 mM (Kontrol) | 83.00 a | | 6.53 a | | 9.43 a | | 0.319 a | | 0.188 a | |
| 100 mM | 63.00 b | | 5.83 b | | 9.26 ab | | 0.342 a | | 0.181 ab | |
| 150 mM | 40.00 c | -85.55* | 5.10 c | -31.09 | 8.60 b | -21.21 | 0.286 b | -19.13 | 0.174 b | -6.92 |
| 200 mM | 12.00 d | | 4.50 c | | 7.43 c | | 0.258 c | | 0.175 b | |

*: Her iki Çizelgedeki (-) işareti değişimin azalış yönünde olduğunu ifade etmektedir.

5.1.1.4. Farklı tuz dozlarının 'Ulaş' ekotipinde morfolojik parametreler üzerine etkisi

Farklı NaCl dozları uygulanan 'Ulaş' ekotipinin tohum çimlenme yüzdesi, fide ve kök boyu ile fide yaş ve kuru ağırlıklarına ait sonuçlar Çizelge 5.4.'de verilmiştir. Çizelge 5.4.'de görüldüğü gibi, tohum çimlenme yüzdesi bakımından yüzdesinin en yüksek değeri % 88.00 ile kontrol grubundan, en düşük değer % 55.00 ile 200 mM NaCl dozundan elde edilmiş olup, %36.37'lik bir azalma olmuştur. Fide ve kök boyu parametrelerine bakıldığında, sırasıyla en yüksek değerlerin 7.03 ve 10.20 cm ile kontrol grubunda, en düşük değerlerin sırasıyla 5.06 ve 9.60 cm ile 200 mM NaCl dozlarında olduğu görülmektedir. Kontrol grupları ile 200 mM NaCl dozları arasında sırasıyla, % 28.03 ve % 3.62 oranında azalma gerçekleşmiştir. Fide yaş ve kuru ağırlık parametreleri açısından en yüksek değerler sırasıyla, 0.285 ve 0.187 g ile kontrol gruplarında, en düşük değerler sırasıyla, 0.249 g ile 200 mM NaCl dozunda ve 0.160 ile 150 mM NaCl dozunda hesaplanmıştır. Bu parametrelerdeki kontrol grupları ile 200 mM NaCl dozları arasında sırasıyla, % 6.32 ve % 4.28'lik bir azalma olmuştur.

5.1.1.5. Farklı tuz dozlarının morfolojik parametreler üzerine etkisi bakımından ekotiplerin kıyaslanması

Farklı NaCl dozlarının (0-(kontrol), 100, 150 ve 200 mM) korunga ekotiplerinde ('Koçaş', 'Malya', 'Altınova' ve 'Ulaş') tohum çimlenme yüzdesi üzerine etkisi bakımından kıyaslandığı rakamsal değerler Çizelge 5.5.'de verilmiştir. Çizelge 5.5. incelendiğinde, ekotipler arasında en yüksek çimlenme yüzdesi % 91.00 ile 'Koçaş' ekotipinde belirlenirken, bunu % 89.00 ile Malya, % 88.00 ile 'Ulaş' ve % 83.00 ile 'Altınova' ekotipleri izlemiştir. En yüksek NaCl dozu olan 200 mM'a bakıldığında, en yüksek çimlenme yüzdesi % 55.00 ile 'Ulaş' ekotipinde olduğu görülmektedir. Bunu % 44 ile 'Koçaş', % 37.00 ile 'Malya', ve % 12.00 ile 'Altınova' ekotipleri takip etmiştir. Tuz uygulamasında tüm ekotiplerde tohum çimlenme yüzdesinde kontrol gruplarına göre azalma göstermiştir. Tuz stresi altında her ekotipte 0 mM ile 200mM arasındaki yüzdesel değişim oranı dikkate alındığında en az etkilenen ekotipin % 36.37 ile 'Ulaş' olduğu görülmektedir. Bunu sırasıyla 'Koçaş' (% 51.55), 'Malya' (% 58.43) ve 'Altınova' (% 85.55) ekotipleri izlemiştir. Ekotipler ile NaCl dozları arasındaki interaksiyon % 1 düzeyinde önemli bulunmuştur.

Çizelge 5.4. Korunganın 'Ulaş' ekotipinde, farklı tuz dozlarının sera şartlarında tohum çimlenmesi, fide ve kök boyları, fide yaş ve kuru ağırlıkları üzerine etkisi ile 0 mM'dan 200 mM'a artan tuz dozlarında incelenen parametrelerde gözlenen değişim oranı

| NaCl Dozu | Çimlenme | | Fide | | Kök | | Fide | | Fide | |
|-----------------------|----------|-------------|-----------|-------------|-----------|-------------|-----------------|-------------|------------------|-------------|
| | (%) | Değişim (%) | Boyu (cm) | Değişim (%) | Boyu (cm) | Değişim (%) | Yaş Ağırlık (g) | Değişim (%) | Kuru Ağırlık (g) | Değişim (%) |
| 0 mM (Kontrol) | 88.00 a | | 7.03 a | | 9.96 | | 0.285 a | | 0.187 a | |
| 100 mM | 80.00 a | -36.37* | 5.66 b | -28.03 | 10.00 | -3.62 | 0.250 b | -6.32 | 0.184 a | -4.28 |
| 150 mM | 64.00 b | | 5.36 bc | | 10.20 | | 0.249 b | | 0.160 b | |
| 200 mM | 55.00 c | | 5.06 c | | 9.60 | | 0.267 ab | | 0.179 a | |

Çizelge 5.5. Farklı tuz dozlarının dört korunga ekotipinde tohum çimlenmesi ve 0 mM'dan 200mM'a yüzdesel (%) değişim oranı üzerine etkisi

| NaCl Dozu | Koçaş | | Malya | | Altınova | | Ulaş | | Ortalama |
|-----------------------|----------|-------------|----------|-------------|----------|-------------|----------|-------------|----------|
| | (%) | Değişim (%) | (%) | Değişim (%) | (%) | Değişim (%) | (%) | Değişim (%) | |
| 0 mM (Kontrol) | 91.00 a | | 89.00 a | | 83.00 ab | | 88.00 ab | | 87.75 |
| 100 mM | 84.00 ab | -51.65* | 83.00 ab | -58.43 | 63.00 c | -85.55 | 80.00 b | -36.37 | 77.50 |
| 150 mM | 63.00 c | | 53.00 d | | 40.00 ef | | 64.00 c | | 55.00 |
| 200 mM | 44.00 e | | 37.00 f | | 12.00 g | | 55.00 d | | 37.00 |
| Ortalama | 70.50 | | 65.50 | | 49.50 | | 71.75 | | |

*: Her iki Çizelgede (-) işareti değişimin azalış yönünde olduğunu ifade etmektedir.

Tuz stresi altında yetiştirilen korunga ekotiplerinin fide boyu değerlerinde azalma meydana geldiği saptanmıştır (Çizelge 5.6.) Kontrol grubu bitkilerde en yüksek fide boyu değeri 9.30 cm ile 'Koçaş' ekotipinden elde edilirken, en yüksek NaCl dozu olan 200 mM'da en yüksek değer 5.06 cm ile 'Malya ve 'Ulaş' ekotiplerinden elde edilmiştir. Ekotiplerin kontrol grupları ile 200 mM NaCl dozları arasındaki yüzdesel değişim dikkate alındığında, en az azalışın % 36.37 ile 'Ulaş' ekotipinde olduğu görülmektedir. Bunu % 31.09 ile 'Altınova', % 37.77 ile 'Malya' ve % 47.32 ile 'Koçaş' ekotipleri izlemiştir. Fide boyu bakımından ekotipler ile NaCl dozları arasındaki interaksiyon istatistiki açıdan % 1 düzeyinde önemli bulunmuştur. Genel olarak 'Koçaş' ekotipinin diğer ekotiplerden daha uzun fide boyu verdiği görülmektedir.

Kök boyu bakımından Çizelge 5.7. incelendiğinde, en yüksek değer 11.53 cm ile 'Koçaş' ekotipinin kontrol grubundan, en düşük değer 7.43 cm ile 'Altınova' ekotipinin 200 mM NaCl dozundan elde edildiği görülmektedir. Kontrol grubu bitkiler ile 200 mM NaCl uygulanmış bitkiler arasındaki yüzdesel değişim dikkate alındığında, tuz stresinden oluşan azalışın en fazla % 21.21 ile 'Altınova' ekotipinde olduğu, bunu sırasıyla 'Koçaş' (% 18.83), 'Ulaş' (% 3.62) ve 'Malya' (% 2.62) takip ettiği görülmektedir. Kök boyunda ekotipler ile NaCl dozları arasındaki interaksiyon istatistiki açıdan % 1 düzeyinde önemli çıkmıştır. Ortalamalar incelendiğinde en yüksek değer kontrol grubu bitkilerden alındığı gözlenmektedir. Genel olarak 'Malya' ekotipinin diğer ekotiplerden daha uzun kök boyu verdiği görülmektedir.

Tuz stresine maruz bırakılan ekotiplerde fide yaş ve kuru ağırlık parametreleri de incelenmiştir. Artan tuz stresinin, fide yaş ağırlığında gerek ölçülen gerçek değerlerde gerekse kontrol grupları ile 200 mM NaCl dozları arasındaki yüzdesel değişimde azalmaya neden olduğu belirlenmiştir (Çizelge 5.8.) . Fide yaş ağırlığı bakımından en yüksek değer 'Koçaş' ekotipinin kontrol grubundan (0.817 g) elde edilirken, en düşük değer 'Altınova' ekotipinin 200 mM NaCl dozundan (0.258 g) elde edilmiştir. Ekotipler arasında kontrol grupları ile 200 mM NaCl dozları arasındaki en az azalış % 6.32 ile 'Ulaş' ekotipinde olmuştur. Bunu % 19.13 ile 'Altınova', % 20.18 ile 'Malya' ve % 20.81 ile 'Koçaş' ekotipi izlemiştir. Fide yaş ağırlığı bakımından ekotipler ile NaCl dozları arasındaki interaksiyon istatistiki açıdan % 1 düzeyinde önemli çıkmıştır. Genel olarak ortlamalara bakıldığında 'Koçaş' ekotipinin diğer ekotiplere göre daha yüksek değer verdiği görülmektedir.

Çizelge 5.6. Farklı tuz dozlarının dört korunga ekotipinde fide boyu ve 0 mM'dan 200mM'a yüzdesel (%) değişim oranı üzerine etkisi

| NaCl Dozu | Koçaş | | Malya | | Altınova | | Ulaş | | Ortalama |
|----------------|----------|-------------|----------|-------------|----------|-------------|----------|-------------|----------|
| | (%) | Değişim (%) | (%) | Değişim (%) | (%) | Değişim (%) | (%) | Değişim (%) | |
| 0 mM (Kontrol) | 9.30 a | | 8.13 b | | 6.53 d | | 7.03 cd | | 7.74 |
| 100 mM | 7.50 c | -47.32* | 8.26 b | -37.77 | 5.83 e | -31.09 | 5.66 ef | -28.03 | 6.81 |
| 150 mM | 5.53 efg | | 5.27 e-h | | 5.10 fgh | | 5.36 e-h | | 5.30 |
| 200 mM | 4.90 hi | | 5.06 gh | | 4.50 i | | 5.06 gh | | 4.88 |
| Ortalama | 6.80 | | 6.68 | | 5.49 | | 5.77 | | |

Çizelge 5.7. Farklı tuz dozlarının dört korunga ekotipinde kök boyu ve 0 mM'dan 200mM'a yüzdesel (%) değişim oranı üzerine etkisi

| NaCl Dozu | Koçaş | | Malya | | Altınova | | Ulaş | | Ortalama |
|----------------|----------|-------------|----------|-------------|----------|-------------|----------|-------------|----------|
| | (%) | Değişim (%) | (%) | Değişim (%) | (%) | Değişim (%) | (%) | Değişim (%) | |
| 0 mM (Kontrol) | 11.53 a | | 10.33 cd | | 9.43 cde | | 9.96 cd | | 10.31 |
| 100 mM | 10.46 bc | -18.83* | 10.46 bc | -2.62 | 9.26 de | -21.21 | 10.00 cd | -3.62 | 10.04 |
| 150 mM | 10.10 cd | | 11.46 ab | | 8.60 e | | 10.20 cd | | 10.09 |
| 200 mM | 9.36 cde | | 10.06 cd | | 7.43 f | | 9.60 cde | | 9.11 |
| Ortalama | 10.36 | | 10.57 | | 8.68 | | 9.94 | | |

*: Her iki Çizelgede (-) işareti değişimin azalış yönünde olduğunu ifade etmektedir.

Artan tuz stresine bağlı olarak ekotiplerdeki fide kuru ağırlık değerlerinde azalma olmuştur (Çizelge 5.9.). Ekotipler arasında en yüksek değer 0.542 g ile 'Koçaş' ekotipinin kontrol grubundan, en düşük değer 0.169 g ile 'Malya' ekotipinin 200 mM NaCl dozundan elde edilmiştir. Kontrol grubu bitkiler ile 200 mM NaCl dozlarındaki bitkiler karşılaştırıldığında hesaplanan en düşük yüzdesel değişim % 4.28 ile 'Ulaş' ekotipinde olmuştur. % 6.92 ile 'Altınova' ekotipi ikinci sırada almış, bunu sırasıyla % 22.15 ile 'Koçaş' ekotipi ve % 26.21 ile 'Malya' ekotipi izlemiştir. Fide kuru ağırlık parametresinde de ekotipler ve NaCl dozları arasındaki interaksyon istatistiki açıdan % 1 düzeyinde önemli bulunmuştur. Genel olarak ortalamalara bakıldığında 'Koçaş' ekotipinin diğer ekotiplere göre daha yüksek değerler verdiği görölmektedir.

5.1.2. Farklı tuz (NaCl) dozlarının korunga ekotiplerinde fizyolojik parametreler üzerine etkisi

5.1.2.1. Farklı tuz dozlarının 'Koçaş' ekotipinde fizyolojik parametreler üzerine etkisi

Tuz stresi 'Koçaş' ekotipinde yapraklardaki klorofil a, klorofil b ve toplam klorofil miktarının azalmasına neden olmuştur (Çizelge 5.10.). Klorofil a, klorofil b ve toplam klorofil bakımından en yüksek değerler sırasıyla, 764.400, 819.140 ve 856.600 µg klorofil/g doku ile kontrol grubu bitkilerden elde edilmiş olup, en düşük değerler ise sırasıyla, 283.324, 261.388 ve 379.728 µg klorofil/g doku ile 100 mM NaCl dozları uygulanmış bitkilerden elde edilmiştir. Kontrol grubu bitkiler ile 200 mM NaCl dozu uygulanmış bitkiler arasındaki yüzdesel değişim bakımından en az azalışı % 53.71 ile klorofil a da, en yüksek azalışı % 55.55 ile toplam klorofil de hesaplanmıştır.

Sera şartlarında 1 ay boyunca farklı dozlarda NaCl uygulanmış bitkilerin yapraklarından alınan örneklerde ölçülen SOD, CAT, APX ve GR antioksidatif enzimlere, lipid peroksidasyona (MDA) ve proline ait sonuçlar Çizelge 5.11. ve Çizelge 5.12.'de verilmiştir. Çizelge 5.11. incelendiğinde, artan NaCl dozları ile birlikte SOD, CAT ve APX aktivitelerinin arttığı belirlenmiştir. SOD, CAT ve APX enzimlerinin aktiviteleri bakımından en yüksek miktarlar sırasıyla 307.78, 2230.36 ve 28.06 U/dk/mg T.A ile 150 mM NaCl uygulamış bitkilerde, en düşük değerler ise sırasıyla, 43.43, 617.32 ve 3.46 U/dk/mg T.A ile kontrol grubu bitkilerinde ölçülmüştür.

Çizelge 5.8. Farklı tuz dozlarının dört korunga ekotipinde fide yaş ağırlık ve 0 mM'dan 200mM'a yüzdesel (%) değişim oranı üzerine etkisi

| NaCl Dozu | Koçaş | | Malya | | Altınova | | Ulaş | | Ortalama |
|-----------------------|---------|-------------|----------|-------------|-----------|-------------|-----------|-------------|----------|
| | (%) | Değişim (%) | (%) | Değişim (%) | (%) | Değişim (%) | (%) | Değişim (%) | |
| 0 mM (Kontrol) | 0.817 a | | 0.342 d | | 0.319 de | | 0.285 def | | 0.440 |
| 100 mM | 0.759 b | -20.81* | 0.335 d | -20.18 | 0.342 d | -19.13 | 0.250 f | -6.32 | 0.421 |
| 150 mM | 0.674 c | | 0.263 ef | | 0.286 def | | 0.249 f | | 0.368 |
| 200 mM | 0.647 c | | 0.273 ef | | 0.258 f | | 0.267 ef | | 0.361 |
| Ortalama | 0.724 | | 0.303 | | 0.301 | | 0.262 | | |

Çizelge 5.9. Farklı tuz dozlarının dört korunga ekotipinde fide kuru ağırlık ve 0 mM'dan 200mM'a yüzdesel (%) değişim oranı üzerine etkisi

| NaCl Dozu | Koçaş | | Malya | | Altınova | | Ulaş | | Ortalama |
|-----------------------|---------|-------------|----------|-------------|----------|-------------|----------|-------------|----------|
| | (%) | Değişim (%) | (%) | Değişim (%) | (%) | Değişim (%) | (%) | Değişim (%) | |
| 0 mM (Kontrol) | 0.542 a | | 0.229 d | | 0.188 de | | 0.187 de | | 0.286 |
| 100 mM | 0.489 b | -22.15* | 0.198 de | -26.21 | 0.181 de | -6.92 | 0.184 de | -4.28 | 0.263 |
| 150 mM | 0.397 c | | 0.173 de | | 0.174 de | | 0.160 e | | 0.226 |
| 200 mM | 0.422 c | | 0.169 de | | 0.175 de | | 0.179 de | | 0.236 |
| Ortalama | 0.462 | | 0.192 | | 0.179 | | 0.177 | | |

*: (-) işareti değişimin azalış yönünde olduğunu ifade etmektedir.

Çizelge 5.10. Korunganın 'Koçaş' ekotipinde, farklı tuz dozlarının sera şartlarında gelişen fidelerin yapraklarında klorofil a, klorofil b ve toplam klorofil kapsamları üzerine etkisi ile 0 mM'dan 200 mM'a artan tuz dozlarında incelenen karakterlerde gözlenen değişim oranı

| NaCl Dozu | Klorofil a | | Klorofil b | | Toplam Klorofil | |
|----------------|----------------------|-------------|----------------------|-------------|----------------------|-------------|
| | (µg klorofil/g doku) | Değişim (%) | (µg klorofil/g doku) | Değişim (%) | (µg klorofil/g doku) | Değişim (%) |
| 0 mM (Kontrol) | 764.400 a | | 819.140 ab | | 856.600 a | |
| 100 mM | 283.324 b | -53.71* | 261.388 c | -54.36 | 379.728 b | -55.55 |
| 150 mM | 798.944 a | | 888.496 a | | 898.656 a | |
| 200 mM | 353.856 b | | 373.924 bc | | 380.824 b | |

*: (-) işareti değişimin azalış yönünde olduğunu ifade etmektedir.

Çizelge 5.11. Korunganın 'Koçaş' ekotipinde, farklı tuz dozlarının antioksidatif enzimler Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), askorbat peroksidaz (APX) kapsamları üzerine etkisi ile 0 mM'dan 150 mM'a artan tuz dozlarında incelenen parametrelerde gözlenen değişim oranı

| NaCl Dozu | SOD | | CAT | | APX | |
|----------------|---------------|-------------|---------------|-------------|---------------|-------------|
| | (U/dk/mg T.A) | Değişim (%) | (U/dk/mg T.A) | Değişim (%) | (U/dk/mg T.A) | Değişim (%) |
| 0 mM (Kontrol) | 43.43 b | | 617.32 c | | 3.46 b | |
| 100 mM | 277.40 a | 608.68 | 1100.73 b | 261.29 | 21.99 a | 710.98 |
| 150 mM | 307.78 a | | 2230.36 a | | 28.06 a | |

Kontrol bitkilerine göre 150 mM NaCl dozu uygulanmış bitkilerdeki SOD değişimin oranı % 608.68, CAT değişim oranı % 261.29 ve APX değişim oranı % 710.98 olarak bulunmuştur.

Çizelge 5.12.'ye bakıldığında, GR, MDA ve prolin miktarlarının artan NaCl dozları ile birlikte arttığı görülmektedir. En yüksek GR (137.81 U/dk/mg T.A), MDA (18.68 µ mol/g T.A) ve prolin (15.32 µ mol/g T.A) miktarların 150 mM NaCl dozu uygulanmış bitkilerde olduğu, en düşük miktarların ise sırasıyla 10.43 U/dk/mg T.A, 5.58 µ mol/g T.A ve 2.25 µ mol/g T.A ile kontrol grubu bitkilerde olduğu belirlenmiştir. Yüzdesel değişim oranlarına bakıldığında, GR'de % 1221.28, MDA'da % 159.80 ve prolinde % 580.88 olduğu görülmektedir. Genel olarak Çizelge 5.11. ve Çizelge 5.12.'ye bakıldığında, 'Koçaş' ekotipinde antioksidatif enzimlerin miktarı açısından en yüksek değeri 2230.36 U/dk/mg T.A ile CAT enziminin verdiği görülmekte olup, antioksidatif enzimlerdeki % değişim dikkate alındığında en yüksek artışı % 1221.28 ile GR'nin verdiği görülmektedir.

5.1.2.2. Farklı tuz dozlarının 'Malya' ekotipinde fizyolojik parametreler üzerine etkisi

Artan tuz stresi 'Malya' ekotipinin yapraklardaki klorofil a, klorofil b ve toplam klorofil miktarının önce artmasına daha sonra azalmasına neden olmuştur (Çizelge 5.13.). Klorofil a miktarı bakımından en yüksek değer 637.752 µg klorofil/g doku ile 100 mM NaCl dozunda, en düşük değer ise 248.436 µg klorofil/g doku ile 200 mM NaCl dozunda elde edilmiştir. Klorofil b miktarına bakıldığında en yüksek değer 150 mM NaCl dozunda (489.240 µg klorofil/g doku), en düşük değer 200 mM NaCl dozunda (236.692 µg klorofil/g doku) olduğu görülmektedir. Toplam klorofil incelendiğinde 678.000 µg klorofil/g doku ile en yüksek değerin 150 mM NaCl dozunda, 279.464 µg klorofil/g doku ile en düşük dozun 200 mM NaCl dozunda olduğu görülmektedir. Kontrol grubu bitkilerdeki klorofil a, klorofil b ve toplam klorofil kapsamı ile 200 mM NaCl uygulanmış bitkilerdeki klorofil a, klorofil b ve toplam klorofil kapsamı arasındaki değişim oranının klorofil a için % 56.91, klorofil b için % 35.16 ve toplam klorofil için % 40.35 olduğu görülmektedir.

Çizelge 5.14. ve Çizelge 5.15.'de SOD, CAT, APX ve GR antioksidatif enzimlere, lipid peroksidasyona (MDA) ve proline ait sonuçlar gösterilmiştir.

Çizelge 5.12. Korunganın 'Koçaş' ekotipinde, farklı tuz dozlarının antioksidatif enzim glutasyon redüktaz (GR), lipid peroksidasyon (MDA) ve prolin kapsamları üzerine etkisi ile 0 mM'dan 150 mM'a artan tuz dozlarında incelenen parametrelerde gözlenen değişim oranı

| NaCl Dozu | GR | | MDA | | Prolin | |
|----------------|---------------|-------------|--------------------|-------------|--------------------|-------------|
| | (U/dk/mg T.A) | Değişim (%) | (μ mol/g T.A) | Değişim (%) | (μ mol/g T.A) | Değişim (%) |
| 0 mM (Kontrol) | 10.43 c | | 5.58 c | | 2.25 c | |
| 100 mM | 56.81 b | 1221.28 | 11.47 b | 159.80 | 8.23 b | 580.88 |
| 150 mM | 137.81 a | | 18.68 a | | 15.32 a | |

Çizelge 5.13. Korunganın 'Malya' ekotipinde, farklı tuz dozlarının sera şartlarında gelişen fidelerin yapraklarında klorofil a, klorofil b ve toplam klorofil kapsamları üzerine etkisi ile 0 mM'dan 200 mM'a artan tuz dozlarında incelenen parametrelerde gözlenen değişim oranı

| NaCl Dozu | Klorofil a | | Klorofil b | | Toplam Klorofil | |
|----------------|----------------------------|-------------|----------------------------|-------------|----------------------------|-------------|
| | (μ g klorofil/g doku) | Değişim (%) | (μ g klorofil/g doku) | Değişim (%) | (μ g klorofil/g doku) | Değişim (%) |
| 0 mM (Kontrol) | 576.532 a | | 338.904 b | | 469.264 b | |
| 100 mM | 637.752 a | -56.91* | 442.764 a | -35.16 | 610.384 a | -40.45 |
| 150 mM | 618.000 a | | 489.240 a | | 678.000 a | |
| 200 mM | 248.436 b | | 236.692 c | | 279.464 c | |

*: (-) işareti değişimin azalış yönünde olduğunu ifade etmektedir

Çizelge 5.14.'e bakıldığında, kontrol bitkilerine göre 150 mM NaCl uygulanmış bitkilerdeki SOD, CAT ve APX miktarlarının artış gösterdiği belirlenmiştir. Kontrol grubu ile 150 mM NaCl arasındaki değişim oranı SOD'da % 29.45, CAT'da 17.05 ve APX'de 276.37 olarak hesaplanmıştır. GR, MDA ve prolindeki değişim sırasıyla, % 91.12, % 128.08 ve % 201.79 olduğu saptanmıştır (Çizelge 5.15.). Çizelge 5.15. incelendiğinde, GR, MDA ve prolin için en yüksek değerler sırasıyla, 86.33 U/dk/mg T.A, 22.35 µ mol/g T.A ve 10.11 µ mol/g T.A ile 150 mM NaCl uygulanmış bitkilerden, en düşük değerler sırasıyla, 45.11 U/dk/mg T.A, 8.66 µ mol/g T.A ve 3.35 µ mol/g T.A kontrol grubundan elde edildiği görülmektedir. 'Malya' ekotipinde antioksidatif enzimler içerisinde en yüksek değeri 794.42 U/dk/mg T.A ile CAT'ın verdiği bulunmuştur. Bunu sırasıyla SOD (231.11 U/dk/mg T.A), GR (86.33 U/dk/mg T.A) ve APX (19.91 U/dk/mg T.A) izlemiştir.

5.1.2.3. Farklı tuz dozlarının 'Altınova' ekotipinde fizyolojik parametreler üzerine etkisi

'Altınova' ekotipinde klorofil a, klorofil b ve toplam klorofil miktarının kontrol grubuna göre 100 mM NaCl dozunda önce arttığı, sonra 100 mM NaCl dozuna göre 150 mM NaCl dozunda azaldığı, daha sonra 150 mM NaCl dozuna göre 200 mM NaCl dozunda azaldığı belirlenmiştir (Çizelge 5.16.) . En yüksek klorofil a, klorofil b ve toplam klorofil miktarı kontrol gruplarında sırasıyla, 811.840, 634.020 ve 883.160 µg klorofil/g doku olarak bulunmuştur. En düşük klorofil a, klorofil b ve toplam klorofil miktarı sırasıyla, 426.824, 329.236 ve 460.776 µg klorofil/g doku ile 150 mM NaCl dozu uygulanmış bitkilerde saptanmıştır. Kontrol grubu bitkiler ile 200 mM NaCl uygulanmış bitkiler arasındaki yüzde değişim klorofil a'da % 28.06, klorofil b'de 27.98 ve toplam klorofil'de % 28.02 olarak bulunmuştur.

Çizelge 5.17.'de SOD, CAT, APX antioksidatif enzimlere ait sonuçlar verilmiştir. SOD, CAT, APX'in miktarlarının tuz stresi ile birlikte arttığı belirlenmiştir. En yüksek değerler 150 mM NaCl dozunda sırasıyla, 314.90, 1343.15 ve 16.30 U/dk/mg T.A ve en düşük değerler sırasıyla 200.21, 1163.90 ve 5.90 U/dk/mg T.A ile kontrol gruplarında bulunmuştur. Kontrol grupları ile 150 mM NaCl dozları arasındaki değişim SOD'da % 57.28, CAT'da % 15.40 ve APX'de % 176.21 olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 5.14. Korunganın 'Malya' ekotipinde, farklı tuz dozlarının antioksidatif enzimler Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), askorbat peroksidaz (APX) kapsamları üzerine etkisi ile 0 mM'dan 150 mM'a artan tuz dozlarında incelenen parametrelerde gözlenen değişim oranı

| NaCl Dozu | SOD | | CAT | | APX | |
|----------------|---------------|-------------|---------------|-------------|---------------|-------------|
| | (U/dk/mg T.A) | Değişim (%) | (U/dk/mg T.A) | Değişim (%) | (U/dk/mg T.A) | Değişim (%) |
| 0 mM (Kontrol) | 178.52 b | | 678.68 c | | 5.29 b | |
| 100 mM | 189.15 b | 29.45 | 903.55 a | 17.05 | 14.57 a | 276.37 |
| 150 mM | 231.11 a | | 794.42 b | | 19.91 a | |

Çizelge 5.15. Korunganın 'Malya' ekotipinde, farklı tuz dozlarının antioksidatif enzim glutatyon redüktaz (GR), lipid peroksidasyon (MDA) ve prolin kapsamları üzerine etkisi ile 0 mM'dan 150 mM'a artan tuz dozlarında incelenen parametrelerde gözlenen değişim oranı

| NaCl Dozu | GR | | MDA | | Prolin | |
|----------------|---------------|-------------|--------------------|-------------|--------------------|-------------|
| | (U/dk/mg T.A) | Değişim (%) | (μ mol/g T.A) | Değişim (%) | (μ mol/g T.A) | Değişim (%) |
| 0 mM (Kontrol) | 45.17 b | | 8.66 b | | 3.35 c | |
| 100 mM | 91.78 a | 91.12 | 26.37 a | 158.08 | 8.01 b | 201.79 |
| 150 mM | 86.33 a | | 22.35 a | | 10.11 a | |

Çizelge 5.16. Korunganın 'Altinova' ekotipinde, farklı tuz dozlarının sera şartlarında gelişen fidelerin yapraklarında klorofil a, klorofil b ve toplam klorofil kapsamları üzerine etkisi ile 0 mM'dan 200 mM'a artan tuz dozlarında incelenen parametrelerde gözlenen değişim oranı

| NaCl Dozu | Klorofil a | | Klorofil b | | Toplam Klorofil | |
|----------------|----------------------|-------------|----------------------|-------------|----------------------|-------------|
| | (µg klorofil/g doku) | Değişim (%) | (µg klorofil/g doku) | Değişim (%) | (µg klorofil/g doku) | Değişim (%) |
| 0 mM (Kontrol) | 811.840 a | | 634.020 a | | 883.160 a | |
| 100 mM | 568.988 bc | -28.06* | 439.432 bc | -27.98 | 614.712 bc | -28.02 |
| 150 mM | 426.824 c | | 329.236 c | | 460.776 c | |
| 200 mM | 584.116 b | | 456.584 b | | 635.784 b | |

*: (-) işareti değişimin azalış yönünde olduğunu ifade etmektedir.

Çizelge 5.17. Korunganın 'Altinova' ekotipinde, farklı tuz dozlarının antioksidatif enzimler Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), askorbat peroksidaz (APX) kapsamları üzerine etkisi ile 0 mM'dan 150 mM'a artan tuz dozlarında incelenen parametrelerde gözlenen değişim oranı

| NaCl Dozu | SOD | | CAT | | APX | |
|----------------|---------------|-------------|---------------|-------------|---------------|-------------|
| | (U/dk/mg T.A) | Değişim (%) | (U/dk/mg T.A) | Değişim (%) | (U/dk/mg T.A) | Değişim (%) |
| 0 mM (Kontrol) | 200.21 b | | 1163.90 a | | 5.90 b | |
| 100 mM | 275.41 ab | 57.28 | 400.00 b | 15.40 | 14.63 a | 176.21 |
| 150 mM | 314.90 a | | 1343.15 a | | 16.30 a | |

GR, MDA ve proline ait sonuçlar Çizelge 5.18.'de verilmiştir. GR, MDA ve prolin bakımından en yüksek değerler 150 mM NaCl dozunda sırasıyla, 99.49 U/dk/mg T.A, 21.74 μ mol/g T.A ve 2.52 μ mol/g T.A olarak belirlenmiş olup, en düşük değerler sırasıyla 25.98 U/dk/mg T.A, 7.34 μ mol/g T.A ve 2.52 μ mol/g T.A ile 0 mM NaCl dozundan elde edilmiştir. Kontrol grupları ile 150 mM NaCl dozları arasındaki değişim GR'de % 282.94, MDA'da % 196.18 ve prolin'de % 276.76 olarak belirlenmiştir. Çizelge 5.17. ve Çizelge 5.18. genel olarak incelendiğinde, antioksidatif enzimler içerisinde en yüksek değeri CAT (1343.15 U/dk/mg T.A) vermiştir. Bunu 314.90 U/dk/mg T.A ile SOD, 99.49 U/dk/mg T.A ile GR ve 16.30 U/dk/mg T.A ile APX takip etmiştir.

5.1.2.4. Farklı tuz dozlarının 'Ulaş' ekotipinde fizyolojik parametreler üzerine etkisi

Tuz stresi 'Ulaş' ekotipinin yapraklardaki klorofil a, klorofil b ve toplam klorofil miktarlarının azalmasına neden olmuştur (Çizelge 5.19.). Klorofil a, klorofil b ve toplam klorofil kapsamları bakımından en yüksek değerler sırasıyla, 441.964, 404.596 ve 517.856 μ g klorofil/g doku kontrol grubu bitkilerinden elde edilmiş olup, en düşük değerler sırasıyla, 262.592, 212.648 ve 292.208 μ g klorofil/g doku ile 200 mM NaCl dozundan elde edilmiştir. 0 mM NaCl dozu ile 200 mM NaCl dozu arasındaki değişim oranları klorofil a'da % 40.59, klorofil b'de % 47.45 ve toplam klorofilde % 43.58 olarak hesaplanmıştır.

SOD, CAT, APX, GR, MDA ve proline ait sonuçlar Çizelge 5.20. ve Çizelge 5.21.'de verilmiştir. Çizelge 5.20. ve Çizelge 5.21. incelendiğinde, SOD, CAT, APX, GR, ve prolin için en yüksek değerler sırasıyla, 150.59, 1485.93, 11.61, 57.87 U/dk/mg T.A, 10.37 μ mol/g T.A ile 150 mM dozunda, MDA için 24.58 μ mol/g T.A ile 100 mM NaCl dozunda belirlenmiştir. En düşük değerler ise yine sırasıyla, 131.11, 763.96, 2.86, 27.77 U/dk/mg T.A, 16.87 ve 3.38 μ mol/g T.A ile 0 mM NaCl dozunda ölçülmüştür. 0 mM'dan 150 mM'a artan tuz dozlarında gözlenen değişim oranları SOD'da % 14.85, CAT'da % 94.50, APX'de % 305.94, GR'de % 108.39, MDA'da % 4.37 ve prolin de % 206.80 olarak hesaplanmıştır. Antioksidatif enzimler içerisinde en yüksek miktarı CAT (1485.93 U/dk/mg T.A) vermiştir. Değişim oranı dikkate alındığında en yüksek değişimi % 305.94 ile APX vermiştir.

Çizelge 5.18. Korunganın 'Altınova' ekotipinde, farklı tuz dozlarının antioksidatif enzim glutatyon redüktaz (GR), lipid peroksidasyon (MDA) ve prolin kapsamları üzerine etkisi ile 0 mM'dan 150 mM'a artan tuz dozlarında incelenen parametrelerde gözlenen değişim oranı

| NaCl Dozu | GR | | MDA | | Prolin | |
|-----------------------|---------------|-------------|--------------------|-------------|--------------------|-------------|
| | (U/dk/mg T.A) | Değişim (%) | (μ mol/g T.A) | Değişim (%) | (μ mol/g T.A) | Değişim (%) |
| 0 mM (Kontrol) | 25.98 c | | 7.34 b | | 2.52 b | |
| 100 mM | 47.34 b | 282.94 | 18.90 a | 196.18 | 5.39 ab | 276.76 |
| 150 mM | 99.49 a | | 21.74 a | | 9.57 a | |

Çizelge 5.19. Korunganın 'Ulaş' ekotipinde, farklı tuz dozlarının sera şartlarında gelişen fidelerin yapraklarında klorofil a, klorofil b ve toplam klorofil kapsamları üzerine etkisi ile 0 mM'dan 200 mM'a artan tuz dozlarında incelenen parametrelerde gözlenen değişim oranı

| NaCl Dozu | Klorofil a | | Klorofil b | | Toplam Klorofil | |
|-----------------------|----------------------------|-------------|----------------------------|-------------|----------------------------|-------------|
| | (μ g klorofil/g doku) | Değişim (%) | (μ g klorofil/g doku) | Değişim (%) | (μ g klorofil/g doku) | Değişim (%) |
| 0 mM (Kontrol) | 441.964 a | | 404.596 a | | 517.856 a | |
| 100 mM | 304.072 b | -40.59* | 236.248 b | -47.45 | 329.728 b | -43.58 |
| 150 mM | 296.496 b | | 288.724 ab | | 399.264 ab | |
| 200 mM | 262.592 b | | 212.648 b | | 292.208 b | |

*: (-) işareti değişimin azalış yönünde olduğunu ifade etmektedir.

Çizelge 5.20. Korunganın 'Ulaş' ekotipinde, farklı tuz dozlarının antioksidatif enzimler Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), askorbat peroksidaz (APX) kapsamları üzerine etkisi ile 0 mM'dan 150 mM'a artan tuz dozlarında incelenen parametrelerde gözlenen değişim oranı

| NaCl Dozu | SOD | | CAT | | APX | |
|----------------|---------------|-------------|---------------|-------------|---------------|-------------|
| | (U/dk/mg T.A) | Değişim (%) | (U/dk/mg T.A) | Değişim (%) | (U/dk/mg T.A) | Değişim (%) |
| 0 mM (Kontrol) | 131.11 c | | 763.96 b | | 2.86 c | |
| 100 mM | 192.00 a | 14.85 | 881.98 b | 94.50 | 10.60 b | 305.94 |
| 150 mM | 150.59 b | | 1485.93 a | | 11.61 a | |

Çizelge 5.21. Korunganın 'Ulaş' ekotipinde, farklı tuz dozlarının antioksidatif enzim glutasyon redüktaz (GR), lipid peroksidasyon (MDA) ve prolin kapsamları üzerine etkisi ile 0 mM'dan 150 mM'a artan tuz dozlarında incelenen parametrede gözlenen değişim oranı

| NaCl Dozu | GR | | MDA | | Prolin | |
|----------------|---------------|-------------|--------------------|-------------|--------------------|-------------|
| | (U/dk/mg T.A) | Değişim (%) | (μ mol/g T.A) | Değişim (%) | (μ mol/g T.A) | Değişim (%) |
| 0 mM (Kontrol) | 27.77 b | | 16.87 b | | 3.38 c | |
| 100 mM | 59.50 a | 108.39 | 24.58 a | 4.97 | 7.07 b | 206.80 |
| 150 mM | 57.87 a | | 17.71 b | | 10.37 a | |

5.1.2.5. Farklı tuz dozlarında fizyolojik parametreler bakımından ekotiplerin kıyaslanması

Tuz (NaCl) stresinin, dört korunga ekotipinde ('Koçaş', 'Malya', 'Altınova' ve 'Ulaş') klorofil a, klorofil b ve toplam klorofil kapsamaları üzerine etkisi ve 0 mM'dan 200 mM NaCl'a yüzdesel değişim sonuçları Çizelge 5.22, Çizelge 5.23 ve Çizelge 5.24'de verilmiştir. Ekotipler ile NaCl dozları arasındaki interaksiyon klorofil a, klorofil b ve toplam klorofil kapsamaları için istatistiki açıdan % 1 düzeyinde önemli bulunmuştur. Tuz stresi ile birlikte tüm ekotiplerde klorofil a, klorofil b ve toplam klorofil kapsamalarında kontrol grubu bitkilere göre azalma meydana gelmiştir. Klorofil a kapsamı bakımından ekotipler içerisinde en yüksek miktarı hem kontrol grubunda hem de 200 mM NaCl dozunda sırasıyla 811.840 ve 584.116 µg klorofil/g doku ile 'Altınova' ekotipi vermiştir (Çizelge 5.22). Bunu kontrol ve 200 mM NaCl dozu sırayla olmak üzere 764.400, 353.856 µg klorofil/g doku ile 'Koçaş' ekotipi takip etmiştir. 'Malya' ve 'Ulaş' ekotipleri de kontrol gruplarında 576.532, 441.964 µg klorofil/g doku , 200 mM NaCl dozlarında 248.436, 262.592 µg klorofil/g doku olmak üzere izlemişlerdir. Klorofil a bakımından 0 mM'dan 200 mM NaCl'a yüzdesel değişim sonuçlarına bakıldığında en az düşüş % 28.06 ile 'Altınova' ekotipinde belirlenmiştir. Bunu sırasıyla 'Ulaş' (% 40.59), 'Koçaş' (% 53.71) ve 'Malya' (% 56.91) takip etmiştir. Genel olarak ortalamalara bakıldığında 'Altınova' ekotipi en yüksek sonucu vermiştir.

Klorofil b kapsamı açısından en yüksek değeri ekotipler arasından 'Koçaş'ın kontrol grubu (819.140 µg klorofil/g doku) vermiştir (Çizelge 5.23.). 200 mM NaCl dozları dikkate alındığında en yüksek değer 456.584 ile 'Altınova' ekotipinde belirlenmiştir. 0 mM'dan 200 mM NaCl'a yüzdesel değişim sonuçlarına bakıldığında en az düşüş % 27.98 ile 'Altınova' ekotipinde görülmektedir. Bunu, % 30.16 ile 'Malya', % 47.45 ile 'Ulaş' ve % 54.36 ile 'Koçaş' ekotipleri takip etmiştir. Genel olarak ortalamalara bakıldığında 'Altınova' ekotipinin daha yüksek değerler verdiği görülmektedir. Çizelge 5.24. incelendiğinde, toplam klorofil kapsamı bakımından hem kontrol hem de 200 mM NaCl dozunda en yüksek sonuçları sırasıyla 888.160 ve 635.784 µg klorofil/g doku ile 'Altınova' ekotipi vermiştir. Bunu sırasıyla 0 mM'da 856.600, 200 mM'da 380.824 µg klorofil/g doku ile 'Koçaş' ekotipi izlemiştir. 'Ulaş' ve 'Malya' ekotiplerinde 0 ve 200 mM'daki değerler sırasıyla 517.856, 292.208 ve 469.264, 279.464 µg klorofil/g doku olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 5.22. Farklı tuz dozlarının dört korunga ekotipinde klorofil a kapsamı ve 0 mM'dan 200 mM'a artan tuz dozlarında gözlenen değişim oranı üzerine etkisi

| NaCl Dozu | Koçaş | | Malya | | Altınova | | Ulaş | | Ortalama |
|-----------------------|----------------------|-------------|----------------------|-------------|----------------------|-------------|----------------------|-------------|----------|
| | (µg klorofil/g doku) | Değişim (%) | (µg klorofil/g doku) | Değişim (%) | (µg klorofil/g doku) | Değişim (%) | (µg klorofil/g doku) | Değişim (%) | |
| 0 mM (Kontrol) | 764.400 ab | | 576.532 cd | | 811.840 a | | 441.964 de | | 648.684 |
| 100 mM | 283.324 dfg | -53.71* | 637.752 bc | -56.91 | 568.988 cd | -28.06 | 304.072 eg | -40.59 | 448.534 |
| 150 mM | 798.944 a | | 618.000 bc | | 426.824 def | | 296.496 eg | | 535.066 |
| 200 mM | 353.856 efg | | 248.436 g | | 584.116 cd | | 262.592 fg | | 362.250 |
| Ortalama | 550.131 | | 520.180 | | 597.942 | | 326.281 | | |

Çizelge 5.23. Farklı tuz dozlarının dört korunga ekotipinde klorofil b kapsamı ve 0 mM'dan 200 mM'a artan tuz dozlarında gözlenen değişim oranı üzerine etkisi

| NaCl Dozu | Koçaş | | Malya | | Altınova | | Ulaş | | Ortalama |
|-----------------------|----------------------|-------------|----------------------|-------------|----------------------|-------------|----------------------|-------------|----------|
| | (µg klorofil/g doku) | Değişim (%) | (µg klorofil/g doku) | Değişim (%) | (µg klorofil/g doku) | Değişim (%) | (µg klorofil/g doku) | Değişim (%) | |
| 0 mM (Kontrol) | 819.140 ab | | 338.904 de | | 634.020 bc | | 404.596 cde | | 549.165 |
| 100 mM | 261.388 de | -54.36* | 442.764 ce | -30.16 | 439.432 ce | -27.98 | 236.248 de | -47.45 | 344.958 |
| 150 mM | 888.496 a | | 489.240 cd | | 329.236 de | | 288.724 de | | 498.924 |
| 200 mM | 373.924 cde | | 236.692 de | | 456.584 cde | | 212.648 e | | 319.962 |
| Ortalama | 585.737 | | 376.900 | | 464.818 | | 285.554 | | |

Çizelge 5.24. Farklı tuz dozlarının dört korunga ekotipinde toplam klorofil kapsamı ve 0 mM'dan 200 mM'a artan tuz dozlarında gözlenen değişim oranı üzerine etkisi

| NaCl Dozu | Koçaş | | Malya | | Altınova | | Ulaş | | Ortalama |
|-----------------------|----------------------|-------------|----------------------|-------------|----------------------|-------------|----------------------|-------------|----------|
| | (µg klorofil/g doku) | Değişim (%) | (µg klorofil/g doku) | Değişim (%) | (µg klorofil/g doku) | Değişim (%) | (µg klorofil/g doku) | Değişim (%) | |
| 0 mM (Kontrol) | 856.600 a | | 469.264 ce | | 883.160 a | | 517.856 bcd | | 681.720 |
| 100 mM | 379.728 df | -55.55* | 610.384 bc | -40.45 | 614.712 bc | -28.02 | 329.728 ef | -43.58 | 483.638 |
| 150 mM | 898.656 a | | 678.000 b | | 460.776 ce | | 399.264 def | | 609.174 |
| 200 mM | 380.824 def | | 279.464 f | | 635.784 bc | | 292.208 ef | | 397.070 |
| Ortalama | 628.952 | | 509.278 | | 648.608 | | 384.764 | | |

*: (-) işareti değişimin azalış yönünde olduğunu ifade etmektedir.

0 mM'dan 200 mM NaCl'a yüzdesel değişim sonuçlarına bakıldığında en az düşüşün % 28.02 ile 'Malya' ekotipinde olduğu görülmektedir. Bunu sırasıyla % 40.45 ile 'Malya', % 43.58 ile 'Ulaş' ve % 55.55 ile 'Koçaş' ekotipleri takip etmiştir. Ortalamalara bakıldığında 'Altınova' ekotipinin diğer ekotiplere göre daha yüksek değerler verdiği görülmektedir.

Çizelge 5.25. ve Çizelge 5.26.'da SOD ve CAT'a ait sonuçlar verilmiştir. Ekotipler ile NaCl dozları arasındaki interaksiyon istatistikî açıdan % 1 düzeyinde önemli çıkmıştır. Tuz stresinin SOD ve CAT'ın aktivitesini artırdığı belirlenmiştir. 150 mM NaCl dozunda en yüksek değer 'Altınova' (314.90 U/dk/mg T.A) ekotipinden elde edilmiştir. İkinci sırada 307.78 U/dk/mg T.A ile 'Koçaş' ekotipi gelmiştir. Bunu sırasıyla 'Malya' (231.11 U/dk/mg T.A) ve 'Ulaş' (150.59 U/dk/mg T.A) takip etmiştir. En düşük değerler ise kontrol grubu bitkilerden elde edilmiştir. 0 mM'dan 150 mM'a artan tuz dozlarında değişim oranlarında en yüksek değeri % 608.68 ile 'Koçaş' ekotipi vermiştir. Bunu sırasıyla % 57.28 ile 'Altınova', % 29.45 ile 'Malya' ve % 14.85 ile 'Ulaş' ekotipleri izlemiştir. Genel olarak ortalamalara bakıldığında 'Altınova' ekotipi yüksek sonuçları vermiştir. CAT aktivitesinde 150 mM NaCl dozunda en yüksek sonucu 'Koçaş' (2230.36 U/dk/mg T.A) vermiştir (Çizelge 5.26.). Bunu sırasıyla 1485.93 U/dk/mg T.A ile 'Ulaş', 1343.15 U/dk/mg T.A ile 'Altınova' ve 794.42 U/dk/mg T.A ile 'Malya' ekotipi izlemiştir. Ekotiplerde en yüksek değerler 150 mM NaCl dozu uygulanmış bitkilerden, en düşük değerler ise kontrol grubu bitkilerden elde edilmiştir. 0 mM'dan 150 mM'a artan tuz dozlarında değişim oranlarına bakıldığında en yüksek değer % 201.37 ile 'Koçaş' ekotipinde hesaplanmıştır. İkinci sırada % 94.50 ile 'Ulaş' ekotipi gelirken, bunu % 17.05 ile 'Malya' ve % 15.40 ile 'Altınova' ekotipi izlemiştir. Ortalamalara bakıldığında en iyi sonucu 1316.13 U/dk/mg T.A ile 'Koçaş' ekotipinin verdiği görülmektedir.

Tuz stresi uygulanmış ekotiplerdeki APX ve GR enzimlerinin aktivitelerindeki değişimler Çizelge 5.27. ve Çizelge 5.28'de verilmiştir. Çizelge 5.27'de görüldüğü gibi, 150 mM NaCl dozunda en yüksek APX aktivitesi 28.06 ile U/dk/mg T.A ile 'Koçaş' ekotipinde belirlenmiştir. 'Malya', 'Altınova', 'Ulaş' ekotiplerinde ise sırasıyla 19.91, 16.30 ve 11.61 U/dk/mg T.A olarak bulunmuştur. Kontrol grubu bitkilerde ise en düşük APX aktiviteleri belirlenmiştir. Yüzde değişim oranlarına bakıldığında en yüksek değeri % 710.98 ile 'Koçaş' ekotipi vermiştir. Diğer ekotiplerdeki artış yüzdeleri 'Malya'da % 276.37, 'Ulaş'da % 305.94, 'Altınova'da % 176.27 olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 5.25. Farklı tuz dozlarının dört korunga ekotipinde süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi üzerine etkisi ile 0 mM'dan 150 mM'a artan tuz dozlarında incelenen parametrede gözlenen değişim oranı

| NaCl Dozu | Koçaş | | Malya | | Altınova | | Ulaş | | Ortalama |
|-----------------------|---------------|-------------|---------------|-------------|---------------|-------------|---------------|-------------|----------|
| | (U/dk/mg T.A) | Değişim (%) | (U/dk/mg T.A) | Değişim (%) | (U/dk/mg T.A) | Değişim (%) | (U/dk/mg T.A) | Değişim (%) | |
| 0 mM (Kontrol) | 43.43 f | | 178.52 de | | 200.21 cde | | 131.11 e | | 138.31 |
| 100 mM | 277.40 abc | 608.68 | 189.15 de | 29.45 | 275.41 abc | 57.28 | 192.00 de | 14.85 | 233.49 |
| 150 mM | 307.78 ab | | 231.11 bd | | 314.90 a | | 150.59 de | | 251.09 |
| Ortalama | 209.53 | | 199.59 | | 263.50 | | 157.90 | | |

Çizelge 5.26. Farklı tuz dozlarının dört korunga ekotipinde katalaz (CAT) aktivitesi üzerine etkisi ile 0 mM'dan 150 mM'a artan tuz dozlarında incelenen parametrede gözlenen değişim oranı

| NaCl Dozu | Koçaş | | Malya | | Altınova | | Ulaş | | Ortalama |
|-----------------------|---------------|-------------|---------------|-------------|---------------|-------------|---------------|-------------|----------|
| | (U/dk/mg T.A) | Değişim (%) | (U/dk/mg T.A) | Değişim (%) | (U/dk/mg T.A) | Değişim (%) | (U/dk/mg T.A) | Değişim (%) | |
| 0 mM (Kontrol) | 617.32 fg | | 678.68 ef | | 1163.90 b | | 763.96 ef | | 805.96 |
| 100 mM | 1100.73 d | 261.29 | 903.55 de | 17.05 | 400.00 g | 15.40 | 881.98 de | 94.50 | 821.56 |
| 150 mM | 2230.36 a | | 794.42 ef | | 1343.15 c | | 1485.93 bc | | 1463.47 |
| Ortalama | 1316.13 | | 792.21 | | 969.01 | | 1043.95 | | |

Çizelge 5.27. Farklı tuz dozlarının dört korunga ekotipinde askorbat peroksidaz (APX) aktivitesi üzerine etkisi ile 0 mM'dan 150 mM'a artan tuz dozlarında incelenen parametrede gözlenen değişim oranı

| NaCl Dozu | Koçaş | | Malya | | Altınova | | Ulaş | | Ortalama |
|-----------------------|---------------|-------------|---------------|-------------|---------------|-------------|---------------|-------------|----------|
| | (U/dk/mg T.A) | Değişim (%) | (U/dk/mg T.A) | Değişim (%) | (U/dk/mg T.A) | Değişim (%) | (U/dk/mg T.A) | Değişim (%) | |
| 0 mM (Kontrol) | 3.46 f | | 5.29 f | | 5.90 f | | 2.86 f | | 4.37 |
| 100 mM | 21.99 b | 710.98 | 14.57 de | 276.37 | 14.63 de | 176.27 | 10.60 e | 305.94 | 15.44 |
| 150 mM | 28.06 a | | 19.91 bc | | 16.30 cd | | 11.61 de | | 18.97 |
| Ortalama | 17.83 | | 13.25 | | 12.27 | | 8.35 | | |

Çizelge 5.28. Farklı tuz dozlarının dört korunga ekotipinde glutatyon redüktaz (GR) aktivitesi üzerine etkisi ile 0 mM'dan 150 mM'a artan tuz dozlarında incelenen parametrede gözlenen değişim oranı

| NaCl Dozu | Koçaş | | Malya | | Altınova | | Ulaş | | Ortalama |
|-----------------------|---------------|-------------|---------------|-------------|---------------|-------------|---------------|-------------|----------|
| | (U/dk/mg T.A) | Değişim (%) | (U/dk/mg T.A) | Değişim (%) | (U/dk/mg T.A) | Değişim (%) | (U/dk/mg T.A) | Değişim (%) | |
| 0 mM (Kontrol) | 10.43 f | | 45.17 cde | | 25.98 ef | | 27.77 def | | 27.33 |
| 100 mM | 56.81 c | 1221.28 | 91.78 b | 91.12 | 47.34 cd | 282.94 | 59.50 c | 108.39 | 63.85 |
| 150 mM | 137.81 a | | 86.33 b | | 99.49 b | | 57.87 c | | 95.37 |
| Ortalama | 68.35 | | 74.42 | | 57.60 | | 48.38 | | |

150 mM NaCl dozunda 137.81 U/dk/mg T.A ile 'Koçaş' GR aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir (Çizelge 5.28.). 'Altınova', 'Malya', 'Ulaş' ekotiplerinde bu değerler sırasıyla, 99.49, 86.33 ve 57.87 U/dk/mg T.A olarak belirlenmiştir. En düşük enzim aktivitesi kontrol grubu bitkilerde ölçülmüş olup, en yüksek aktivite değerleri 150 mM NaCl uygulanmış bitkilerde ölçülmüştür. GR için 0 mM'dan 150 mM'a değişim oranındaki en yüksek değer % 1221.28 ile 'Koçaş' ekotipinde belirlenmiştir. Bunu sırasıyla % 282.94, % 108.39 ve % 91.12 ile 'Altınova', 'Malya' ve 'Ulaş' ekotipleri izlemiştir. Ortalamara bakıldığında 'Koçaş' (68.35)'ın daha yüksek değer verdiğini görülmektedir. Tuz uygulaması sonrası ekotiplerde meydana gelen MDA ve prolindeki değişimler Çizelge 5.29. ve Çizelge 5.30.'da verilmiştir. MDA ve prolin miktarlarının artan tuz dozlarıyla birlikte artış gösterdiği belirlenmiştir. Ekotipler ile NaCl dozları arasındaki interaksyon istatistik açıdan % düzeyinde önemli bulunmuştur. Çizelge 5.29.'de de görüldüğü gibi, 150 mM NaCl dozlarında 'Koçaş', 'Malya', 'Altınova' ve 'Ulaş' ekotiplerinden sırasıyla 18.68, 22.35, 21.74 ve 17.71 μ mol/g T.A değerleri elde edilmiştir. 0 mM'dan 150 mM'a değişim oranındaki en yüksek değer % 196.75 ile 'Altınova' ekotipinde, en düşük değer % 4.97 ile 'Ulaş' ekotipinde hesaplanmıştır. Prolin bakımından en yüksek değeri 15.32 μ mol/g T.A ile 'Koçaş'ın 150 mM NaCl dozu vermiştir. 150 mM NaCl'deki 'Malya', 'Altınova' ve 'Ulaş' ekotiplerine ait değerler sırasıyla 10.11, 9.57, 10.37 μ mol/g T.A olarak ölçülmüştür. 0 mM'dan 150 mM'a değişim oranındaki en yüksek değer % 580.88 ile 'Koçaş' ekotipinde hesaplanmıştır. Bu artış 'Altınova'da % 276.76, 'Ulaş'da % 206.80 ve 'Malya'da % 201.79 olarak tespit edilmiştir. Genel olarak ortalamalara bakıldığında 'Koçaş' ekotipi en yüksek değeri vermiştir.

SOD, CAT, APX, GR, MDA ve prolin miktarlarının 0'dan 150 mM'a artış yüzdesi ve 150 mM'da ölçülen gerçek rakamsal değerleri topluca Çizelge 5.31. ve Çizelge 5.32.'de verilmiştir. Çizelge 5.31. incelendiğinde, SOD, CAT, APX, GR ve prolin parametrelerinde en iyi sonucu 'Koçaş' ekotipinin verdiği görülmektedir. Diğer ekotiplerde bu parametreler açısından değişkenlik tespit edilmiştir. Çizelge 5.32.'e bakıldığında, CAT, APX, GR ve prolin olmak üzere 4 parametrenin 'Koçaş' ekotipinde gerçek değer bakımından en yüksek sonuçları verdiği görülmektedir. Diğer ekotiplerde ise bu parametreler bakımından değişkenlik olduğu belirlenmiştir. Çizelge 5.31. ve Çizelge 5.32.'deki sonuçlar 'Koçaş' ekotipini bu parametreler açısından öne çıkartmıştır.

Çizelge 5.29. Farklı tuz dozlarının dört korunga ekotipinde lipid peroksidasyon (MDA) aktivitesi üzerine etkisi ile 0 mM'dan 150 mM'a artan tuz dozlarında incelenen parametrede gözlenen değişim oranı

| NaCl Dozu | Koçaş | | Malya | | Altınova | | Ulaş | | Ortalama |
|-----------------------|--------------------|-------------|--------------------|-------------|--------------------|-------------|--------------------|-------------|----------|
| | (μ mol/g T.A) | Değişim (%) | (μ mol/g T.A) | Değişim (%) | (μ mol/g T.A) | Değişim (%) | (μ mol/g T.A) | Değişim (%) | |
| 0 mM (Kontrol) | 5.58 e | | 8.66 de | | 7.34 de | | 16.87 c | | 9.61 |
| 100 mM | 11.47 d | 159.80 | 26.37 a | 158.08 | 18.90 bc | 196.185 | 24.58 a | 4.97 | 20.33 |
| 150 mM | 18.68 bc | | 22.35 ab | | 21.74 ab | | 17.71 bc | | 20.12 |
| Ortalama | 11.91 | | 19.12 | | 15.99 | | 19.72 | | |

Çizelge 5.30. Farklı tuz dozlarının dört korunga ekotipinde prolin aktivitesi üzerine etkisi ile 0 mM'dan 150 mM'a artan tuz dozlarında incelenen parametrede gözlenen değişim oranı

| NaCl Dozu | Koçaş | | Malya | | Altınova | | Ulaş | | Ortalama |
|-----------------------|--------------------|-------------|--------------------|-------------|--------------------|-------------|--------------------|-------------|----------|
| | (μ mol/g T.A) | Değişim (%) | (μ mol/g T.A) | Değişim (%) | (μ mol/g T.A) | Değişim (%) | (μ mol/g T.A) | Değişim (%) | |
| 0 mM (Kontrol) | 2.25 f | | 3.35 ef | | 2.52 ef | | 3.38 ef | | 2.87 |
| 100 mM | 8.23 bcd | 580.88 | 8.01 bcd | 201.79 | 5.39 de | 276.76 | 7.07 cd | 206.80 | 7.17 |
| 150 mM | 15.32 a | | 10.11 b | | 9.57 bc | | 10.37 b | | 11.34 |
| Ortalama | 8.60 | | 7.15 | | 5.82 | | 6.94 | | |

Çizelge 5.31. Korunga ekotiplerinde 0'dan 150 mM'a ölçülen SOD, CAT, APX, GR, MDA ve Prolin miktarlarının yüzde (%) değerler üzerinden sıralanması

| SOD | CAT | APX | GR | MDA | Prolin |
|------------------|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Koçaş (608.68) | Koçaş (261.29) | Koçaş (710.98) | Koçaş (1221.28) | Ulaş (4.97) | Koçaş (508.88) |
| Altınova (57.28) | Ulaş (94.50) | Ulaş (305.94) | Altınova (282.94) | Malya (158.08) | Altınova (276.76) |
| Malya (29.45) | Malya (17.05) | Malya (276.37) | Ulaş (108.39) | Koçaş (159.80) | Ulaş (206.80) |
| Ulaş (14.85) | Altınova (15.40) | Altınova (176.27) | Malya (91.12) | Altınova (196.18) | Malya (101.79) |

Çizelge 5.32. Korunga ekotiplerinde 150 mM'daki ölçülen SOD, CAT, APX, GR, MDA ve Prolin miktarlarının rakamsal değerleri üzerinden sıralanması

| SOD | CAT | APX | GR | MDA | Prolin |
|-------------------|--------------------|------------------|------------------|------------------|-----------------|
| Altınova (314.90) | Koçaş (2230.36) | Koçaş (28.06) | Koçaş (137.81) | Ulaş (17.71) | Koçaş (15.32) |
| Koçaş (307.78) | Ulaş (1485.93) | Malya (19.91) | Altınova (99.49) | Koçaş (18.68) | Ulaş (10.37) |
| Malya (213.11) | Altınova (1343.15) | Altınova (16.30) | Malya (86.33) | Altınova (21.74) | Malya (10.11) |
| Ulaş (150.59) | Malya (794.42) | Ulaş (11.61) | Ulaş (57.87) | Malya (22.35) | Altınova (9.57) |

5.2. *In vitro* mutagenesis, *In vitro* ve Sera Seleksiyon Çalışmaları

Tuza toleranslı korunga (*Onobrychis viciifolia* Scop.) hatlarını oluşturmak amacıyla farklı dozlarda (0-Kontrol, 400, 500 ve 600 Gray) kobalt-60 gama ışın kaynağı ile ışınlanmış olan dört farklı korunga ekotipine ('Koçaş', 'Malya', 'Altınova' ve 'Ulaş') ait toplam 5947 tohum, *in vitro* şartlarda içerisinde 150 mM NaCl içeren MS0 besi ortamına ekilmiştir. Bunlardan 1918 tanesi 10. günde çimlenmiş, çimlenmiş olanlardan 881 tanesi seçilmiştir. Seçilmiş olan bu 881 adet bitkilere kontrollü bitki büyütme odasında tekrar 2 hafta boyunca 150 mM NaCl uygulanmıştır. Hayatta kalanlar seçilmiş saksılara aktarılmıştır. Saksılara aktarıldıktan sonra hayatta kalan ve belli bir büyüklüğe erişen tuza tolerans bakımından üstün bitkilerden 49 adeti tohum almak amacıyla tarlaya şaşırtılmıştır (Şekil 5.1.). Şaşırtılan bu tuza tolerans bakımından üstün 49 adet bitki içerisinde bir tanesinin vejetatif fazdan generatif faza geçemediği saptanmıştır. Bu bitkide diğerlerinden farklı olarak çiçek salkımı oluşumu tespit edilmemiştir (Şekil 5.5.).



Şekil 5.1. Tarlaya şaşırtılmış tuza tolerans bakımından üstün bitkiler (Yer: Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü Arazisi, Fotoğraf bitkiler tarlaya şaşırtıldıktan 3 gün sonra çekilmiştir)



Şekil 5.2. Tarlaya şaşırtılmış tuza tolerans bakımından üstün bitkiler (Yer: Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü Arazisi, Fotoğraf bitkiler tarlaya şaşırtıldıktan 1.5 ay sonra çekilmiştir)



Şekil 5.3. Tarlaya şaşırtılmış tuza tolerans bakımından üstün bitkiler (Yer: Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü Arazisi, Fotoğraf bitkiler tarlaya şaşırtıldıktan 2 ay sonra çekilmiştir)



Şekil 5.4. Hasat zamanı gelmiş tarlaya şaşırtılan tuza tolerans bakımından üstün bitkilerden genel bir görünüm



Şekil 5.5. Vejetatif fazdan generatif faza geçiş yapamayan mutant bitki

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

6.1. Morfolojik Parametreler

Tuz (NaCl) stresi, korunga ekotiplerinde morfolojik parametreleri (tohum çimlenme yüzdesi, fide boyu, kök boyu, fide yaş ve kuru ağırlık) olumsuz yönde etkilemiştir. Artan tuz (NaCl) dozlarına bağlı olarak, korunga ekotiplerinde tohum çimlenme yüzdesi, fide boyu, fide yaş ve kuru ağırlık parametrelerinin değerlerinde azalma, kök boyu parametresinin değerlerinde ise artış meydana gelmiştir. Bitkilerde tuz stresine karşı tepki oluşturulmasında en önemli iki kritik devreden bir tanesi tohum çimlenmesidir. Tohum çimlenmesi artan abiyotik stresler (tuzluluk, kuraklık vb.) vasıtasıyla normal olarak sınırlanmaktadır (55). Korunga ekotiplerinin tohum çimlenme yüzdesi farklı NaCl dozlarından değişik oranlarda etkilenmiştir. Uygulamada kullanılan ve en yüksek NaCl dozu olan 200 mM'da en yüksek çimlenme yüzdesini 'Ulaş' (% 55.00) ekotipinin verdiği belirlenmiştir (Çizelge 5.5.). Diğer ekotiplerde 200 mM'daki değerlerin ise istatistiki açıdan farklı gruplar içerisinde yer aldığı bulunmuştur. Wang ve arkadaşları (2009), yonca çeşitlerinde yaptıkları çalışmada tohum çimlenme yüzdesindeki artış ile antioksidatif enzimlerin aktivasyonu arasında pozitif bir ilişki olduğunu belirtmişlerdir (55). Ancak 'Ulaş' ekotipinde antioksidatif enzimlerin aktivasyonunun diğer ekotiplere göre çok yüksek olmamasına rağmen, en yüksek tuz dozunda en iyi sonucu verdiği tespit edilmiştir. Bununla birlikte 200 mM'da tohum çimlenmesi bakımından ikinci en iyi sonucu veren 'Koçaş' (% 44.00) ekotipinde antioksidatif enzimlerin aktivasyonunun diğer ekotiplere göre en yüksek değerleri vermesi Wang ve arkadaşlarının bulduğu sonucu destekler niteliktedir. Tüm korunga ekotiplerinde 200 mM NaCl dozunun tohum çimlenmesini keskin bir şekilde azalttığı belirlenmiştir (Çizelge 5.5.). Beyaz ve arkadaşlarının (2011) (60), iki farklı korunga türünde (*Onobrychis viciifolia* Scop. ve *Onobrychis oxydonta* var. *armena*) tohum çimlenmesinin 20 dS/m NaCl'den sonra keskin bir şekilde azaldığını belirttikleri araştırmaları sonuçlarımız ile paralellik göstermektedir. Artan osmotik basınç ve iyon toksitesi nedeniyle tohum çimlenme yüzdesinin azalması beklenen bir sonuçtur (54). Dolayısıyla sonuçlarımız önceki yapılan çalışmalar ile paralellik göstermiştir (59), (37), (50).

Fide gelişimi bitkilerde tuz stresine karşı tepki oluşturmada ikinci kritik safhadır. Bu stres faktörüne karşı bitkiler gelişim hızlarını azaltarak bir cevap oluşturma mekanizması geliştirmektedir. Geliştirdikleri bu mekanizmada, metabolizmalarını yavaşlatmak suretiyle

biyokütellerindeki meydana getirdikleri azalış esastır. Bu meknizmaya bitkilerin ortamdaki stres faktörüne karşı geliştirdikleri bir adaptasyon yöntemi olarakta bakılabilir. Tuz stresi altında korunga ekotiplerinin fide boylarında azalma meydana gelmiştir (Çizelge 5.6.). Aynı zamanda ekotiplerde kök boylarında da azalma meydana gelmiştir (Çizelge 5.7.). Ancak bu azalış fide boyu parameteresine göre daha az oranda gerçekleşmiştir. Beyaz ve arkadaşları (2011) korunga türlerinde, Wang ve arkadaşları (2009) yonca çeşitlerinde, Ashraf ve arkadaşları (2013) bezelyede yaptıkları çalışmada benzer bulguları belirtmişlerdir (60), (56), (65). Ekotipler arasında en yüksek tuz uygulamasında (200 mM) fide boyu bakımından en yüksek değeri 'Ulaş' (5.06 cm) ve 'Malya' (5.06 cm) vermiş olmasına rağmen, 'Koçaş', 'Malya' ve 'Ulaş' ekotipleri arasında 200 mM'daki değerlerde istatistiki açıdan önemli bir fark bulunmamıştır (Çizelge 5.6.). Agarwal ve Pandey (2004), Amirjani (2010), tuz stresinin bitkilerde fide ve kök boylarında azalmaya sebep olduğunu ifade etmişlerdir (37), (58). Kuru ağırlık bitkilerde tuz stresine karşı tepkilerinin belirlenmesinde kullanılan önemli bir parametredir (68). Fide yaş ve kuru ağırlık parametreleri bakımından korunga ekotiplerinde farklı sonuçlar elde edilmiştir (Çizelge 5.8. ve Çizelge 5.9.). Hem yaş ağırlık hem de kuru ağırlık değerleri bakımından yüksek tuz stresinde (200 mM) en yüksek sonucu 'Koçaş' ekotipi vermiştir (0.647 g, 0.422 g). Bunun nedeni olarak 'Koçaş' ekotipindeki yüksek antioksidatif enzim aktivasyonu ile bu aktivasyonun hızlı bir şekilde gerçekleşmesi ve yüksek prolin miktarı gösterilebilir (Çizelge 5.31. ve Çizelge 5.32.). Bununla birlikte diğer ekotiplerde 200 mM'daki değerler istatistiki açıdan aynı grup içerisinde yer almışlardır (Çizelge 5.8. ve Çizelge 5.9.). Beyaz ve arkadaşları (2011), Yasar ve arkadaşları (2008), Eyidogan ve Öz (2007) yaptıkları çalışmada artan tuz (NaCl) stresi ile birlikte bitkilerde yaş ve kuru ağırlıkların azaldığını bildirmişlerdir (60), (45), (48). Araştırma bulguları önceki yapılan çalışmalar ile benzerlik göstermiştir.

6.2. Fizyolojik Parametreler

Bitkilerde tuz stresinin en belirgin şekilde görüldüğü organlardan biride yapraklardır. Yapraklarda özellikle klorofil kapsamı üzerine olumsuz etkileri söz konusudur. Klorofil kapsamı veya içeriği kültür bitkilerinde tuza toleransın belirlenmesinde kullanılan parametrelerden bir tanesidir (63). Korunga ekotiplerinde, klorofil a, klorofil b ve toplam klorofil kapsamlarının tuz stresinden etkilendiği belirlenmiştir (Çizelge 5.22., Çizelge 5.23., Çizelge 5.24.). İlginç olarak, tuz dozlarının ortalama değerlerine bakıldığında 100

mM'da kontrol grubuna göre ortalama değerin dūştüęü, ancak 150 mM'da tekrar değerin yükseldiği ve bu dozdaki değerin kontrol grubuna yakın olduğu belirlenmiştir. 200 mM'da ise ortalama değerin tekrar dūştüęü saptanmıştır. Yasar ve ark (2008) ile Yidiztugay ve ark. (2014), yaptıkları çalışmada yüksek antioksidan enzim aktivitesinin tuz stresi sırasında klorofil miktarının daha dūřük oranlarda azalmasını sağladığını belirtmişlerdir (48), (70). 150 mM'da ortalama değerin tekrar artış göstermesinin nedenlerinden birisi olarak, bu dozda oksidatif stresi ile mücadele eden antioksidatif enzimler, prolin ve diğer savunma mekanizmalarının daha yeterli ve etkin bir şekilde çalıştığı gösterilebilir. Araştırma bulgularında 200 mM NaCl dozu uygulanmış bitkilerdeki klorofil a, klorofil b ve toplam klorofil kapsamalarının, kontrol bitkilerine göre dūřüş gösterdiği saptanmıştır. Meloni ve ark. (2003) tuza hassas pamuk eřidinde, Eyidogan ve ÖZ (2007) nohutta, Yasar ve ark. (2008) yeşil fasülyede, Yildirim ve ark. (2008) bezelyede, Arulbalachandran ve ark. (2009) bezelyede, Ozturk ve ark. (2012) bezelyede, Cha-um ve ark. (2013) börölce ve fasülyede, Talukdar (2013) mürdümükte, Ashraf ve ark. (2013) fasülyede, Yildiztugay ve ark. (2014) sarı meyanda yaptıkları çalışmalarda artan tuz stresine bağlı olarak klorofil miktarının dūřtüęünü birdirmişlerdir (36), (45), (48), (49), (50), (63), (66), (68), (65), (70). Araştırmacıların yaptıkları çalışmalar araştırma sonuçlarını destekler niteliktedir.

Çevresel stresler (yüksek tuzluluk ve kuraklık dahil), reaktif oksijen türlerinin oluşması ve doku içerisinde birikmesi yolu ile oksidatif stresin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Aşırı olumsuz koşullar altında, oksidatif stres ile başa çıkabilmek için bitkiler antioksidan savunma sistemi (antioksidan enzimler: SOD, CAT, APX ve GR dahil) geliştirmişlerdir (55). Çeşitli evresel stresler altında antioksidan enzimlerin seviyesi toleranslı türlerde, duyarlı türlere göre daha yüksektir (54). SOD aerobik organizmalarda bulunan ubikitin enzimlerinden biridir. ROT'lara karşı hücresele seviyedeki savunma mekanizmasında önemli rol oynar (42). Artan SOD aktivitesi membran hasarlarına neden olan $O_2^{\bullet-}$ ve H_2O_2 radikallerinin yok edilmesini sağlamaktadır (42). SOD ROT'ların dismutasyonunda birinci olarak savunma sisteminde devreye giren antioksidatif enzimdir (67). Tüm korunga ekotiplerinde tuz stresi ile birlikte SOD aktivitesi artmıştır. Bu artış en fazla 'Koçaş' (% 608.68) ekotipinde olmuştur. 150 mM'daki gerçek değerde ise 'Altınova' (314.90 U/dk/mg T.A) ekotipinde en fazla bulunmuştur. Ancak 'Koçaş' ekotipi ile arasında istatistiki açıdan önemli bir fark olmadığı belirlenmiştir (izelge 5.25.). Tuza toleranslı bitki eşitlerinde SOD aktivitesinin duyarlı çeşitlere göre daha fazla olduğunu Hernandez ve ark. (2000) bezelyede, Meloni ve ark. (2003) pamukta, Azevedo-Neto ve ark. (2006) mısırdada, Sumithra

ve ark. (2006) bezelyede , Wang ve ark. (2009) yoncada, Bin-Wang ve ark. (2009) yoncada yaptıkları çalışmada belirtmişlerdir (34), (36), (42), (43), (56), (55). Oksidasyon sırasında oluşan ve hücre için toksik etkisi olan H_2O_2 'nin yok edilmesinde görev alan bir diğer önemli antioksidatif enzim katalazdır (CAT). Katalaz esas itibari ile SOD'un hemen arkasından yüksek bir hız ile H_2O_2 moleküllerini O_2 'ye dönüştürür (Şekil 1.3.). Katalaz aktivitesi artan tuz stresine bağlı olarak tüm korunga ekotiplerinde artmıştır. Bu artış en fazla 'Koçaş' (% 261.29) ekotipinde olmuştur (Çizelge 5.26). Ayrıca 150 mM'daki ölçülen rakamsal değer bakımından da en yüksek sonuç 'Koçaş' (2230.36 U/dk/mg T.A) ekotipinde belirlenmiştir. Katalaz enziminin tüm korunga ekotiplerinde diğer antioksidatif enzimlere göre birim değer açısından daha yüksek sonuçlar verdiği tespit edilmiştir. Bu bulgular ışığında CAT'ın tuz stresi altındaki korunga bitkisinde diğer enzimlere göre daha etkin rol oynadığı söylenebilir. Bu etkinliğin fazla olması, diğer enzimlerin aktivitelerindeki yüzdesel artışının az olması ve doku içerisinde reaktif oksijen türlerinin yok edilmesi ve/veya miktarlarının belirli bir düzeyde kalması için diğer enzimlerin açığını kapatması şeklinde düşünülebilir. Çünkü doku ve hücreler içerisindeki ROS dengesinin sağlanması büyük ölçüde bu enzimlerin aktivasyonları arasındaki dengeye bağlıdır. Benzer şekilde Jungklang ve ark. (2004) *Sesbania rostrata*'da, Azevedo -Neto ve ark. (2006) mısırd, Eyidogan ve Öz (2007) nohutta CAT'ın aktivitesinin diğer enzimlere göre yüksek olduğunu bildirmişlerdir (40), (42), (45). Ayrıca Noreen ve Ashraf (2009) tuza (NaCl) toleranslı bezelye çeşitlerinin belirlenmesinde CAT'ın diğer antioksidatif enzimlere göre daha güvenilir bir parametre olacağını bildirmiştir (52). Askorbat peroksidaz (APX) askorbat-glutasyon döngüsünde görev alan ve H_2O_2 'yi parçalayıp H_2O oluşturan antioksidatif enzimdir (Şekil 1.3.). APX H_2O_2 'ye CAT'dan daha yüksek bir afiniteye sahiptir (63). Ekotiplerde farklı oranlarda olmakla birlikte APX aktivitesi artmıştır (Çizelge 5.27.) Kontrol grubundan 150 mM'a en yüksek yüzdesel artış 'Koçaş' (% 710.98) ekotipinde belirlenmiştir. Dahası 150 mM'da gerçek miktar bakımından da 'Koçaş' ekotipinin en yüksek değeri (28.06 U/dk/mg T.A) verdiği saptanmıştır (Çizelge 5.27). APX'in tüm ekotip ve dozlarda diğer antioksidatif enzimlere göre daha düşük sonuçlar verdiği belirlenmiştir. Glutasyon-askorbat döngüsünün önemli enzimlerinden biri olan APX'in aktivitesinin tuz stresi ile birlikte arttığı Hernandez ve ark. (1999), Ahmad ve ark. (2008), Wang ve ark. (2009), Maia ve ark. (2010), Babakhani va ark. (2011) tarafından ifade edilmiştir (33), (46), (56), (57), (59). Ayrıca Hu ve ark. (2012) çimde yaptıkları çalışmada APX'in tuza toleranslı genotiplerin seçiminde kullanılabilir anahtar enzimlerden biri olduğunu bildirmişlerdir (61). Glutasyon-peroksidaz döngüsünde önemli olan bir diğer

enzim GR'de aktivite bakımından tüm ekotiplerde değişik oranlarda artış göstermiştir. Kontrol grubuna göre en yüksek yüzdesel artış ve rakamsal değer 'Koçaş' (% 1221.28, 137.81 U/dk/mg T.A) ekotipinde olmuştur (Çizelge 5.28). Bitkilerde glutatyon redüktaz enziminin aktivasyonu glutatyon miktarının artışı ile olur (46). Ahmad ve ark. (2008) tuz stresi ile birlikte GR miktarında arttığını, Yasar ve ark. (2008) tuza toleranslı yeşil fasülye genotipde 100 mM NaCl dozunda kontrol grubuna göre hafif bir değerde arttığını ifade etmişlerdir (48), (46). Meleoni ve ark (2003) tuza yüksek dayanım gösteren pamuk çeşidinde GR miktarının arttığını belirtmişlerdir (36). Elde edilen bulgular ışığında SOD ve CAT enzimlerinin tuz stresi altındaki korunga bitkisinde ROT'ların parçalanmasında daha etkin oldukları söylenebilir. Ayrıca araştırma sonuçları antioksidatif enzimlerin 'Koçaş' ekotipinde daha yüksek oranda çalıştığını göstermektedir. Dolayısıyla tuz stresi sonucunda oluşan oksidatif strese karşı 'Koçaş' ekotipinin diğer ekotiplere göre daha iyi cevap verdiği söylenebilir. Oksidatif yıkımdan korunmak için toleranslı tür veya çeşitlerin yüksek seviyede antioksidatif enzim aktivasyonu, prolin miktarı ve düşük seviyede lipid peroksidasyona sahiptir (43). Yüksek antioksidatif enzim seviyesi 'Koçaş' ekotipini tuza tolerans bakımından öne çıkarmaktadır. Tuz stresinde biyokimyasal ve moleküler seviyede gen ekspresyonu ve enzim aktivitesi arasında pozitif bir korelasyon vardır (61). Dolayısıyla elde edilen sonuçlar ile antioksidatif enzimlerin gen ekspresyon seviyelerinin 'Koçaş' ekotipinde daha yüksek oranda olduğu söylenebilir.

Malondialdehit (MDA), lipid peroksidasyonunun bir ürünüdür. Tuz stresi altında oksidatif stres sonucu oluşan serbest radikaller (özellikle, hidroksil (OH[•]) ve tek oksijen (¹O₂) hücre membranındaki yağ asitleri ile tepkimeye girdiklerinde MDA oluşur. MDA ölçülerek oksidatif zarar belirlenebilir. Elde edilen sonuçlar tuz stresi ile birlikte MDA'daki en yüksek yüzdesel artışın 'Altınova' (%196.185) ekotipinde olduğunu göstermiştir (Çizelge 5.29.). Ancak ekotiplerde 150 mM'daki gerçek rakamsal değerler istatistiki açıdan aynı grup içerisinde yer almıştır. Ekotipler bazında ortalama değerlere bakıldığında 'Koçaş' ekotipinde hesaplanan ortalama değer (11.91 µ mol/g T.A) diğer ekotiplere göre daha düşüktür. Antioksidatif enzim aktivitesi ile MDA miktarı arasında negatif bir ilişki söz konusudur. Dolayısıyla diğer ekotiplere göre 'Koçaş' ekotipinde elde edilen bu düşük ortalama değer, antioksidatif enzimlerin 'Koçaş' ekotipinde yeterli miktar ve oranda çalışması ile izah edilebilir. Ashraf ve ark. (2013) fasülyede yaptıkları tuzluluk çalışmasında düşük MDA miktarının nedeni olarak CAT ve POD antioksidatif enzimlerin miktarlarındaki artışı göstermişlerdir. Meloni ve ark. (2003) düşük tuza dayanıklı pamuk

çeşidindeki düşük MDA miktarını yüksek antioksidatif enzim miktarı ile açıklamışlardır (36). Eyidogan ve Öz (2007) CAT aktivitesinin düşmesi ile yaprak dokularındaki MDA ve H₂O₂ miktarının arttığını belirtmişlerdir (45). Azevedo- Neto ve ark. (2006) mısır genotipinde artan antioksidatif aktivite ile birlikte kök hücrelerinde MDA'nın azaldığını saptamışlardır (42). Bu araştırmaların bulgularının yanı sıra Babakhani ve ark. (2011) yoncada artan tuz miktarı ile birlikte MDA'nın artmasını yeterli miktarda antioksidatif enzimin çalışmaması nedeniyle olabileceğini ifade etmişlerdir (59). Genel olarak tüm ekotiplerde artan NaCl dozu ile birlikte MDA miktarının artması ekotiplerde yine de yeterli derecede enzim aktivasyonu olmaması sebebinden kaynaklanıyor olabilir. Yüksek MDA miktarı tuz stresi nedeniyle oluşmaktadır (36). Tuza toleranslı çeşitlerde MDA miktarı düşüktür. Bezelyede yapılan iki ayrı çalışmada ve pamukta tuza toleranslı çeşitlerde MDA miktarı dayanıksızlara göre az bulunmuştur (49), (64), (36). Bununla birlikte Noreen ve Ashraf (2009) ise bezelye genotipleri arasında MDA'nın miktarının çok çeşitli olduğunu ve bezeleye çeşitlerinde tuza toleransın belirlenmesinde kullanılamayacağını belirtmişlerdir (52). Ayrıca Hu ve ark. (2012) çim genotiplerinde yaptıkları çalışmada tuza dayanıklı genotipte daha az MDA' ölçtüklerini ifade etmişlerdir (61). Artan tuz stresi ile birlikte tüm ekotiplerde MDA miktarı artmıştır. Elde edilen bulgular önceki çalışmalar ile benzerlik göstermektedir (46), (56), (55), (54), (43), (48), (38), (49).

Prolin, baklagil türlerinde tuza toleransın belirlenmesinde iyi bir belirteçdir (66). Oksidatif stres sonucu oluşan reaktif oksijen türlerinin hücresel seviyede yok edilmesinde önemli bir görevi vardır. Stres faktörü arttıkça bitkilerin hücrelerinde biriken prolin miktarı da artmaktadır. Stres faktörünün dozu ile hücresel seviyedeki prolin miktarının artışı arasında pozitif bir ilişki söz konusudur. Kontrol grubu ile en yüksek NaCl dozu olan 150 mM'daki artış miktarı yüzdesel olarak kıyaslandığında en fazla artışın 'Koçaş' (% 580.88) ekotipinde olduğu görülmektedir. Diğer ekotiplerin 150 mM'daki değerleri ise istatistiki açıdan aynı grup içerisinde yer almıştır (Çizelge 5.30). Prolin aynı zamanda oksidatif strese karşı hem antioksidatif enzimleri, hem de hücre membranını koruyan bir ajandır (37). 'Koçaş' ekotipinde antioksidatif enzimlerin yüksek miktarda ve yüzde de olması , üretmiş olduğu yüksek miktardaki prolin ile ilişkili olabilir. Benzer bir sonuç baklagil familyasının bir üyesi olan sinameki (*Cassia angustifolia*) türünde de görülmüştür (37). Prolin metabolizması, stres koşullarına maruz kalmış yaşayan organizmalarda tipik bir biyokimyasal adaptasyondur (92). Dolayısıyla sonuçlarımız bu biyokimyasal adaptasyonu en iyi şekilde yapabilen ekotipin 'Koçaş' olduğunu göstermektedir. Prolin ile ilgili

sonuçlara baktığımızda tuz stresi ile birlikte prolin miktarında arttığı görülmektedir (Çizelge 5.30.). Araştırmamızın sonuçları daha önce yapılan çalışmalar ile benzerlik göstermektedir (37), (43), (45), (46), (63), (56),(68), (50).

6.3. *In vitro* Mutagenesis, *In vitro* ve Sera Seleksiyon Çalışmaları

Araştırmanın bir parçası olarak *in vitro* mutagenesis (gama ışınlarıyla oluşturulmuş) ve seleksiyon ile tuz stresine karşı toleranslı korunga hatlarının geliştirilmesi çalışmaları yürütülmüştür. 49 adet tuza tolerans bakımından üstün bitki *in vitro* mutagenesis , seleksiyonu ile sera şartlarında seleksiyonun birlikte kullanılması ile başarılı bir şekilde tarlaya aktarılmıştır. Bitkilerde gama ışınları ile uyarılmış mutasyon ve *in vitro* seleksiyonun birlikte kullanılması ile, mürdümük (*Lathyrus sativus* L.), kelebek bezelyesi (*Clitoria ternatea* L.) ve şeker kamışı (*Saccharum officinarum* L.) gibi bitkilerde tuza tolerans bakımından üstün mutant bitkilerin seçimi başarı ile gerçekleştirilmiştir (77), (81). Ayrıca, korungada uzay indüklü mutagenesis tekniği ve doku kültürünün birlikte kullanımı ile *in vitro* şartlarda tuza toleranslı kallus hatları başarıyla seçilmiştir (71). Dahası bu teknikten faydalanarak Kumar ve ark. (2010) kaba limon (*Citrus jambhiri* Lush.)'da tuza toleranslı mutantları geliştirmişlerdir (24). Bu iki teknik birlikte kullanılarak buğday, patates (*Solanum tuberosum* L.), kanola (*Brassica Nopus* L.), çeltik (*Oryza Sativa* L. cv. Basmati370), malina çimi (*Zoysia matrella* L. Merr.) gibi farklı türlerde tuz (NaCl) stresine karşı toleranslı mutant varyeteler başarılı bir şekilde geliştirilmiştir (74), (82), (76), (79), (72).

Araştırmada, tarlaya aktarılan ve tuza tolerans bakımından üstün 49 adet korunga bitkisi içerisinde bir tanesinin vejetatif fazdan genaratif faza geçmediği belirlenmiştir (Şekil 5.5.). Hassan ve El-Halem (2014) kanola (*Brassica Nopus* L.) bitkisinde gama ışınlarını kullanarak bazı tarımsal özellikleri geliştirmeye çalıştıkları araştırmalarında yüksek verimlilik ve erken çiçeklenme dönemine giren iki adet mutant birey elde ettiklerini bunun nedeni olarak gama ışınlarının yaratmış olduğu genetik çeşitliliği göstermişlerdir (84). Dolayısıyla araştırmada kullanılan gama ışınları sayesinde tuza toleran bakımından üstün bireylerin oluşturduğu popülasyon içerisinde farklı özellik taşıyan mutant bitkilerinde elde edilmesi söz konusu olabilir.

Bitkilerin tuz stresine karşı hassas oldukları iki kritik dönem vardır. Bunlardan bir tanesi tohum çimlenme dönemi diğeri ise fide gelişim dönemidir. Bu önemli iki dönemi göz önüne alarak tuza toleranslı mutant korunga bitkilerinin seçilimi için iki aşamalı sistematik bir prosedür geliştirilmiştir. Bu iki kritik dönem göz önüne alınarak çeltik (*Oryza Sativa* L. cv. Dongan) türünde de mutant bireylerin seleksiyonu için bir prosedür geliştirilmiştir (83).

6.4. Sonuç

Bu tez kapsamında Türkiye’de önemli bir yem bitkisi olan korunganın (*Onobrychis viciifoli* Scop.) farklı ekotiplerinin ('Koçaş', 'Malya', 'Altınova' ve 'Ulaş') tuz (NaCl) stresi karşısında tepkileri morfolojik ve fizyolojik parametreler bakımından ilk defa incelenmiştir. Morfolojik parametrelerden fide yaş ve kuru ağırlığı, fizyolojik parametrelerden (Çizelge 5.32.) ise antioksidatif enzimler ve prolin olmak üzere tümü tuza tolerans bakımından farklı korunga ekotipleri içerisinde 'Koçaş' ekotipini öne çıkarmıştır. Dolayısıyla 'Koçaş' ekotipinin tuza toleransının diğer ekotiplere göre daha fazla olduğu görülmektedir. Bu sonuçlar ışığında 'Koçaş' ekotipinin tuzluluk sorunu görülen bölgelerde diğer ekotiplere göre daha iyi performans göstereceği ve adaptasyonunun daha iyi olabileceği söylenebilir. Çalışmada kullanılan 14 parametreden fide yaş ve kuru ağırlıklarının, antioksidatif enzimlerden özellikle CAT’ın ve bir osmolit olan prolinin korunga bitkisinde tuza toleransın belirlenmesinde güvenilir parametreler olduğu söylenebilir. Ayrıca, özellikle SOD ve CAT’ın moleküler seviyedeki gen ifade düzeylerine bakılmak suretiyle yapılacak olan daha fazla çalışmalarla birlikte korunganın kompleks tuz stresine karşı tepkisinin daha iyi anlaşılmasına olanak sağlanacaktır. Kuraklık stresi ile tuz stresi çok yakından ilişkilidir. Dolayısıyla 'Koçaş' ekotipinin ilerki çalışmalarda kuraklık stresi bakımından da değerlendirilmesi gerektiği düşünülmektedir. Çalışmamızda morfolojik ve fizyolojik parametreler genel olarak ele alındığında; korunga (*Onobrychis viciifolia* Scop.) bitkisinin orta derecede (150mM) tuza (NaCl) toleranslı bir baklagil yem bitkisi olduğu söylenebilir.

Bu tez kapsamında olan bir diğer çalışma ise, *in vitro* mutagenesis tekniği kullanarak tuza toleranslı yeni korunga hatlarının geliştirilmesidir. Bu çalışma sonucunda tuza tolerans bakımından üstün toplam 49 adet bitki 5947 bitki arasından seçilerek tarlaya aktarılmıştır. M₂ bitki tohumlarının tekrar aynı yöntem kullanılarak seçilmesi gerektiği, bu sayede genetik açıdan tuza tolerans için daha saf ve stabil hatların M₃ ve M₄ jenerasyonlarından

elde edilebileceği düşünölmektedir. M₃ ve M₄ jenerasyonlarının tuz stresine karşı verecekleri yanıtların morfoloji, fizyolojik ve biyokimyasal parametereler ile değeriendirilmesi bu hatların gerçektende stabil bir tolerans mekanizmasına sahip olduklarını göstermek açısından önemli olacaktır. Korungada yapılan bu çalışma tekniğinin tuz stresine karşı toleranslı hatların geliştirilmesinde *in vitro* mutagenesis tekniğinin kullanıldığı ilk çalışmadır. Çalışma sonucunda ilerde daha kapsamlı çalışmalara hem materyal, hem de temel sağlanmıştır. Ayrıca, bu materyallerden tuz stresi ile ilgili olan genlerin tespiti, izolasyonu ve daha sonrasında da bu genlerin gen aktarım teknikleri kullanılarak diğer bitkilere aktarılması önem taşıyacaktır.

KAYNAKLAR

1. Açıkgöz E. Yem Bitkileri. Bursa: Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü; 2001. p. 83-94.
2. Aktoklu E. Türkiye’de Yetişen Onobrychis Miller (Fabaceae) türlerinin revizyonu. Malatya: İnönü Üniversitesi; 1995.
3. A collection of historic and modern biology books. [cited 2014 28.10.2014]; Available from: <http://www.biolib.de/>
4. Elçi Ş. Baklagil ve Bugdaygil Yem Bitkileri. Ankara: T.C. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı; 2005. p. 223-57.
5. Serin Y, Tan M. Baklagil Yem Bitkileri. Erzurum: Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ofset Tesisi; 2001. p. 49-66.
6. TÜİK Bitkisel Üretim İstatistikleri [cited 2014 28.10.2014]; Available from: <http://tuikapp.tuik.gov.tr/bitkiselapp/bitkisel.zul>
7. Akgül H. Tuzluluk. Ziraat Mühendisliği Dergisi. 2003
8. Sönmez B. Türkiye çoraklık kontrol rehberi. Ankara: Toprak Gübre ve Su Kaynakları Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Yayınları; 2008.
9. Rai MK, Kalia RK, Singh R, Gangola MP, Dhawan AK. Developing stress tolerant plants through in vitro selection—An overview of the recent progress. Environmental and Experimental Botany. 2011;**71**(1):89-98.
10. Gill SS, Tuteja N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. Plant physiology and biochemistry : PPB / Societe francaise de physiologie vegetale. 2010 Dec;**48**(12):909-930.
11. Yamaguchi T, Blumwald E. Developing salt-tolerant crop plants: challenges and opportunities. Trends in plant science. 2005 Dec;**10**(12):615-620.
12. Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends in plant science. 2002 Sep;**7**(9):405-410.
13. Ashraf M, Foolad MR. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. Environmental and Experimental Botany. 2007;**59**(2):206-216.
14. Parvaiz A, Satyawati S. Salt stress and phyto-biochemical responses of plants-a review. Plant Soil and Environ. 2008;**54**(3):89-99.
15. Miller G, Suzuki N, Ciftci-Yilmaz S, Mittler R. Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. Plant, cell & environment. 2010 Apr;**33**(4):453-467.

16. Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in plant science*. 2004 Oct;**9**(10):490-498.
17. Kharkwal MC. *Plant Mutation and Biotechnology. A Brief History of Plant Mutagenesis*: CAB International and FAO; 2012. p. 21-30.
18. Brunner H. Radiation Induced Mutations for Plant. *Appl Radiat Isot* 1995;**46**(6):589-594.
19. Xu L, Najeeb U, Naeem MS, et al. *In Vitro Mutagenesis and Genetic Improvement. Technological Innovations in Major World*. London: Springer; 2012. p. 151-173.
20. Ahloowalia BS, Maluszynski M. Induced mutations – A new paradigm in plant breeding. *Euphytica*. 2001 Aug **118**:167-173.
21. Maluszynski M, Nichterlein K, Zanten V, Ahloowalia BS. Officially released mutant varieties Vienna: The FAO-IAEA Data Base; 2000.
22. Ahuja S, Kumar M, Kumar P, et al. Metabolic and biochemical changes caused by gamma irradiation in plants. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*. 2014;**300**(1):199-212.
23. Novak FJ, Brunner H. Induced mutation technology for crop improvement. *IAEA Bull*. 1992;**4**:25-32.
24. Kumar K, Gill MIS, Kaur H, Choudhary OP, Gosal SS. *In Vitro Mutagenesis and Somaclonal Variation Assisted Salt Tolerance in 'Rough Lemon' (Citrus jambhiri Lush.)*. *EuropJHortSci* 2010;**75**(6):233-238.
25. Gamma Rays. 2014 [cited 2014 01.03.2014]; Available from: <http://www.britannica.com/EBchecked/topic/225048/gamma-ray>
26. Purohit M, Srivastava S, Srivastava PS. Stress tolerant plants through tissue culture. In: Srivastava PS, editor. *Plant Tissue Culture and Molecular Biology*. New Delhi: Application and Prospects Narosa Publishing House; 1998. p. 554-578.
27. Jain M. Tissue culture-derived variation in crop improvement. *Euphytica*. 2001;**18**:153-166.
28. Dita MA, Rispaill N, Prats E, Rubiales D, Singh KB. Biotechnology approaches to overcome biotic and abiotic stress constraints in legumes. *Euphytica*. 2006;**147**(1-2):1-24.
29. Ashraf M. Some important physiological selection criteria for salt tolerance in plants. *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*. 2004;**199**(5):361-376.
30. Ashraf M, Harris PJC. Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. *Plant Science*. 2004;**166**(1):3-16.
31. Bruning B, Rozema J. Symbiotic nitrogen fixation in legumes: Perspectives for saline agriculture. *Environmental and Experimental Botany*. 2013;**92**:134-143.

32. Das A, Parida SK. Advances in biotechnological applications in three important food legumes. *Plant Biotechnology Reports*. 2013;**8**(2):83-99.
33. Hernandez JA, Campillo A, Jimenez A, Alarcon JJ, Sevilla F. Response of antioxidant systems and leaf water relations to NaCl stress in pea plants. *The New phytologist*. 1999 oct;**141**:241-251.
34. Hernandez JA, Jimenez A, Mullineaux P, Sevilla F. Tolerance of pea (*Pisum sativum* L.) to long-term salt stress is associated with induction of antioxidant defences. *Plant, Cell and Environment*. 2000 May;**23**:853- 862.
35. Hernandez JA, Almansa MS. Short-term effects of salt stress on antioxidant systems and leaf water relations of pea leaves. *Physiologia Plantarum*. 2002 Jan;**115**:251-257.
36. Meloni DA, Oliva MA, Martinez CA, Cambraia J. Photosynthesis and activity of superoxide dismutase, peroxidase and glutathione reductase in cotton under salt stress. *Environmental and Experimental Botany*. 2003 July;**49**:69-76.
37. Agarwal S, Pandey V. Antioxidant enzyme responses to NaCl stress in *Cassia angustifolia*. *Biologia Plantarum*. 2004 Jan;**48**(4):555-560.
38. Bandoğlu E, Eyidoğan F, Yücel M, Öktem HA. Antioxidant responses of shoots and roots of lentil to NaCl-salinity stress. *Plant Growth Regulation*. 2004 Aug;**42**:69-77.
39. Gomez JM, Jimenez A, Olmos ES, Sevilla F. Location and effects of long-term NaCl stress on superoxide dismutase and ascorbate peroxidase isoenzymes of pea (*Pisum sativum* cv. Puget) chloroplasts. *Journal of Experimental Botany*. 2004 Jan;**55**(394):119-130.
40. Jungkang J, Sunohara Y, Matsumoto H. Antioxidative enzymes response to NaCl stress in salt-tolerant *Sesbania rostrata*. *Weed Biology and Management*. 2004 Jan;**4**:81-85.
41. Jebara S, Jebara M, Limam F, Aouani ME. Changes in ascorbate peroxidase, catalase, guaiacol peroxidase and superoxide dismutase activities in common bean (*Phaseolus vulgaris*) nodules under salt stress. *Journal of plant physiology*. 2005 Aug;**162**(8):929-936.
42. De Azevedo Neto AD, Prisco JT, Enéas-Filho J, Abreu CEBd, Gomes-Filho E. 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*. 2006;**56**(1):87-94.
43. Sumithra K, Jutur PP, Carmel BD, Reddy AR. Salinity-induced changes in two cultivars of *Vigna radiata*: responses of antioxidative and proline metabolism. *Plant Growth Regulation*. 2006;**50**(1):11-22.
44. Cavalcanti FR, Lima JP, Ferreira-Silva SL, Viegas RA, Silveira JA. Roots and leaves display contrasting oxidative response during salt stress and recovery in cowpea. *Journal of plant physiology*. 2007 May;**164**(5):591-600.

45. Eyidogan F, Öz MT. Effect of salinity on antioxidant responses of chickpea seedlings. *Acta Physiologiae Plantarum*. 2007;**29**(5):485-493.
46. Ahmad P, John R, Sarwat M, Umar S. Responses of proline, lipid peroxidation and antioxidative enzymes in two varieties of *Pisum sativum* L. under salt stress. *International Journal of Plant Production*. 2008 Oct;**2**(4):353-366.
47. Parlak AÖ, Parlak M. Effect of Salinity in Irrigation Water on Some Plant Development Parameters of Sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) and Soil Salinity. *Tarım Bilimleri Dergisi*. 2008;**14**(4):320-325.
48. Yasar F, Ellialtioglu S, Yildiz K. Effect of salt stress on antioxidant defense systems, lipid peroxidation, and chlorophyll content in green bean. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2008;**55**(6):782-786.
49. Yildirim B, Yasar F, Özpay T, Türközü D. Variations in response to salt stress among field pea genotypes Genotypes (*Pisum sativum* sp. *arvense* L.). *Journal of Animal and Veterinary Advances*. 2008;**7**(8):907-910.
50. Arulbalachandran D, Sankar Ganesh K, Subramani A. Changes in Metabolites and Antioxidant Enzyme Activity of Three *Vigna* Species Induced by NaCl Stress. *American-Eurasian Journal of Agronomy*. 2009;**2**(2):109-116.
51. Azooz MM. Salt stress mitigation by seed priming with salicylic acid in two faba bean genotypes differing in salt tolerance. *International Journal of Agriculture & Biology*. 2009;**11**(4):343-350.
52. Noreen Z, Ashraf M. Assessment of variation in antioxidative defense system in salt-treated pea (*Pisum sativum*) cultivars and its putative use as salinity tolerance markers. *Journal of plant physiology*. 2009 Nov 1;**166**(16):1764-1774.
53. Rubio MC, Bustos-Sanmamed P, Clemente MR, Becana M. Effects of salt stress on the expression of antioxidant genes and proteins in the model legume *Lotus japonicus*. *The New phytologist*. 2009 Mar;**181**(4):851-859.
54. Wang X, Zhao G, Gu H. Physiological and antioxidant responses of three leguminous species to saline environment during seed germination stage. *African Journal of Biotechnology*. 2009;**8**(21):5773-5779.
55. Wang WB, Kim YH, Lee HS, Kim KY, Deng XP, Kwak SS. Analysis of antioxidant enzyme activity during germination of alfalfa under salt and drought stresses. *Plant physiology and biochemistry : PPB / Societe francaise de physiologie vegetale*. 2009 Jul;**47**(7):570-507.
56. WANG XS, HAN JG. Changes of Proline Content, Activity, and Active Isoforms of Antioxidative Enzymes in Two Alfalfa Cultivars Under Salt Stress. *Agricultural Sciences in China*. 2009 Apr;**8**(4):431-440.

57. Maia JM, Costa de Macedo CE, Voigt E, Freitas JBS, Silveira JAG. Antioxidative enzymatic protection in leaves of two contrasting cowpea cultivars under salinity. *Biologia Plantarum*. 2010;**54**(1):159-163.
58. Amirjani M. Effect of Salinity Stress on Growth, Mineral Composition, Proline Content, Antioxidant Enzymes of Soybean. *American Journal of Plant Physiology*. 2010;**5**(6):350-360.
59. Babakhani B, Khavari-Nejad R, Hassan sajedi R, Fahimi H, Saadatmand S. Biochemical responses of Alfalfa (*Medicago sativa* L.) cultivars subjected to NaCl salinity stress. *African Journal of Biotechnology*. 2011 Sep;**10**(55):11433-11441.
60. Beyaz R, Kaya G, Cocu S, Sancak C. Response of seeds and pollen of *Onobrychis viciifolia* and *Onobrychis oxyodonta* var. *armena* to NaCl stress. *Scientia Agricola*. 2011 July;**68**(4):477-481.
61. Hu L, Li H, Pang H, Fu J. Responses of antioxidant gene, protein and enzymes to salinity stress in two genotypes of perennial ryegrass (*Lolium perenne*) differing in salt tolerance. *Journal of plant physiology*. 2012 Jan 15;**169**(2):146-156.
62. Köse F. Tuz Stresi Altında Türk Mercimek Çeşitlerinin Fizyolojik Ve Biyokimyasal Taramasi. Ankara: Middle East Technical University; 2012.
63. Ozturk L, Demir Y, Unlukara A, Karatas I, Kurunc A, Duzdemir O. Effects of long-term salt stress on antioxidant system, chlorophyll and proline contents in pea leaves. *Romanian Biotechnological Letters*. 2012;**17**(3):7227-7236.
64. Shahid MA, Balal RM, Pervez MA, et al. Differential response of pea (*Pisum sativum* L.) genotypes to salt stress in relation to the growth, physiological attributes antioxidant activity and organic solutes. *Australian Journal of crop Science*. 2012;**6**(5):828-838.
65. Ashraf MA, Rasool M, Ali Q, Haider MZ, Noman A, Azeem M. Salt-induced perturbation in growth, physiological attributes, activities of antioxidant enzymes and organic solutes in mungbean (*Vigna radiata*L.) cultivars differing in salinity tolerance. *Archives of Agronomy and Soil Science*. 2013;**59**(12):1695-712.
66. Cha-um S, Batin CB, Samphumphung T, Kidmanee C. Physio-morphological changes of cowpea (*Vigna unguiculata* Walp.) and jack bean (*Canavalia ensiformis* (L.) DC.) in responses to soil salinity. *Australian Journal of Crop Science*. 2013;**7**(13):2128-2135.
67. Siddiqui Z. Effects of double stress on antioxidant enzyme activity in *Vigna radiata* (L.)Wilczek. *Acta Bot Croat*. 2013;**72**(1):145-156.
68. Talukdar D. Growth Responses and Leaf Antioxidant Metabolism of Grass Pea (*Lathyrus sativus* L.) Genotypes under Salinity Stress. *ISRN Agronomy*. 2013;**2013**:1-15.
69. Oufdou K, Benidire L, Lyubenova L, Daoui K, El Abidine Fatemi Z, Schröder P. Enzymes of the glutathione–ascorbate cycle in leaves and roots of rhizobia-inoculated faba bean plants (*Vicia faba* L.) under salinity stress. *European Journal of Soil Biology*. 2014;**60**:98-103.

70. Yildiztugay E, Ozfidan-Konakci C, Kucukoduk M. Modulation of osmotic adjustment and antioxidant status in salt-stressed leaves of *Thermopsis turcica*. *Acta Physiologiae Plantarum*. 2013;**36**(1):125-138.
71. Xu YY, Wang MG, Jia JF. Selection and identification of salt tolerant line of sainfoin from the seeds of first post-flight plants. *Acta Biologiae Experimentalis Sinica*. 2001 Mar;**34**(1):11-15.
72. Saleem MY, Mukhtar Z, Cheema AA, Atta BM. Induced mutation and in vitro techniques as a method to induce salt tolerance in Basmati rice (*Oryza sativa* L.). *Int Environ Sci Tech*. 2005;**2**(2):141-145.
73. Hossain Z, Mandal AK, Datta SK, Biswas AK. Development of NaCl-tolerant strain in *Chrysanthemum morifolium* Ramat. through in vitro mutagenesis. *Plant biology*. 2006 Jul;**8**(4):450-461.
74. El-Sayed OE, Rizkalla AA, Sabri SRS. In vitro Mutagenesis for Genetic Improvement of Salinity Tolerance in Wheat. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*. 2007;**4**(5):377-383.
75. Patade VY, Suprasanna P, Bapat VA. Gamma Irradiation of Embryogenic Callus Cultures and In vitro Selection for Salt Tolerance in Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). *Agricultural Sciences in China*. 2008;**7**(9):1147-1152.
76. Mosleh E, Mohammadi A, Omidi M, Rastegari SJ. *In Vitro* Mutagenesis for Salt Tolerant Rapeseed (*Brassica napus* L.) Using Gamma Irradiation. *Acta Hort Proc VIth IS on In Vitro Cult and Hort Breed*. 2009;**829**:337-340.
77. Patade VY, Suprasanna P. An in vitro radiation induced mutagenesis-selection system for salinity tolerance in sugarcane. *Sug Tech*. 2009;**11**(3):246-251.
78. Bağcı M, Mutlu H. Korunga (*Onobrychis sativa* Lam.) Mutasyon Islahında Kullanılabilir Uygun Gama (60Co) Dozunun Belirlenmesi. *Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi*. 2011 Ağustos;**4**(2):141-144.
79. Chen S, Chai M, Jia Y, Gao Z, Zhang L, Gu M. In vitro selection of salt tolerant variants following 60Co gamma irradiation of long-term callus cultures of *Zoysia matrella* [L.] Merr. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. 2011;**107**(3):493-500.
80. Helaly MNM, HananEl-Hosieny AMR. Effectiveness of Gamma Irradiated Protoplasts on Improving Salt Tolerance of Lemon (*Citrus Limon* L. Burm.f.). *American Journal of Plant Physiology*. 2011;**6**(4):190-208.
81. Talukdar D. Isolation and characterization of NaCl-tolerant mutations in two important legumes, *Clitoria ternatea* L. and *Lathyrus sativus* L.: Induced mutagenesis and selection by salt stress. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2011 Aug;**5**(16):3619-3628.

82. Yaycili O, Alikamanoğlu S. Induction of salt-tolerant potato (*Solanum tuberosum* L.) mutants with gamma irradiation and characterization of genetic variations via RAPD-PCR analysis. *Turk Journal of Biology*. 2012;**36**:405-412.
83. Song JY, Kim DS, Lee MC, et al. Physiological characterization of gamma-ray induced salt tolerant rice mutants. *Australian Journal of Agriculture*. 2012;**6**(3):421-429.
84. Hassan MS, Abd-El- Haleem SHM. Effective of gamma rays to induced genetic variability to improve some agronomic traits of canola (*Brassica napus* L.). *Asian Journal of Crop Science*. 2014:1-10.
85. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 62;**15**:473-497.
86. Curtis O, Shetty K. Growth medium effects on vitrification, total phenolics, chlorophyll, and water content of *in vitro* propagated oregano clones. *Acta Horticulturae*. 1996;**426**:498-503.
87. Lutts S, Kinet JM, Bouharmont J. NaCl-Induced Senescence in Leaves of Rice (*Oryza sativa* L.) Cultivars Differing in Salinity Resistance. *Annals of Botany*. 1996;**78**:389-398.
88. Çakmak I, Marschner H. Magnesium Deficiency and High Light Intensity Enhance Activities of Superoxide Dismutase, Ascorbate Peroxidase and Glutathione Reductase in Bean Leaves. *Plant Physiology*. 1992;**98**:1222-1226.
89. Çakmak I, Atlı M, Kaya R, Evliya H, Marschner H. Association of High Light and Zinc Deficiency in Cold-Induced Leaf Chlorosis in Grapefruit and Mandarin Trees. *Journal of plant physiology*. 1994;**146**:355-360.
90. Bates LS, Waldren RP, Teare ID. Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant Soil*. 1973;**39**:205-207.
91. Snedecor GW, Cochran WG. *Statistical Methods*. 1967.
92. Delauney A, Verma DPSM. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *Plant J*. 1993;**4**:215-223.
93. Rozema J, Muscolo A, Flowers T. Sustainable cultivation and exploitation of halophyte crops in a salinising world. *Environmental and Experimental Botany*. 2013;**92**:1-3.

L.) hypocotyl segments. 15th European Congress on Biotechnology. 23-26 Semtember 2012, Istanbul.

Alizadeh, B., Kahramanogullari Telci, C., Beyaz, R. and Yildiz, M. The effect of CO-cuitivation between wheat (*Triticum* sp.) and flax (*Linum usitatissimum* L.) on shoot regeneration capacity of explants. 15th European Congress on Biotechnology, 23-26 Semtember 2012, Istanbul.

Kahramanogullari Telci, C.. Beyaz. R.. Alizadeh, B. and Yildiz, M. The effect of magnetic field on *in vitro* seed germination, seedling growth and shoot regeneration from cotyledon node explants of *Lathyrus chrysanthus* Boiss. 15th European Congress on Biotechnology, 23-26 Semtember 2012, Istanbul.

Ulusal Kongrelerde Sunulan Bildiriler:

Alizadeh, B., Beyaz. R., Kahramanoğulları Telci, C. and Yıldız, M. . Bitkilere *Agrobacterium tumefaciens* aracılığıyla gen aktarımında yüksek transgenik sürgün frekansı için yeni bir yöntem. 2. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi, 15-18 Kasım 2012, Antalya.

Response of seeds and pollen of *Onobrychis viciifolia* and *Onobrychis oxyodonta* var. *armena* to NaCl stress

Ramazan Beyaz¹, Gamze Kaya^{2*}, Sati Cocu³, Cengiz Sancak⁴

¹Ankara University/Institute of Biotechnology – Dept. of Basic Biotechnology, Ankara – Turkey.

²Central Research Institute for Field Crops – Dept. of Genetic Resources, PK 226, Ulus, Ankara – Turkey.

³Erciyes University/Faculty of Agriculture – Dept. of Field Crops, Kayseri – Turkey.

⁴Ankara University/Faculty of Agriculture – Dept. of Field Crops, Ankara – Turkey.

*Corresponding author <pascalcik@hotmail.com >

Edited by: Edmilson José Ambrosano

ABSTRACT: Sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) is an important forage legume crop with 52 species adapted to dry and poor soils in Turkey, but little is known about the effects of salinity on germination and seedling growth in arid and semiarid regions suffering from salinity problem. The seeds and pollen of two species of sainfoin *O. viciifolia* and *O. oxyodonta* var. *armena* (Syn: *O. armena*) were exposed to 0, 5, 10, 20 and 30 dS m⁻¹ of NaCl under *in vivo* and *in vitro* conditions and evaluated for germination under salt stress by comparing germination percentage, mean germination time, root and shoot length, fresh and dry seedling weight and dry matter. Increased salinity levels generally resulted in decrease in all traits except time to germination, dry seedling weight and dry matter, which increased at high salinity levels. *O. viciifolia* seeds germinated and grew more rapidly compared to *O. armena* seeds under NaCl stress. No decrease in germination and seedling growth up to 10 dS m⁻¹ was recorded. On the other hand, there was a clear difference for germination and seedling growth between *in vivo* and *in vitro* conditions. Lower values were obtained from *in vitro* experiments; suggesting that mineral salts, sucrose and agar may have resulted in higher osmotic potential inhibiting germination and seedling growth of species compared *in vivo* conditions. Decrease in pollen germination with increasing salinities was very sharp, indicating that pollen germination had higher sensitive to salinity. But, pollen grains of *O. armena* germinated rapidly compared to *O. viciifolia*. The results emphasize that *in vivo* experiments could be used for screening of NaCl tolerance in sainfoin cultivars without expensive chemicals and sophisticated equipments, but pollen germination is more appropriate for its wild relatives.

Key words: *in vivo*, *in vitro*, sainfoin, salinity, germination

Introduction

A total of 160 *Onobrychis* species exists throughout the world and are spread from Baltic States to Mediterranean region passing through all region lying in the Asia and Iran-Siberian element. In total 27 *Onobrychis* species are endemic to Turkey. Sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) is a perennial forage legume crop which is widely adapted to calcareous, well drained, poor and dry soils (Açiköz, 2001; Cavalların et al., 2005). It has been grown extensively in Eastern Europe and West Asia (Şancak et al., 2003). It is highly tolerant to salinity and drought and improves soil fertility by fixing atmospheric nitrogen (Özaslan-Parlak and Parlak, 2008; İmanparast and Hassanpanah, 2009). It has erect stems and deep tap roots holding soil firmly to the deeper layer and prevents soil erosion. It is preferred to other forage plants on dry soils of Anatolia because it produces satisfactorily hay under adverse conditions (Cavalların et al., 2005). *O. oxyodonta* var. *armena* (Syn: *O. armena* Boiss. and Huet) is a winter-resistant wild sainfoin species and is found extensively in meadows of Central Anatolia and Eastern Anatolia regions (Elçi, 2005).

Sainfoin is largely grown on low moisture soils of Anatolia where evaporation exceeds precipitation, resulting in salt accumulation on the soil surface (Kaya et al., 2003; Pessaraki, 1999). There are limited reports on the effects of salinity on seed germination and growth in *Onobrychis* species. Elçi (2005) indicated that it was suitable for salt infected

soils and favorable yield could be obtained at moderate level of salinity. Greub et al. (1985) reported that sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) was tolerant to NaCl, but it ranked lower than the grasses. Özaslan-Parlak and Parlak (2008) has indicated a decrease in plant height, dry hay yield and crude protein ratio due to increased salinity in irrigation water. However, it could not be determined clearly that differences between species against salt tolerance are mainly due to genetic or morphologic factors. Therefore, this study investigated the seed and pollen germination and the seedling growth of *O. viciifolia* and *O. oxyodonta* var. *armena* under various NaCl stresses using *in vivo* and *in vitro* techniques.

Materials and Methods

Seeds of *O. viciifolia* Scop. and *O. oxyodonta* var. *armena* (Syn: *O. armena* Boiss. and Huet) were collected from plants grown at same field, under similar cultural practices. Both species were tested against NaCl under *in vivo* and *in vitro* conditions. NaCl levels were adjusted as 5, 10, 20 and 30 dS m⁻¹ (electrical conductivities of the solutions) of NaCl using a conductivity meter (Model WTW Cond. 314i, Germany). Distilled water served as a control (0 dS m⁻¹).

Four replicates of 50 seeds of each species were germinated between three rolled filter papers with 15 mL of respective test solutions. Seeds were treated with fungicide before planting; papers were replaced every two days to prevent salt accumulation. The rolled paper with seeds was put

into sealed transparent plastic bags to avoid moisture loss. Seeds were allowed to germinate at $20 \pm 1^\circ\text{C}$ in the dark for 14 days.

Surface sterilization of the seeds of both *Onobrychis* species was done using 50% commercial bleach for 15 min followed by rinsing with distilled sterile water. The surface-sterilized seeds were transferred to germination substrate containing MS medium (Murashige and Skoog, 1962), 30 g L^{-1} sucrose and 8 g L^{-1} agar supplemented with 2.72, 4.12, 11.30 and $17.22 \text{ g NaCl L}^{-1}$ for obtaining EC values of 5, 10, 20 and 30 dS m^{-1} , respectively. The pH of medium was adjusted to 5.7 with 1 M NaOH or HCl before autoclaving at 121°C , 104 kPa for 20 min. Seeds were allowed to germinate at $20 \pm 1^\circ\text{C}$ under white fluorescent light with 16 h photoperiod.

A seed was considered germinated when the emerging radicle elongated to 2 mm. Germination percentage was recorded every 24 h for 14 days (ISTA, 2003). Mean germination time (MGT) was calculated following Ellis and Roberts (1980) to assess the rate of germination. $\text{MGT} = \sum D_n / \sum D$, where n is the number of the seeds newly germinated on day D, and D is the number of days from the beginning. Root, shoot length, fresh and dry seedling weights were measured on the 14th day. Dry weights were measured after drying samples at 70°C for 48 h in an oven.

Media reported to germinate pollen grains of sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) described by Sancak et al. (2003) had a common medium containing of 100 g L^{-1} sucrose, $200 \text{ mg L}^{-1} \text{KNO}_3$, $150 \text{ mg L}^{-1} \text{MgSO}_4$, $150 \text{ mg L}^{-1} \text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, $175 \text{ g L}^{-1} \text{PEG 4000}$, $150 \text{ mg L}^{-1} \text{H}_3\text{BO}_3$ and stigma extract at pH 6.5. Pollen was left to germinate for 1 hour at 24°C

under cool white fluorescent light ($35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Germination was observed under light microscope (Olympus BH-2). Pollen grains with pollen tube longer than the diameter of pollen were considered as germinated (Sancak et al., 2003).

The experimental design was two factors completely randomized design (CRD) with four replications. Data given in percentages were subjected to arcsin transformation before statistical analysis. For all investigated parameters, Analysis of Variance was performed using the MSTAT-C computer software (Michigan State University). Differences among the mean values were compared by Duncan's Multiple Range test ($p < 0.05$).

Results and Discussion

Seed germination percentage decreased by increasing NaCl in both species while the decrease was less in *O. viciifolia* compared to *O. armena* (Figure 1). The lowest germination (40.5%) was determined in *O. armena* at 30 dS m^{-1} . The lower doses of NaCl did not change the seed germination; however, seed germination drastically declined at doses higher than 20 dS m^{-1} .

Greater reduction in shoot length due to NaCl was very evident ($p < 0.01$) (Table 1). The longest shoots were obtained from *O. viciifolia* under all NaCl stresses. Shoot length was severely influenced by NaCl while the impact was more detrimental on *O. armena*. Increased NaCl diminished root length of the two species; however, this decrease was more prominent in *O. armena*.

Depending on the decrease in shoot and root length, fresh and dry seedling weights reduced gradually with the

Table 1 – Mean germination time (MGT), shoot length, root length, seedling fresh and dry weight and dry matter ratio of sainfoin species at various NaCl levels under *in vivo* conditions.

| Variety | NaCl | MGT | Shoot length | Root length | Seedling fresh weight | Seedling dry weight | Dry matter |
|---------------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-------------------|-----------------------|---------------------|-------------------|
| | dS m^{-1} | day | cm | | mg per plant | | % |
| <i>O. viciifolia</i> | 0 | 1.94 ^f | 5.69 ^a | 4.18 | 152 ^a | 9.3 ^{bc} | 6.0 ^f |
| | 5 | 1.95 ^f | 4.91 ^b | 5.13 | 128 ^{ab} | 9.8 ^{bc} | 7.6 ^{ef} |
| | 10 | 2.07 ^f | 3.25 ^d | 3.13 | 94 ^{bcd} | 9.8 ^{bc} | 9.8 ^{cd} |
| | 20 | 2.57 ^{de} | 1.97 ^a | 2.47 | 72 ^{cde} | 10.8 ^b | 14.8 ^b |
| | 30 | 4.46 ^b | 0.56 ^e | 1.20 | 42 ^{ef} | 12.3 ^a | 28.8 ^a |
| Mean | | 2.60 | 3.27 | 3.22a | 98 | 10.3 | 13.4 |
| <i>O. oxydonta</i> var. <i>armena</i> | 0 | 2.33 ^{ef} | 3.57 ^{cd} | 4.52 | 109 ^{abc} | 8.5 ^c | 8.0 ^{de} |
| | 5 | 2.85 ^d | 3.90 ^c | 4.21 | 106 ^{abc} | 8.5 ^c | 6.8 ^{ef} |
| | 10 | 3.91 ^c | 2.46 ^e | 3.21 | 76 ^{cde} | 8.3 ^c | 10.5 ^c |
| | 20 | 5.79 ^a | 0.66 ^f | 1.49 | 53 ^{de} | 9.5 ^{bc} | 15.8 ^b |
| | 30 | .. | .. | .. | .. ^f | .. ^d | .. |
| Mean | | 2.97 | 3.48 | 2.69 ^b | 69 | 7.0 | 10.3 |
| Summary of ANOVA | | | | | | | |
| Variety (A) | | ** | ** | ** | ** | ** | ** |
| NaCl (B) | | ** | ** | ** | ** | ** | ** |
| A × B | | ** | ** | ns | * | ** | ** |

*significant at $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and ns: non-significant. Different letters at the same column show significant differences at 0.05 level.

increasing salinity stress (Table 1). No seedling growth was observed in *O. armena* subjected to 30 dS m⁻¹. Higher fresh seedling weights were recorded on *O. viciifolia* compared to *O. armena* at all NaCl levels. Dry seedling weight showed a trend similar to that of fresh weight and showed decline in fresh seedling weight, dry weight enhanced with increasing NaCl levels. Increase in dry weight also resulted in increased dry matter of both *Onobrychis* species.

NaCl influenced seed germination of the species differently. Seed germination was not reduced at 5 dS m⁻¹, while 10 dS m⁻¹ caused reduction in germination (Figure 2). Furthermore, higher NaCl concentration resulted in lower vi-

ability of the seeds. The detrimental effect of NaCl on seed germination appeared at 30 dS m⁻¹. However, mean germination time was delayed by increased NaCl. Apparent difference was recorded among the species. MGT increased with each increase in NaCl stress in the two species. Contrarily, NaCl level of 20 dS m⁻¹ caused drastic delay in germination time of two species in general (Table 2).

For the species, root and shoot length decreased in response to increasing concentration of NaCl; however, this decrease was more prominent in *O. armena*. No root and shoot growth was recorded at NaCl levels of 30 dS m⁻¹ (Table 2). The longest roots and shoots were obtained from *O. viciifolia* under all NaCl concentrations.

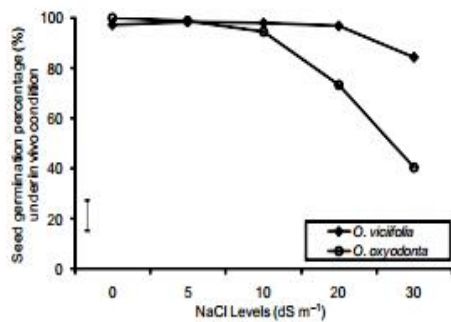


Figure 1 – Seed germination percentage of *O. viciifolia* (◆) and *O. oxyodonta* var. *armena* (○) under *in vivo* condition. The bar represents LSD value which is 12.5.

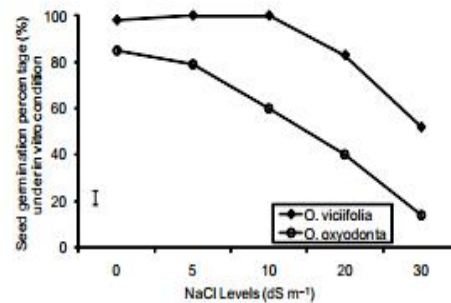


Figure 2 – Seed germination of *O. viciifolia* (◆) and *O. oxyodonta* var. *armena* (○) under *in vitro* condition. The bar represents LSD value which is 5.98.

Table 2 – Mean germination time (MGT), shoot length, root length, seedling fresh and dry weight and dry matter ratio of sainfoin species at various NaCl levels under *in vitro* conditions

| Variety | NaCl dS m ⁻¹ | MGT day | Shoot length | | Seedling fresh weight | | Dry matter % |
|--|----------------------------|-------------------|-------------------|--------------------|-----------------------|--------------------|---------------------|
| | | | cm | cm | mg per plant | mg per plant | |
| <i>O. viciifolia</i> | 0 | 3.01 ^d | 4.65 ^a | 5.60 ^b | 368 ^b | 42.8 ^{bc} | 11.3 ^b |
| | 5 | 3.29 ^d | 5.22 ^a | 6.91 ^a | 564 ^a | 64.5 ^a | 11.3 ^b |
| | 10 | 4.34 ^c | 4.59 ^a | 4.95 ^{bc} | 513 ^a | 62.0 ^{ab} | 11.0 ^c |
| | 20 | 7.08 ^a | 1.29 ^e | 1.17 ^e | 189 ^c | 30.0 ^{cd} | 15.3 ^b |
| | 30 | - ^a | - ^f | - ^f | - ^e | - ^d | - ^f |
| Mean | | 3.54 | 3.15 | 3.72 | 327 | 39.9 | 9.8 |
| <i>O. oxyodonta</i> var. <i>armena</i> | 0 | 5.05 ^c | 2.66 ^c | 3.95 ^{cd} | 334 ^b | 44.0 ^{bc} | 13.5 ^{cd} |
| | 5 | 4.64 ^c | 3.48 ^b | 4.79 ^{bc} | 193 ^c | 28.0 ^{cd} | 14.5 ^{bcd} |
| | 10 | 6.07 ^b | 1.96 ^d | 3.61 ^d | 118 ^{cd} | 20.3 ^d | 17.3 ^{ab} |
| | 20 | - ^a | 0.68 ^e | 1.25 ^e | 75 ^d | 16.3 ^{cd} | 19.5 ^a |
| | 30 | - ^a | - ^f | - ^f | - ^e | - ^d | - ^f |
| Mean | | 3.15 | 1.76 | 2.72 | 144 | 21.7 | 13.0 |
| Summary of ANOVA | | | | | | | |
| Variety (A) | | ns | ** | ** | ** | ** | ** |
| NaCl (B) | | ** | ** | ** | ** | ** | ** |
| A × B | | ** | ** | * | ** | ** | * |

*significant at $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and ns: non-significant. Different letters at the same column show significant differences at 0.05 level.

Compared to control, each increase in NaCl concentration resulted in remarkable decrease in fresh and dry seedling weights for the species. Although the species responded variable to different NaCl concentrations, the highest seedling fresh weight (564 mg per plant) and dry weight (64.4 mg per plant) were recorded at 5 dS m⁻¹ for *O. viciifolia*. Depending on shoot and root length, seedling fresh weight fluctuated. In contrast, dry matter of the species was enhanced with increased NaCl except at 30 dS m⁻¹ NaCl.

Pollen germination in control ranged from 83% for *O. viciifolia* to 96% for *O. armena* (Figure 3). Saline conditions induced a decrease in pollen germination. A very different response was detected between species at lower NaCl concentrations while none of the species were able to germinate at 30 dS m⁻¹. Especially, 20 dS m⁻¹ caused a detrimental effect on pollen germination.

Germination and seedling growth of the investigated sainfoin species were influenced by salt concentrations under *in vivo* and *in vitro* conditions. However, the responses of these species to salt concentration were different. Reduction in seed germination is in conformity with Khajeh-Hosseini et al. (2003), Murillo-Amador et al. (2002), who found that decreased germination was due to increased salinity. The results of this study are also in agreement with Prakash et al. (1998), Gadallah and Ramadan (1997), Gadallah (1996), Prakash et al. (1995) and Francois and Bernstein (1964), who emphasized that different varieties showed variable response against various salinity levels. Similarly, Hampson and Simpson (1990), Murillo-Amador et al. (2002), Okçu et al. (2005), Kaya et al. (2006), Karlidag et al. (2009) reported that NaCl had only adverse effect on germination by creating osmotic potential in the medium and caused delayed seed germination. There was a clear difference for germination and seedling growth under *in vivo* and *in vitro* conditions. Lower values were obtained from *in vitro* experiments; suggesting that the sucrose, MS mineral salts and agar and in *in vitro* conditions might have caused higher osmotic potential inhibiting germination and seedling growth of species than under *in vivo* conditions. Germination and seedling growth were reduced due to increased salt concentration with varying responses for species while NaCl affected germination of seeds by creating an external osmotic potential preventing water uptake

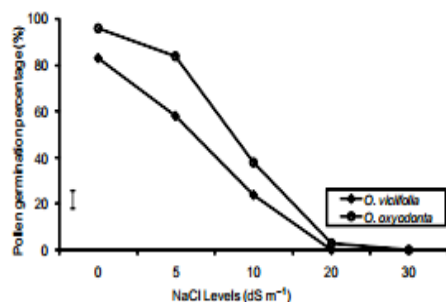


Figure 3 - Pollen germination of *O. viciifolia* (◆) and *O. oxydonta* var. *armena* (○). The bar represents LSD value which is 7.02.

(Pessaraki et al., 1991; Kaya et al., 2006). These results agree with Murillo-Amador et al. (2002) in cowpea and Okçu et al. (2005) in pea but should not be approved as a general rule because opposite results were recorded by Atak et al. (2006) who found reduced seedling growth under NaCl salinity. Pollen germination was also adversely affected by increasing NaCl concentration. *O. armena* gave higher pollen germination at all NaCl levels; suggesting that there was no overlap in the response of seeds and pollen to NaCl. Martinez-Pelle et al. (1995) found different responses with respect to pollen germination under various salinity stresses in pistacia species.

O. viciifolia gave higher seed germination and lower time to germinate under *in vivo* and *in vitro* conditions. However, the detrimental effect of NaCl on seedling growth was very evident in *O. armena* because no shoot and root growth was recorded at 30 dS m⁻¹. Furthermore, dry seedling weight and dry matter of the species enhanced with increased NaCl except at 30 dS m⁻¹ NaCl for *O. armena*. Similar findings have been reported in *Bothriochloa persuta* L., *Dichanthium annulatum* and *Panicum antidotale* under salinity (Akhtar and Hussain, 2008). The results are in line with the findings of Rehman et al. (2008) in wheat, Steppuhn et al. (2001) in canola, field bean, dry bean and drum wheat and Li (2008) in *Limonium sinense*, *Sorghum sudanense* and soybean.

In conclusion, critical period of crop plant to salinity generally occur on germination and seedling growth stages. The relative time of seed germination and seedling emergence of plants influences the degree of tolerance. Thus, the species or cultivars which rapidly germinate or emerge gain advantages for tolerance to NaCl. NaCl caused an adverse effect on germination and seedling growth with delayed mean germination time in the species. Similar results were detected under *in vivo* and *in vitro* conditions while lower values were determined in *in vitro*. It seems that *O. armena* germinate and grow more slowly compared to *O. viciifolia*. Both sainfoin species could keep up with the salinity up to 10 dS m⁻¹ during seed germination and early growth stages, and *O. viciifolia* was more tolerant to NaCl compared to *O. oxydonta* var. *armena*.

References

- Açikgöz, E. 2001. Forage Crops. Uludağ Üniversitesi Güçlendirme Vakfı Press, Bursa, Turkey. (in Turkish).
- Akhtar, P.; Hussain, F. 2008. Salinity tolerance of three range grasses at germination and early growth stages. Pakistan Journal of Botany 40: 2437-2441.
- Atak, M.; Kaya, M.D.; Kaya, G.; Çikili, Y.; Çiftçi, C.Y. 2006. Effects of NaCl on germination, seedling growth and water uptake of triticale. Turkish Journal of Agriculture and Forestry 30: 39-47.
- Cavallarin, L.; Antoniazzi, S.; Borreani, G.; Tabacco, E. 2005. Effects of wilting and mechanical conditioning on proteolysis in sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop) wilted herbage and silage. Journal of the Science of Food and Agriculture 85: 831-838.
- Elçi, S. 2005. Legume and Grass Forage Crops. Ministry of Agricultural and Rural Affairs Press, Ankara, Turkey. (in Turkish).
- Ellis, R.H.; Roberts, E.H. 1980. Towards a rational basis for testing seed quality. p. 605-635. In: Hebblethwaite, P.D., ed. Seed production. Butterworths, England.

- Francois, L.E.; Bernstein, L. 1964. Salt tolerance of safflower. *Agronomy Journal* 56: 38-40.
- Gadallah, M.A.A. 1996. Abscisic acid, temperature and salinity interactions on growth and some mineral elements in *Carthamus* plants. *Plant Growth Regulation* 20: 225-236.
- Gadallah, M.A.A.; Ramadan, T. 1997. Effects of zinc and salinity on growth and anatomical structure of *Carthamus tinctorius* L. *Biologia Plantarum* 39: 411-418.
- Greub, L.J.; Drolsom, P.N.; Rohweder, D.A. 1985. Salt tolerance of grasses and legumes for roadside use. *Agronomy Journal* 77: 76-80.
- Hampson, C.R.; Simpson, G.M. 1990. Effect of temperature, salt and osmotic potential on early growth of wheat (*Triticum aestivum* L.). I. Germination. *Canadian Journal of Botany* 68: 524-528.
- Imanparast, L.; Hassanpanah, D. 2009. Response of *Onobrychis* genotypes to PEG 10000 induced osmotic stress. *Biotechnology* 8: 368-369.
- International Seed Testing Association [ISTA]. 2003. International rules for seed testing. Battersdorf, Switzerland.
- Karlıdag, H.; Yıldırım, E.; Turan, M. 2009. Salicylic acid ameliorates the adverse effect of salt stress on strawberry. *Scientia Agricola* 66: 180-187.
- Kaya, M.D.; Ipek, A.; Ozturk, A. 2003. Effects of different soil salinity levels on germination and seedling growth of safflower (*Carthamus tinctorius* L.). *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 27: 221-227.
- Kaya, M.D.; Okçu, G.; Atak, M.; Cikili, Y.; Kolsarici, O. 2006. Seed treatments to overcome salt and drought stress during germination in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *European Journal of Agronomy* 24: 291-295.
- Khajeh-Hosseini, M.; Powell, A.A.; Bingham, I.J. 2003. The interaction between salinity stress and seed vigour during germination of soybean seeds. *Seed Science and Technology* 31: 715-725.
- Li, Y. 2008. Effect of salt stress on seed germination and seedling growth of three salinity plants. *Pakistan Journal of Biological Science* 11: 1268-1272.
- Martinez-Pelle, E.; Herrero, M.; Aragües, R. 1995. Salt response of seeds and pollen of five pistacia species. *Acta Horticulturae* 419: 49-54.
- Murashige, T.; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Murillo-Amador, B.; Lopez-Aguilar, R.; Kaya, C.; Larrinaga-Mayoral, J.; Flores-Hernandez, A. 2002. Comparative effects of NaCl and polyethylene glycol on germination, emergence and seedling growth of cowpea. *Journal of Agronomy and Crop Science* 188: 235-247.
- Okçu, G.; Kaya, M.D.; Atak, M. 2005. Effects of salt and drought stresses on germination and seedling growth of pea (*Pisum sativum* L.). *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 29: 237-242.
- Özaslan-Parlak, A.; Parlak, M. 2008. Effect of salinity in irrigation water on some plant development parameters of sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) and soil salinity. *Tarım Bilimleri Dergisi* 14: 320-325.
- Pessarakli, M. 1999. *Handbook of Plant and Crop Stress*. Marcel Decker, New York, NY, USA.
- Pessarakli, M.; Tucker, T.C.; Nakabayashi, K. 1991. Growth response of barley and wheat to salt stress. *Journal of Plant Nutrition* 14: 331-340.
- Prakash, M.; Babu, S.; Ramesh, M.; Thirumurugan, T.; Venkatesan, M.; Ganesan, J. 1998. Effects of NaCl priming on sesame seedling vigour under induced salinity conditions. *Sesame and Safflower Newsletter*, 13: 97-100.
- Prakash, M.; Jagadeeswaran, G.; Murugan S.; Ganesan, J. 1995. Effects of seed treatment on germination and seedling attributes in sesame (*Sesamum indicum* L.). *Sesame and Safflower Newsletter* 10: 55-58.
- Rehman, M.; Soomro, U.A.; Haq, M.Z.; Gul, S. 2008. Effects of NaCl salinity on wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. *World Journal of Agricultural Science* 4: 398-403.
- Sancak, C.; Coçu, S.; Khawar, K.M.; Özcan, S. 2003. Abiotic factors affecting in vitro pollen grain germination in sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.). *Pakistan Journal of Botany* 35: 463-471.
- Steppuhn, H.; Volkmar, K.M.; Miller, P.R. 2001. Comparing canola, field pea, dry bean and drum wheat crops grown in saline media. *Crop Science* 41: 1827-1833.

Received April 05, 2010
Accepted September 24, 2010

Sugar beet (*Beta vulgaris* L.) growth at different ploidy levels

Ramazan Beyaz^a, Behrouz Alizadeh^b, Songül Güre^c, S. Fatih Özcan^d and Mustafa Yıldız^{e*}

^aUniversity of Ankara, Biotechnology Institute, Golbasi, Ankara, Turkey; ^bUniversity of Ankara, Graduate School of Natural and Applied Sciences, Department of Field Crops, Golbasi, Ankara, Turkey; ^cSugar Institute, Department of Plant Breeding, Etimesgut, Ankara, Turkey; ^dField Crops Central Research Institute, Yenimahalle, Ankara, Turkey; ^eUniversity of Ankara, Faculty of Agriculture, Department of Field Crops 06110 Diskapi, Ankara, Turkey

The aim of this study was to compare seed germination percentage, seedling growth, total chlorophyll and protein content, sugar content, and root and sugar yields of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) genotypes at different ploidy levels. Sugar beet seeds from cultivars "Agnessa" and "Felicità" (diploids), and lines "AD 440" and "CBM 315" (tetraploids) were obtained from the Sugar Research Institute, Etimesgut, Ankara. Seed germination percentage was recorded after 4 days, whereas seedling and root lengths were noted 4 and 14 days after the study initiation. The size of epidermal cells in length and width were determined on the upper leaf surface of 6-week-old plants. Six and 10 weeks after seed sowing, plant and root lengths, leaf length and width, plant fresh and dry weights, and total chlorophyll and protein content were measured. Data related to yield components such as sugar content, root and sugar yields were obtained from trials conducted by the Sugar Research Institute under field conditions 6 months after study initiation. In the current study, diploid genotypes showed superior responses regarding generative characteristics while tetraploids passed diploid ones vegetatively in the further stages of the development. Ten weeks after study initiation, the highest results regarding vegetative characters such as plant height, root and leaf lengths, leaf width, approximate leaf area, plant fresh and dry weights, and tissue water content were recorded from tetraploid genotypes as 35.00 cm, 43.85 cm, 18.40 cm, 9.25 cm, 170.35 cm², 369.10 g, 77.45 g and 291.65 g, respectively while the highest total chlorophyll content and protein percentage was obtained from diploid genotypes as 1552.65 µg g⁻¹ fresh tissue and 21.11%, respectively. The highest values of sugar content, root and sugar yields were obtained from diploid genotypes as 15.55%, 71.47 t ha⁻¹ and 11.09 t ha⁻¹, respectively.

Keywords: sugar beet; ploidy level; vegetative growth; generative growth

Introduction

Differences between diploid and polyploid plants include morphological, physiological, cellular and biochemical aspects. Polyploid plants have bigger cells and stomata than diploid plants, resulting in thicker and larger leaves, larger flowers and fruits. In general, autotetraploids have greater vegetative volume and larger seed weight but lower reproductive fertility than diploids, and flowering and fruit formation are often later in tetraploids than in diploids as reported by Stebbins (1947). Shoots of polyploid genotypes are thicker with short internodes and wider crotch angles. As the chromosome number increases, DNA content per cell, enzyme activity per cell and cell volume all increases (Molin et al. 1982; Warner et al. 1987). In addition, polyploids are used as sources of variability and new genotypes for plant improvement (Jan 1988; Hussain et al. 1997).

Polyploid genotypes have shown resistance to biotic (pests and pathogens) and abiotic (drought and cold, etc) stress factors in some cases and this resistance enables them to have greater adaptability to wider ecological regions. This could be attributed to higher chromosome

number and gene expression causing an increase in the concentration of secondary metabolites and chemicals that are responsible for defense mechanisms. This increase in the concentration of secondary metabolites and chemicals enables polyploid genotypes to resist biotic and abiotic stress factors, and consequently to grow in a wide range of environments.

However, the effects of increased ploidy level cannot be anticipated all the time. Polyploid individuals may not always be superior to diploid ones: in some cases polyploid plants have slower growth rates (Ranney 2006) which could be attributed to difficulties in the cell cycle and slow cell division (Comai 2005), causing lower cell numbers and smaller organs. For example, it was reported that the overall chlorophyll content in polyploid plants is higher than diploid ones with lower chromosome numbers (Molin et al. 1982; Warner et al. 1987; Mathura et al. 2006), while total chlorophyll content of tetraploid sugar beet genotypes ("AD 440" and "CBM 315") in our study were found to be lower than that of diploid ones ("Agnessa" and "Felicità").

*Corresponding author. Email: myildiz@ankara.edu.tr

The aim of this study was to compare sugar beet (*Beta vulgaris* L.) genotypes at different ploidy levels with respect to seed germination, seedling growth, total chlorophyll and protein content, sugar content, root and sugar yields.

Materials and methods

Seeds of genotypes "Agnessa" and "Felicita" (diploid, high root yield), and "AD 440" and "CBM 315" (tetraploid, high root yield) were obtained from the Sugar Research Institute, Etimesgut, Ankara.

Seeds were placed in bottles containing 200 ml tap water and shook for 24 hours to increase permeability of true seed coat for rapid germination. After that, seeds were sown in wooden boxes under greenhouse conditions at 25°C with a 14 h light/10 h dark photoperiod. All boxes were irrigated at 2-day intervals. Seed germination percentage was recorded after 4 days, whereas seedling and root lengths were noted 4 and 14 days after the study initiation. Data related to yield components such as sugar content, root and sugar yields were obtained from trials conducted by the Sugar Research Institute under field conditions.

The sizes of epidermal cells in length and width in a field of view area (105,938 μm^2) of a microscope on the upper leaf surface of 6-week-old plants were determined using clear fingernail polish, clear tape, a glass slide, and a microscope at 60 \times magnification.

After 6 and 10 weeks, plant and root lengths, leaf length and width, plant fresh and dry weights, and total chlorophyll and protein content were measured. Plants were weighed to determine the fresh weight while the dry weight was noted after drying plants at 70°C for 4 days. All measurements were made using an analytical scale, with precision of 0.01 g.

Total chlorophyll content was determined in 6- and 10-week-old plants according to the protocol of Curtis and Shetty (1996). Fresh tissue (50 mg) from the leaf was put in 3 ml methanol and kept in total darkness at 23°C for 2 hours. In this way, chlorophyll in the fresh tissue passed through into methanol. After 2 hours, absorbencies were determined at 650 and 665 nm. Total chlorophyll content was calculated as μg chlorophyll/g fresh tissue.

Three replicates were tested. The number of plants per replication for seed germination and seedling establishment was 40 and for other parameters examined was 15. Data were statistically analyzed by Duncan's multiple range test using the SPSS for Windows computer program. Data presented in percentages were subjected to arcsine (\sqrt{X}) transformation before statistical analysis (Snedecor and Cochran 1967).

Results

In the current study conducted in sugar beet, which is an important sucrose-producing crop worldwide in

temperate regions and supplies about 21% of the world sugar consumption, two diploid ("Agnessa" and "Felicita") and two tetraploid ("AD 440" and "CBM 315") sugar beet genotypes were compared with respect to seed germination, seedling growth, total chlorophyll and protein content, sugar content, and root and sugar yields. The sizes of epidermal cells in a field of view area on the upper leaf surface of sterile seedlings were counted. The number of cells in a field of view area was higher in diploid genotypes than in tetraploids due to small cell sizes. The mean number of cells was recorded as 160.22 in diploid genotypes while it was 75.50 in tetraploids (Table 1, Figure 1). On the other hand, approximate cell area was found to be higher in tetraploids than in diploids. Mean approximate cell area was calculated as 2713.32 μm^2 in diploids while it was 6531.02 μm^2 in tetraploid genotypes (Table 1, Figure 1).

Diploid genotypes gave higher results than tetraploids in seed germination percentage, root length and seedling height at the fourth day, and root length and seedling height at the 14th day. In diploids, root length was recorded as 7.93 cm at the fourth day and it was noted as 13.32 cm at the 14th day. This indicated a 68.00% increase in root length. However, in the case of tetraploid genotypes, root length was recorded as 5.46 cm at the fourth day while it was 7.51 cm at the 14th day, which meant an increase of 37.55%. On the other hand, seedling height in diploids was recorded as 6.67 cm at the fourth day while it reached 9.29 cm at the 14th day. In tetraploids, seedling height was measured as 5.62 cm at the fourth day whereas it reached 6.80 cm at the 14th day. This lower increase in root length and seedling height in tetraploid genotypes could be attributed to lower metabolic activity and slower cell cycle (Table 2).

In the first six weeks, diploid genotypes gave rise to the highest results with respect to plant height, root length, leaf length and width, plant fresh and dry weights, total chlorophyll content and protein percentage. Mean plant height reached 19.00 cm in diploid genotypes while it was 15.07 cm in tetraploids six weeks after study initiation. Mean leaf area was recorded as 17.28 cm^2 in diploids and 12.02 cm^2 in tetraploids. Mean plant fresh and dry weights were calculated as 10.45 g and 2.64 g in diploid genotypes while they were 5.44 g and 1.06 g in tetraploids. Tissue water content was 7.82 g in diploids and 4.38 g in tetraploids. Total chlorophyll content was noted as 964.77 $\mu\text{g g}^{-1}$ fresh tissue in diploids while it was 747.90 $\mu\text{g g}^{-1}$ fresh tissue in tetraploids. Protein was calculated 19.76% in diploids and 4.61% in tetraploids (Figure 2, Table 3). However, diploids were passed by tetraploid genotypes in the further stages of development in the characters of plant height, root length, leaf length and width, and plant fresh and dry weights. Mean plant height in diploid genotypes was 23.90 cm while it was 35.0 cm in tetraploids 10 weeks after study initiation. Mean leaf area was calculated as 100.30 cm^2 in diploids and 170.35 cm^2 in tetraploids. Mean plant fresh and dry weights were

Table 1. Cell sizes in the upper leaf surface of 6-week-old sugar beet genotypes at different ploidy levels.

| Genotypes | Cell number | Cell length (μm) | Cell width (μm) | Approximate cell area (μm^2) |
|---------------|-------------|-------------------------------|------------------------------|---|
| Agnessa (2X) | 167.65 a | 86.52 b | 31.24 b | 2702.88 |
| Felicita (2X) | 152.80 a | 82.14 b | 33.16 b | 2723.76 |
| Mean | 160.22 | 84.33 | 32.20 | 2713.32 |
| AD 440 (4X) | 78.60 b | 131.62 a | 48.42 a | 6373.04 |
| CBM 315 (4X) | 72.40 b | 128.24 a | 52.16 a | 6688.99 |
| Mean | 75.50 | 129.93 | 50.29 | 6531.02 |

Values followed by different letters in a column are significantly different at the 0.01 level.

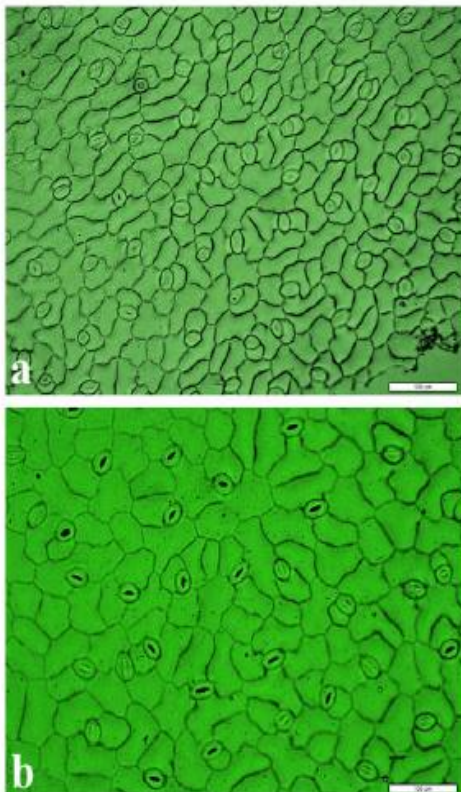


Figure 1. Cells and stomatas from the upper leaf surface of 6-week-old sugar beet seedlings. (a) Diploid genotype "Felicita" and (b) Tetraploid genotype "AD 440".

recorded as 296.35 g and 47.25 g in diploid genotypes while they were 369.10 g and 77.45 g in tetraploids. Tissue water content was recorded as 249.10 g in diploids and 291.65 g in tetraploids. Total chlorophyll content and protein percentage, which could be accepted as generative characters, were both found higher in diploids than in tetraploids. Total chlorophyll content was recorded as 1552.65 $\mu\text{g g}^{-1}$ fresh tissue in diploids and 1243.55 $\mu\text{g g}^{-1}$ fresh tissue in tetraploids. Protein was detected as 21.11% in diploid genotypes and 16.74% in tetraploids (Figure 3, Table 4). It was thought that this could be due to the fact that photosynthetic capacity of the tissue in diploids was higher because of higher chlorophyll content, water and nutrient uptake from the soil with their roots. Higher photosynthetic capacity resulted in higher protein content in diploids.

Sugar content, root and sugar yields were recorded as 15.55%, 71.47 t ha^{-1} and 11.09 t ha^{-1} in diploid genotypes while they were 12.46%, 56.53 t ha^{-1} and 7.04 t ha^{-1} in tetraploids, respectively (Tables 4 and 5).

Discussion

There are differences between diploid and polyploid plants from morphological, physiological, cellular and biochemical aspects (Berkov and Philipov 2002).

The highest values of cell size were recorded in tetraploid genotypes, as reported by Smith et al. (2003) who noted that polyploidy increased the cell size and volume. Decreased cell number in polyploid genotypes was compensated by increased cell size as reported by Doonan (2000) and Inze and De Veylder (2006). Our findings

Table 2. Germination and seedling growth in diploid and tetraploid sugar beet genotypes.

| Genotype | Day 4 | | | Day 14 | |
|---------------|-----------------|------------------|----------------------|------------------|----------------------|
| | Germination (%) | Root length (cm) | Seedling height (cm) | Root length (cm) | Seedling height (cm) |
| Agnessa (2X) | 75.10 a | 7.40 a | 6.34 a | 12.67 a | 9.05 a |
| Felicita (2X) | 89.10 a | 8.45 a | 7.00 a | 13.96 a | 9.52 a |
| Mean | 82.10 | 7.93 | 6.67 | 13.32 | 9.29 |
| AD 440 (4X) | 60.10 b | 5.05 b | 5.74 a | 7.50 b | 6.21 b |
| CBM 315 (4X) | 60.10 b | 5.86 b | 5.49 a | 7.52 b | 7.38 b |
| Mean | 60.10 | 5.46 | 5.62 | 7.51 | 6.80 |

Values followed by different letters in a column are significantly different at the 0.01 level.



Figure 2. Seedlings developed from seeds of (a) diploid ("Felicita") and (b) tetraploid ("AD 440") genotypes 6 weeks after study initiation (bar = 3 cm).



Figure 3. Seedlings developed from seeds of (a) diploid ("Felicita") and (b) tetraploid ("AD 440") genotypes 10 weeks after study initiation (bar = 5 cm).

verified these studies that lower cell number (75.50) in tetraploid genotypes was compensated by increased cell size (Table 1).

Plants developed from diploid seeds were more vital and well-grown in the first stages of the development. This could be due to the fact that polyploid seeds had lower germination and emergence percentages than diploid ones due to their thicker seed coat and seedling emergence strength (Sung and Chui 1995; Kihara 1951). Plant height and root length scores, which were higher in diploid genotypes in the first 6 weeks, were good indicators for vitality and growth. High ploidy level does not result in increased shoot growth all the time. Leaf area, which plays an important role in the photosynthetic activity, was found to be higher in diploid genotypes in the first 6 weeks. However, at the 10th week, although leaf area of tetraploid genotypes was greater than in diploids, total chlorophyll content was determined to be higher in diploids than in tetraploids. High ploidy level does not result in increased shoot growth every time (Pegtel 1999). Polyploid plants may show high-ploidy syndrome, with a costly cell cycle and slow cell division at higher ploidy levels. Lower results in morphological characters in the first developmental stages of tetraploid

genotypes could be attributed to slow cell division, as reported by Comai (2005).

Chlorophyll content, which is accepted as an indicator of photosynthetic capacity of tissues (Pal and Laloraya 1972; Wright et al. 1994; Nageswara et al. 2001), was again found to be higher in diploid plants. The number of photosynthetic cells per unit leaf area decreases with increasing ploidy level (Warner and Edwards 1989). Although chloroplasts (Beck, Dunlop et al. 2003; Beck, Fossey et al. 2003) and chlorophyll content (Molin et al. 1982) are higher in polyploid genotypes, increased chlorophyll content with increasing ploidy level is not always apparent. For instance, chlorophyll content remained constant in different ploidy levels of *Atriplex confertifolia* (Warner and Edwards 1989).

It was reported that the fresh weight increase was mainly due to cell enlargement by water absorption (Dale 1988) and increase in dry weight was closely related to cell division and new material synthesis via photosynthesis (Sunderland 1960). Dry weight increase in diploids was due to an increase in photosynthetic activity and carbohydrate metabolism resulting from increased water uptake by longer roots. Reduced fresh weight in tetraploids in the beginning of the development

Table 3. Development of seedlings from seeds of diploid and tetraploid genotypes 6 weeks after study initiation.

| | Plant height (cm) | Root length (cm) | Leaf length (cm) | Leaf width (cm) | Approximate leaf area (cm ²) | Plant fresh weight (g) | Plant dry weight (g) | Tissue water content (g) | Total chlorophyll content (µg g ⁻¹ fresh tissue) | Protein (%) |
|---------------|-------------------|------------------|------------------|-----------------|--|------------------------|----------------------|--------------------------|---|-------------|
| Agnessa (2X) | 18.53 a | 21.40 a | 5.13 a | 3.04 a | 16.51 a | 11.81 a | 2.50 a | 9.31 a | 894.07 b | 18.45 a |
| Felicita (2X) | 19.47 a | 19.34 a | 5.75 a | 3.14 a | 18.06 a | 9.10 a | 2.78 a | 6.32 a | 1035.47 a | 21.07 a |
| Mean | 19.00 | 20.37 | 5.44 | 3.09 | 17.28 | 10.45 | 2.64 | 7.82 | 964.77 | 19.76 |
| AD 440 (4X) | 15.01 b | 13.46 b | 5.00 a | 2.34 b | 11.70 b | 6.19 b | 1.18 b | 5.01 b | 815.99 b | 6.33 b |
| CBM 315 (4X) | 15.14 b | 14.95 b | 4.96 a | 2.49 b | 12.35 b | 4.69 b | 0.94 b | 3.75 b | 679.82 c | 2.90 b |
| Mean | 15.07 | 14.20 | 4.98 | 2.41 | 12.02 | 5.44 | 1.06 | 4.38 | 747.90 | 4.61 |

Values followed by different letters in a column are significantly different at the 0.01 level.

Table 4. Development of seedlings from seeds of diploid and tetraploid genotypes 10 weeks after study initiation.

| | Plant height (cm) | Root length (cm) | Leaf length (cm) | Leaf width (cm) | Approximate leaf area (cm ²) | Plant fresh weight (g) | Plant dry weight (g) | Tissue water content (g) | Total chlorophyll content (µg g ⁻¹ fresh tissue) | Protein (%) |
|---------------|-------------------|------------------|------------------|-----------------|--|------------------------|----------------------|--------------------------|---|-------------|
| Agnessa (2X) | 20.5 b | 29.0 b | 13.4 b | 7.3 b | 97.8 b | 286.6 b | 42.9 b | 243.7 b | 1571.5 a | 20.46 a |
| Felicita (2X) | 27.3 b | 33.8 b | 14.9 b | 6.9 b | 102.8 b | 306.1 b | 51.6 b | 254.5 b | 1533.8 a | 21.77 a |
| Mean | 23.90 | 31.40 | 14.15 | 7.10 | 100.30 | 296.35 | 47.25 | 249.10 | 1552.65 | 21.11 |
| AD 440 (4X) | 37.0 a | 42.9 a | 18.7 a | 9.7 a | 181.4 a | 357.1 a | 77.3 a | 279.8 a | 1210.6 b | 16.10 b |
| CBM 315 (4X) | 33.0 a | 44.8 a | 18.1 a | 8.8 a | 159.3 a | 381.1 a | 77.6 a | 303.5 a | 1276.5 b | 17.39 b |
| Mean | 35.00 | 43.85 | 18.40 | 9.25 | 170.35 | 369.10 | 77.45 | 291.65 | 1243.55 | 16.74 |

Values followed by different letters in a column are significantly different at the 0.01 level.

Table 5. Sugar content, root and sugar yields in diploid and tetraploid genotypes.

| Genotypes | Sugar content (%) | Root yield (t ha ⁻¹) | Sugar yield (t ha ⁻¹) |
|---------------|-------------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| Agnessa (2X) | 14.88 a | 74.46 a | 11.08 a |
| Felicita (2X) | 16.21 a | 68.48 a | 11.10 a |
| Mean | 15.55 | 71.47 | 11.09 |
| AD 440 (4X) | 12.85 b | 54.40 b | 6.99 b |
| CBM 315 (4X) | 12.07 b | 58.66 b | 7.08 b |
| Mean | 12.46 | 56.53 | 7.04 |

Values followed by different letters in a column are significantly different at the 0.01 level.

could be attributed to decreased water absorption as reported by Prado et al. (1995). Sullivan and Pfahler (1986) reported that seedling growth was affected by genotypic differences more than ploidy in diploid and autotetraploid *Secale cereale*.

Cells with high ploidy level have bigger vacuoles (Jibiki et al. 1993) and the vacuole plays an important role in regulating osmotic pressure of the cell (Guertin and Sabatini 2005). Higher cell osmotic pressure in polyploid plants as reported by Tal and Gardi (2006) could cause high tissue metabolic activity by increasing water and nutrition uptake. Thus, increase in the fresh and dry weights of tetraploid genotypes in our study at the end of 10th week were chiefly due to an increase in the absorption of water and other components via high cell osmotic pressure. Conversely, lower osmotic pressure of diploid genotypes caused a decline in fresh and dry weights by decreasing the absorption of water and other components via roots. The results of tissue water content clearly showed that tetraploid genotype had higher osmotic pressure, causing higher absorption of water and other components from the soil. In general, tetraploids have higher vegetative growth but lower reproductive fertility than diploids. Polyploids flower and fruit later than diploids, as reported by Stebbins (1947). Thus, in our study, tetraploid genotypes overtook diploid genotypes 10 weeks after study initiation, in vegetative characters such as plant height, root and leaf lengths, leaf width, approximate leaf area, plant fresh and dry weights. However, in

generative characters (total chlorophyll content, protein percentage, sugar content, root and sugar yields), diploid genotypes showed the highest performance.

From the results of the present study, the lower levels of parameters recorded in tetraploid genotypes confirmed that the effects of increased ploidy level could not be anticipated all the time. Diploid genotypes were found to be superior to tetraploids in generative characteristics such as total chlorophyll and protein content, sugar content, root and sugar yields. Thus, it should be considered that responses of polyploid genotypes may differ in morphological, physiological, cellular and biochemical aspects. That is why, in a research study, responses of both diploid and polyploid genotypes should be evaluated carefully for successful results.

References

- Beck SL, Dunlop RW, Fossey A. 2003. Evaluation of induced polyploidy in *Acacia mearnsii* through stomatal counts and guard cell measurements. *S Afr J Bot.* 69:563–567.
- Beck SL, Fossey A, Mathura S. 2003. Ploidy determination of black wattle (*Acacia mearnsii*) using stomatal chloroplast counts. *S Afr Forest J.* 192:79–92.
- Berkov S, Philipov S. 2002. Alkaloid production in diploid and autotetraploid plants of *Datura stramonium*. *Pharm Biol.* 40:617–621.
- Comai L. 2005. The advantages and disadvantages of being polyploid. *Nat Genet.* 6:836–846.
- Curtis OF, Shetty K. 1996. Growth medium effects on vitrification, total phenolics, chlorophyll, and water content of *in vitro* propagated oregano clones. *Acta Hort.* 426:498–503.
- Dale JE. 1988. The control of leaf expansion. *Annu Rev Plant Physiol.* 39:267–295.
- Doonan J. 2000. Social control on cell proliferation in plants. *Curr Opin Plant Biol.* 3:482–487.
- Guertin DA, Sabatini DM. 2005. Encyclopedia of life sciences. Chichester: John Wiley & Sons. Cell size control; p. 1–10.
- Hussain SW, Williams WM, Woodfield DR, Hampton JG. 1997. Development of a ploidy series from a single interspecific *Trifolium repens* L&A macr: nigrescens Viv. F1 hybrid. *Theor Appl Genet.* 94:821–831.
- Inze D, De Veylder L. 2006. Cell cycle regulation in plant development. *Annu Rev Genet.* 40:77–105.
- Jan CC. 1988. Induced tetraploidy and trisomic production of *Helianthus annuus* L. *Genome.* 30:647–651.

- Jibiki M, Kuno Y, Shinoyama H, Fujii T. 1993. Isolation and properties of large cell strains from a methanol-utilizing yeast, *Candida* sp. N-16 by colchicine treatment. *J Gen Appl Microbiol.* 39:439-442.
- Kihara H. 1951. Triploid watermelons. *Proc Am Soc Horticult Sci.* 58:217-230.
- Mathura S, Fossey A, Beck S. 2006. Comparative study of chlorophyll content in diploid and tetraploid black Wattle (*Acacia meansii*). *Forestry.* 79(4):381-388.
- Molin WT, Meyers SP, Baer GR, Schrader LE. 1982. Ploidy effects of isogenic populations of alfalfa II. Photosynthesis, chloroplast number, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase, chlorophyll, and DNA in protoplasts. *Plant Physiol.* 70:1710-1714.
- Nageswara RRC, Talwar HS, Wright GC. 2001. Rapid assessment of specific leaf area and leaf nitrogen in peanut (*Arachis hypogaea* L.) using chlorophyll meter. *J Agron Crop Sci.* 189:175-182.
- Pal RN, Laloraya MM. 1972. Effect of calcium levels on chlorophyll synthesis in peanut and linseed plants. *Biochem Physiol Pflanz.* 163:443-449.
- Pegtel DM. 1999. Effect of ploidy level on fruit morphology, seed germination and juvenile growth in scurvy grass (*Cochlearia officinalis* L. s.l., Brassicaceae). *Plant Species Biol.* 14:201-215.
- Prado FE, Gonzalez JA, Gallardo M, Moris M, Boero C, Kortsarz A. 1995. Changes in soluble carbohydrates and invertase activity in *Chenopodium quinoa* ("quinoa") developed for saline stress during germination. *Curr Topic Phytochem.* 14:1-5.
- Ranney TG. 2006. Polyploidy: From evolution to new plant development. *Proc Int Plant Propagator Soc.* 56:604-607.
- Smith KF, McFarlane NM, Croft VM, Trigg PJ, Keamey GA. 2003. The effects of ploidy and seed mass on the emergence and early vigour of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) cultivars. *Aust J Exp Agric.* 43:481-486.
- Snedecor GW, Cochran WG. 1967. *Statistical Methods.* 6th ed. Iowa State University Press, Ames, IA.
- Stebbins GL. 1947. Types of polyploids: their classification and significance. *Adv Genet.* 1:403-429.
- Sullivan BP, Pfahler PL. 1986. Diploid-tetraploid comparison in rye. III. Temperature effects on seedling development. *Crop Sci.* 26:795-799.
- Sung JM, Chiu KY. 1995. Hydration effect on seedling emergence strength of watermelon seeds differing in ploidy. *Plant Sci.* 110:21-26.
- Sunderland N. 1960. Cell division and expansion in the growth of the leaf. *J Exp Bot.* 11:68-80.
- Tal M, Gardi I. 1976. Physiology of polyploid plants: Water balance in autotetraploid and diploid tomato under low and high salinity. *Physiol Plant.* 38(4):257-261.
- Wamer DA, Edwards GE. 1989. Effects of polyploidy on photosynthetic rates, photosynthetic enzymes, contents of DNA, chlorophyll, and sizes and numbers of photosynthetic cells in the C₄ dicot *Atriplex confertifolia*. *Plant Physiol.* 91:1143-1151.
- Wamer DA, Ku MSB, Edwards GE. 1987. Photosynthesis, leaf anatomy, and cellular constituents in the polyploid C₄ grass *Panicum virgatum*. *Plant Physiol.* 84:461-466.
- Wright GC, Nageswara RRC, Farquhar GD. 1994. Water use efficiency and carbon isotope discrimination in peanut under water deficit conditions. *Crop Sci.* 34:92-97.