

**T.C.**  
**MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BIYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**TUZ STRESİ ALTINDAKİ DOMATES**  
**İN VİTRO KÜLTÜRLERİNDE**  
**EPİBRASSİNOLİDİN ETKİSİ**

**DOKTORA TEZİ**

**Emel YILMAZ GÖKDOĞAN**

**HAZİRAN 2014**

**MUĞLA**

**T.C.**  
**MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**TUZ STRESİ ALTINDAKİ DOMATES**  
**İN VİTRO KÜLTÜRLERİNDE**  
**EPİBRASSİNOLİDİN ETKİSİ**

**DOKTORA TEZİ**

**Emel YILMAZ GÖKDOĞAN**

**HAZİRAN 2014**

**MUĞLA**

MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ

Fen Bilimleri Enstitüsü

TEZ ONAYI

Emel YILMAZ GÖKDOĞAN tarafından hazırlanan Tuz Stresi Altındaki Domates İn Vitro Kültürlerinde Epibrassinolidin Etkisi başlıklı tezin, 10/06/2014 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı'nda doktora derecesi için gerekli şartları sağladığı oybirliği/oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

TEZ SINAV JURİSİ

Prof. Dr. Betül BÜRÜN (Jüri Başkanı, Danışman)

Biyoloji Anabilim Dalı,  
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

İmza:

Prof. Dr. Nedret ŞENGONCA (Üye)

Botanik Ana Bilim Dalı, Ege Üniversitesi, İzmir

İmza:

Prof. Dr. A. Levent TUNA (Üye)

Biyoloji Anabilim Dalı,  
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

İmza:

Doç. Dr. Bengi ERDAĞ (Üye)

Biyoloji Ana Bilim Dalı,  
Adnan Menderes Üniversitesi, Aydın

İmza:

Yrd. Doç. Dr. Hakan ALTUNLU (Üye)

Ortaça MYO,  
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

İmza:

ANA BİLİM DALI BAŞKANLIĞI ONAYI

Prof. Dr. H.Sungur CİVELEK

Biyoloji Ana Bilim Dalı Başkanı,  
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

İmza:

Prof. Dr. Betül BÜRÜN

Danışman, Biyoloji Anabilim Dalı,  
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

İmza:

Savunma Tarihi:10/06/2014

Tez çalışmalarım sırasında elde ettiğim ve sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgelerin tarafımdan bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde edildiğini; akademik ve bilimsel etik kurallarına uygun olduğunu beyan ederim. Ayrıca, akademik ve bilimsel etik kuralları gereği bu tez çalışması sırasında elde edilmemiş başkalarına ait tüm orijinal bilgi ve sonuçlara atıf yaptığımı da beyan ederim.

Emel YILMAZ GÖKDOĞAN

10/06/2014



**ÖZET**  
**TUZ STRESİ ALTINDAKİ DOMATES İN VİTRO KÜLTÜRLERİNDE**  
**EPIBRASSİNOLİDİN ETKİSİ**

Emel YILMAZ GÖKDOĞAN

Doktora Tezi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Betül BÜRÜN

Haziran 2014, 164 Sayfa

Tez çalışmasında domates (*Lycopersicon esculentum* Mill.) in vitro kültürlerinde tuz stresi ve tuz stresine karşı 24-epibrassinolid (24-epiBL)'in etkisi araştırılmıştır. Tez kapsamında tohum çimlendirme, sürgün ucu ve kallus kültürleri ile sürgün rejenerasyonu çalışmaları yapılmıştır. İn vitro çalışmalarında tohum, sürgün ucu, kotiledon ve hipokotil eksplantları kullanılmıştır. Tohum ve eksplantlar (sürgün ucu, kotiledon ve hipokotil), epiBL çözeltilerinde farklı sürelerde bekletilmiş ve ekzojen epiBL uygulaması yapılmıştır. NaCl konsantrasyonları 20, 40, 50, 60, 80, 100, 150 mM ve NaCl stresine karşı epiBL uygulama konsantrasyonları 0.5, 1, 1.5, 2 µM'dır.

Tohum çimlendirmede, epiBL uygulaması kültür öncesi tohumlara uzun süreli (24 saat) ve kısa süreli (10 saniye) yapılmıştır. Uzun süreli epiBL uygulamalı tohumlar petri kaplarında filtre kağıdı üzerinde kültüre alınmıştır ve artan konsantrasyonlarda NaCl (0, 50, 100 ve 150 mM) çözeltileri ile ıslatılmıştır. 150 mM NaCl konsantrasyonunda çimlenme olmadığı için ve uzun süreli uygulamanın bir etkisi görülmediği için sonraki çalışmalarda NaCl konsantrasyonları 20, 40, 60, 80 ve 100 mM olarak belirlenmiş ve kısa süreli uygulama yapılmıştır. Kısa süreli epiBL uygulaması yapılan tohumlar artan konsantrasyonlarda NaCl içeren ½ MS ortamında kültüre alınmıştır. 40, 80 ve 100 mM NaCl konsantrasyonlarına karşı 1 ve 2 µM epiBL uygulaması çimlenme yüzdesini arttırmıştır. Kültürden gelişen 17 günlük bitkilerin boyu, yaş ağırlığı, kuru ağırlığı, yaprak sayısı ve kök gelişimi üzerine farklı tuz konsantrasyonlarına karşı epiBL uygulamasının iyileştirici etkisi belirlenmiştir.

İn vitro sürgün ucu kültürlerinde 2 mg/l K+0.4 mg/l NAA ilaveli MS ortamında sürgünler geliştirilmiş ve akabinde 12 günlük sürgünlere epiBL uygulaması yapıldıktan sonra artan konsantrasyonlarda NaCl içeren MS ortamında kültüre alınmıştır. 30 günlük kültür sonunda, 20 mM NaCl konsantrasyonunda bitki yaş ve kuru ağırlığı üzerine 2 µM epiBL uygulamasının; 100 mM NaCl konsantrasyonunda bitki boyu, bitki yaş ağırlığı ve kök kuru ağırlığı üzerine aynı epiBL uygulamasının etkisi önemli bulunmuştur. 1 µM epiBL uygulaması, 100 mM NaCl stresi altındaki bitkiciklerde klorofil a, klorofil b ve toplam klorofil içeriğini arttırmıştır. Diğer

yandan malondialdehit (MDA) artan NaCl konsantrasyonu ile artmış, 1 µM epiBL uygulaması, lipid peroksidasyon ürünü olan MDA içeriğini azaltmıştır. NaCl stresi altında bitkiciklerin prolin kapsamı genel olarak artmakla birlikte, 40 mM NaCl konsantrasyonunda 1 ve 2 µM epiBL uygulamalarında prolin içeriği önemli oranda azalmıştır. Toplam çözülebilir protein içeriği NaCl stresine bağlı olarak azalmış, 40 mM NaCl konsantrasyonunda 2 µM epiBL uygulaması çözülebilir protein içeriğinde istatistiki önemli artışa neden olmuştur. Antioksidan enzimlerden SOD ve POX aktivitesi NaCl stresi ile artış göstermiştir. SOD aktivitesi, gerek 1 µM epiBL uygulaması (20, 40, 80 mM NaCl) ve gerek 2µM epiBL uygulaması (60 ve 100 mM NaCl) ile daha fazla artış göstermiştir. POX aktivitesi, 60, 80 ve 100 mM NaCl konsantrasyonlarında 1 ve 2 µM epiBL uygulaması ile önemli oranda artmıştır. Bitkilerin bazı gelişimsel ve biyokimyasal parametreleri değerlendirildiğinde, NaCl stresine karşı epiBL uygulamasının, bitkinin tuza toleransını arttırmasındaki önemi görülmektedir.

Bu çalışmada 1 mg/l BAP+1 mg/l 2,4-D ilaveli MS ortamında kotiledon ve hipokotil eksplantlarının kültürü ile kallus üretilmiştir. EpiBL, 80 mg'lık kallus kitlesine uygulanmış, uygulamalı kalluslar alt kültürlerle alınmış ve ayrıca epiBL uygulaması yapılmış eksplantlar kültüre alınmıştır. 30 günlük kültürde kallusların yaş ağırlığı, kuru ağırlığı ve kallus çapı belirlenerek epiBL uygulamasının etkisi araştırılmış ve epiBL'nin tuz stresine karşı olumlu etkisi belirlenmiştir. EpiBL uygulamalı eksplantların kültüründe ise, bazı NaCl konsantrasyonlarında 1 µM epiBL uygulamasının olumlu etkisi görülmüştür.

NaCl stresi altında sürgün rejenerasyonu ve adventif sürgünlerin gelişimleri üzerine epiBL'nin etkisi de değerlendirilmiştir. 2 mg/l BAP ilaveli MS ortamında yapılan epiBL uygulamalı kotiledon eksplantlarından 20, 40 ve 80 mM NaCl stresine karşı 1 µM epiBL uygulamasının, hipokotil eksplantında ise 60 ve 80 mM NaCl stresine karşı 1 µM epiBL uygulamasının rejenerasyon yüzdesi üzerine olumlu etkisi belirlenmiştir. Kotiledon eksplantında sadece 80 mM NaCl konsantrasyonunda 2 µM epiBL uygulamasının eksplant başına düşen sürgün sayısı üzerine olumlu etkisi belirlenmiştir. Hipokotil eksplantlarında ise rejenere sürgün sayısı üzerine 60 mM NaCl stresine karşı 1 µM epiBL uygulaması, sürgün boyu üzerine 100 mM NaCl stresine karşı 1 µM epiBL uygulaması ve sürgündeki yaprak sayısı üzerine 20 mM NaCl stresine karşı 2 µM epiBL uygulamasının olumlu etkisi bulunmuştur.

Bu tez çalışması ile domates in vitro kültürlerinde tuz stresine karşı epiBL'nin etkisi ilk kez çalışılmış ve tuz stresine karşı epiBL'nin olumlu etkisi tespit edilmiştir. Sonuç olarak epiBL'nin tuz stresi altındaki domates bitkisinde tuza toleransı arttırmada önemli rol oynayabileceği yargısına varılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** *Lycopersicon esculentum*, tuz stresi, in vitro kültür, epibrassinolid

## ABSTRACT

### THE EFFECT OF EPIBRASSINOLIDE IN TOMATO IN VITRO CULTURE UNDER SALT STRESS

Emel YILMAZ GÖKDOĞAN

Doctor of Philosophy (Ph.D.)

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Betül BÜRÜN

June 2014, 164 pages

In this thesis study, the effect of 24-epibrassinolide (24-epiBL) against salt stress and the effect of salt stress in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) in vitro culture was investigated. In the scope of thesis, seed germination, shoot tip and callus culture and shoot regeneration studies were conducted. Seeds, shoot tips, cotyledon and hypocotyl explants were used in the in vitro studies. Seeds and explants (shoot tip, cotyledons and hypocotyl) were incubated for varying periods of epiBL solution (exogenous application). NaCl concentrations were 20, 40, 50, 60, 80, 100, 150 mM and epiBL concentrations against NaCl stress were 0.5, 1, 1.5, 2  $\mu$ M.

In seed germination, epiBL application to the seeds prior to culture was performed long-term (24 hours) and short-term (10 seconds). Long-term epiBL applied seeds were cultured on filter paper in petri dishes and they were soaked with a solution containing NaCl in the increasing concentrations (0, 50, 100 and 150 mM NaCl). NaCl concentrations were determined as 20, 40, 60, 80 and 100 mM besides epiBL applications was short-term because the seeds didn't germinate at 150 mM NaCl and the long-term application of epiBL wasn't an effect. Short-term epiBL applied seeds were cultured on  $\frac{1}{2}$  MS containing NaCl in the increasing concentrations. 1 and 2  $\mu$ M epiBL applications against 40, 80 and 100 mM salt concentrations increased the germination percentage. Positive effect of epiBL applications against different salt concentrations was observed on length, fresh weight, dry weight, the leaf number of plants and root growth of 17-day-old plants growing in culture.

In vitro shoot tip culture, shoots developed on MS medium supplemented with 2 mg/l K+0.4 mg/l NAA and 12-day-old shoot after epiBL application were cultured on MS medium containing NaCl in the increasing concentrations. At the end of the

30-day cultures the effect of 2  $\mu$ M epiBL application at 20 mM NaCl concentration was significant on plant fresh and dry weight, the effect of same epiBL application at 100 mM NaCl concentration was significant on plant length, plant fresh weight and dry weight of roots. 1  $\mu$ M epiBL application to plants under 100 mM NaCl stress increased chlorophyll a, chlorophyll b and total chlorophyll content. On the other hand, MDA increased with increasing NaCl concentration, MDA content which was lipid peroxidation product decreased with 1  $\mu$ M epiBL application. While proline content of plantlets under salt stress increased generally, proline content decreased significantly with 1  $\mu$ M and 2  $\mu$ M epiBL application at 40 mM NaCl concentration. Total soluble protein content was reduced due to NaCl stress, 2  $\mu$ M epiBL application under 40 mM salt concentration caused a statistically significant increase in the soluble protein content. The activity of SOD and POX from antioxidant enzymes increased with NaCl stress. The activity of SOD further increased with 1  $\mu$ M epiBL application (20, 40, 80 mM NaCl) and 2  $\mu$ M epiBL application (60 and 100 mM NaCl). The activity of POX increased significantly with 1  $\mu$ M and 2  $\mu$ M epiBL applications under 60, 80 and 100 mM NaCl concentrations. When some developmental and biochemical parameters of plants were evaluated, it was determined that epiBL application against NaCl stress was important to increase salt tolerance of plant.

In the study, callus was produced by culture of cotyledon and hypocotyl explants on MS medium supplemented with 1 mg/l BAP+1 mg/l 2,4-D. EpiBL applied 80 mg of callus mass, epiBL applied calli were subcultured and also the epiBL applied explants were cultured. At 30-day-old culture, the effect of epiBL application was investigated by determining callus fresh weight, callus dry weight and callus diameter and the positive effect of epiBL against salt stress was found. In culture of epiBL applied explants, 1  $\mu$ M epiBL application in some NaCl concentrations yielded a positive effect. As a result, it was determined that epiBL application to callus gave a better response against salt stress than epiBL application to explant in *in vitro* callus cultures.

The effect of epiBL on shoot regeneration and development of adventitious shoots under NaCl stress was evaluated. Positive effect of 1  $\mu$ M epiBL application against 20, 40 and 80 mM NaCl stress in epiBL applied cotyledon explants and 1  $\mu$ M epiBL application against 60 and 80 mM NaCl stress in hypocotyl explants on MS medium supplemented with 2 mg/l BAP on the regeneration percentage was observed. Positive effect of 1  $\mu$ M epiBL application on the number of shoots per explant at the only 80 mM NaCl concentration was determined in cotyledon explants. The positive effects of 1  $\mu$ M epiBL application against 60 mM NaCl stress on the number of regenerated shoots in hypocotyl explants, 1  $\mu$ M epiBL application against 100 mM NaCl stress on shoot length and 2  $\mu$ M epiBL applications against 20 mM NaCl stress on the number of leaves in shoots were found.



In this thesis study, the effects of epiBL against salt stress were studied for the first time in vitro culture of tomato and the positive effect of epiBL against salt stress was determined. As a result it was reached the judgment that epiBL at tomato plant under salt stress might play important role in enhancing salt tolerance.

**Keywords:** *Lycopersicon esculentum*, salt stress, in vitro culture, epibrassinolide

Sevgili Babama ve Aileme.....

## ÖNSÖZ

Doktora tezimin başlangıcından bitimine kadar geçen süreçte desteğini esirgemeyen, yaptığı katkılardan ve yönlendirmelerinden dolayı tez danışmanım Prof. Dr. Betül BÜRÜN'e teşekkürlerimi sunarım.

Tez aşamasının tüm noktalarında yaptıkları katkılardan dolayı Tez İzleme Komitesi üyeleri Prof. Dr. Nedret ŞENGONCA ve Prof. Dr. A. Levent TUNA'ya teşekkür ederim.

Scanning Elektron Mikroskopisi çalışmalarında yardım ve desteklerini esirgemeyen MSKÜ Araştırma Laboratuvarı Merkezi Müdür Yardımcısı Doç. Dr. Selçuk AKTÜRK ve emeği geçen ALM çalışanlarına en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım esnasında Biyokimya Laboratuvarı'nın imkanlarını kullanmamda yardımcı olan Yrd. Doç. Dr. Bekir ÇÖL'e teşekkür ederim.

Doktora tezi kapsamında yaptığım antioksidan enzim aktivitesi çalışmalarında yardımını esirgemeyen Dr. Sultan KÖŞKEROĞLU'na ve Yrd. Doç. Dr. Mahmut YILDIZTEKİN'e, tez çalışmalarımın genelinde yardımcı olan Gizem ALDEMİR'e, çalışmalarımın elde ettiğim tüm verilerimin istatistiksel analizlerinde yardımcı olan Okt. Murat SAKAL ve Arş. Gör. Ş.Serter ÇATAV'a teşekkür ederim.

Son olarak her zaman yanımda olan, maddi ve manevi desteklerini her zaman hissettiğim eşime ve aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Doktora tez çalışması, MSKÜ Bilimsel Araştırmalar Projeleri Koordinatörlüğü'nün 2011/17 nolu projesi ile desteklenmiştir.

## İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	xi
İÇİNDEKİLER.....	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xiv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xviii
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xxi
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
1.1. Amaç ve Kapsam.....	1
1.2. Kaynak Özetleri.....	23
1.2.1. Tuz stresine karşı BR'lerin kullanıldığı in vivo çalışmalar.....	23
1.2.2. Tuz stresine karşı BR'lerin ve diğer bazı kimyasalların kullanıldığı in vitro çalışmalar.....	29
1.2.3. Diğer abiyotik stres faktörlerine karşı BR'lerin kullanıldığı in vivo çalışmalar.....	33
1.2.4. Diğer abiyotik stres faktörlerine karşı BR'lerin kullanıldığı in vitro çalışmalar.....	39
<b>2. MALZEME VE YÖNTEM</b> .....	45
2.1. Bitki Materyali.....	45
2.2. 24-EpiBL'nin Uygulanması.....	46
2.3. Tuz Stresinin Uygulanması.....	47
2.4. Temel Besin Ortamı.....	47
2.5. İn Vitro Kültür Çalışmaları.....	48
2.5.1. Tuz stresine karşı 24-epiBL'nin kullanıldığı in vitro tohum kültürü çalışmaları.....	48
2.5.1.1. Uzun süreli (24 saat) epiBL uygulamalı tohumların kurutma (filtre) kağıdı üzerinde petri kabında çimlendirilmesi.....	48
2.5.1.2. Kısa süreli (10 saniye) epiBL uygulamalı tohumların semi-solid ½ MS ortamında çimlendirilmesi.....	49

2.5.2. Tuz stresine karşı epiBL'nin kullanıldığı in vitro sürgün ucu kültürü çalışmaları.....	49
2.5.2.1. <i>İn vitro sürgün ucu kültüründen elde edilen bitkilere yapılan analizler</i> .....	50
2.5.3. Tuz stresine karşı epiBL'nin kullanıldığı in vitro kallus kültürü çalışmaları.....	53
2.5.3.1. <i>EpiBL'nin kallusa uygulandığı in vitro kültür çalışması</i> .....	53
2.5.3.2. <i>EpiBL'nin eksplantlara uygulandığı in vitro kültür çalışması</i> .....	54
2.5.4. Tuz stresine karşı epiBL'nin kullanıldığı in vitro direk sürgün rejenerasyonu çalışması.....	55
2.6. Verilerin İstatistiksel Analizleri.....	57
<b>3. BULGULAR VE İRDELEME</b> .....	<b>58</b>
3.1. İn Vitro Tohum Kültürü Çalışmalarına Ait Bulgular .....	58
3.1.1. Uzun süreli (24 saat) 1 µM epiBL uygulamalı tohumların kurutma (filtre) kağıdı üzerinde çimlendirme çalışmalarına ait bulgular.....	58
3.1.2. Tohumlara kısa süreli (10 saniye) epiBL uygulama .....	60
3.1.2.1. <i>EpiBL uygulamalı (0-0.5-1-1.5 µM) tohumları 60 mM'a kadar NaCl içeren semi-solid ½ MS ortamında çimlendirme çalışmalarına ait bulgular</i> .....	60
3.1.2.2. <i>EpiBL uygulamalı (0-0.5-1-1.5-2 µM) tohumları 100 mM'a kadar NaCl içeren ½ MS ortamında çimlendirme çalışmalarına ait bulgular</i> .....	67
3.2. İn Vitro Sürgün Ucu Kültürü Çalışmalarına Ait Bulgular .....	84
3.3. İn Vitro Kallus Kültürü Çalışmalarına Ait Bulgular .....	103
3.3.1. EpiBL'nin kallusa uygulandığı in vitro kültür çalışmasına ait bulgular.....	103
3.3.2. EpiBL'nin eksplantlara uygulandığı in vitro kültür çalışmasına ait bulgular.....	116
3.4. İn Vitro Direk Sürgün Rejenerasyonu Çalışmasına Ait Bulgular.....	124
<b>4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER</b> .....	<b>143</b>
<b>KAYNAKLAR</b> .....	<b>146</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ</b> .....	<b>163</b>

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Toprağın elektriksel iletkenliğine göre içerdiği tuz oranı ve bu topraklardaki bitkilerin gelişim durumu.....	2
Çizelge 1.2. Çiçeklerin, ağaçların, sebze ve tarla bitkilerinin tuz toleransı .....	4
Çizelge 1.3. Enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar, fonksiyonları ve lokalizasyonları .....	15
Çizelge 2.1. MS ortamının komponentleri ve konsantrasyonları (mg/l).....	47
Çizelge 3.1. Tuz stresine (0-60 mM) karşı epiBL uygulamasız ve uygulamalı tohumlardan gelişen bitkilerin boyu (cm) .....	63
Çizelge 3.2. Tuz stresine (0-60 mM) karşı epiBL uygulamasız ve uygulamalı tohumlardan gelişen bitkilerin yaş ağırlığı (g).....	64
Çizelge 3.3. Tuz stresine (0-60 mM) karşı epiBL uygulamasız ve uygulamalı tohumlardan gelişen bitkilerin kuru ağırlığı (mg).....	64
Çizelge 3.4. Tuz stresine (0-60 mM) karşı epiBL uygulamasız ve uygulamalı tohumlardan gelişen bitkilerin yaprak sayısı (adet) .....	65
Çizelge 3.5. Tuz stresine (0-60 mM) karşı epiBL uygulamasız ve uygulamalı tohumlardan gelişen bitkilerin kök boyu (cm) .....	66
Çizelge 3.6. Tuz stresine (0-60 mM) karşı epiBL uygulamasız ve uygulamalı tohumlardan gelişen bitkilerin kök yaş ağırlığı (g).....	66
Çizelge 3.7. Tuz stresine (0-60 mM) karşı epiBL uygulamasız ve uygulamalı tohumlardan gelişen bitkilerin kök kuru ağırlığı (mg).....	67
Çizelge 3.8. Tuz stresine (0-100 mM) karşı epiBL uygulamasız ve uygulamalı tohumlardan gelişen bitkilerin boyu (cm).....	74
Çizelge 3.9. Tuz stresine (0-100 mM) karşı epiBL uygulamasız ve uygulamalı tohumlardan gelişen bitkilerin yaş ağırlığı (g).....	75
Çizelge 3.10. Tuz stresine (0-100 mM) karşı epiBL uygulamasız ve uygulamalı tohumlardan gelişen bitkilerin kuru ağırlığı (mg).....	76
Çizelge 3.11. Tuz stresine (0-100 mM) karşı epiBL uygulamasız ve uygulamalı tohumlardan gelişen bitkilerin yaprak sayısı (adet).....	77
Çizelge 3.12. Tuz stresine (0-100 mM) karşı epiBL uygulamasız ve uygulamalı tohumlardan gelişen bitkilerin kök boyu (cm).....	78

Çizelge 3.13. Tuz stresine (0-100 mM) karşı epiBL uygulamasız ve uygulamalı tohumlardan gelişen bitkilerin kök yaş ağırlığı (g).....	79
Çizelge 3.14. Tuz stresine (0-100 mM) karşı epiBL uygulamasız ve uygulamalı tohumlardan gelişen bitkilerin kök kuru ağırlığı (mg).....	79
Çizelge 3.15. Tuz stresine (0-100 mM) karşı epiBL uygulamasız ve uygulamalı tohumlardan gelişen bitkilerin klorofil a içeriği (µg/ml) .....	82
Çizelge 3.16. Tuz stresine (0-100 mM) karşı epiBL uygulamasız ve uygulamalı tohumlardan gelişen bitkilerin klorofil b içeriği (µg/ml) .....	82
Çizelge 3.17. Tuz stresine (0-100 mM) karşı epiBL uygulamasız ve uygulamalı tohumlardan gelişen bitkilerin toplam klorofil içeriği (µg/ml) .....	83
Çizelge 3.18. Tuz stresine (0-100 mM) karşı epiBL uygulamasız ve uygulamalı tohumlardan gelişen bitkilerin karotenoid içeriği (µg/ml) .....	84
Çizelge 3.19. Tuz stresine karşı epiBL uygulamasız ve uygulamalı sürgün uçlarından gelişen 30 günlük bitkilerin boyu (cm).....	87
Çizelge 3.20. Tuz stresine karşı epiBL uygulamasız ve uygulamalı sürgün uçlarından gelişen 30 günlük bitkilerin yaş ağırlığı (g).....	88
Çizelge 3.21. Tuz stresine karşı epiBL uygulamasız ve uygulamalı sürgün uçlarından gelişen 30 günlük bitkilerin kuru ağırlığı (mg).....	89
Çizelge 3.22. Tuz stresine karşı epiBL uygulamasız ve uygulamalı sürgün uçlarından gelişen 30 günlük bitkilerin kök boyu (cm).....	90
Çizelge 3.23. Tuz stresine karşı epiBL uygulamasız ve uygulamalı sürgün uçlarından gelişen 30 günlük bitkilerin kök yaş ağırlığı (g).....	90
Çizelge 3.24. Tuz stresine karşı epiBL uygulamasız ve uygulamalı sürgün uçlarından gelişen 30 günlük bitkilerin kök kuru ağırlığı (mg).....	91
Çizelge 3.25. Tuz stresine karşı epiBL uygulamasız ve uygulamalı sürgün uçlarından gelişen 30 günlük bitkilerin klorofil a içeriği (µg/ml).....	92
Çizelge 3.26. Tuz stresine karşı epiBL uygulamasız ve uygulamalı sürgün uçlarından gelişen 30 günlük bitkilerin klorofil b içeriği (µg/ml).....	93
Çizelge 3.27. Tuz stresine karşı epiBL uygulamasız ve uygulamalı sürgün uçlarından gelişen 30 günlük bitkilerin toplam klorofil içeriği (µg/ml).....	94
Çizelge 3.28. Tuz stresine karşı epiBL uygulamasız ve uygulamalı sürgün uçlarından gelişen 30 günlük bitkilerin karotenoid içeriği (µg/ml).....	95
Çizelge 3.29. Kotiledon eksplantlarından gelişen epiBL uygulamasız ve uygulamalı 30 günlük kallusların yaş ağırlığı (g).....	105

Çizelge 3.30. Hipokotil eksplantlarından gelişen epiBL uygulamasız ve uygulamalı 30 günlük kallusların yaş ağırlığı (g).....	107
Çizelge 3.31. Tuz dozlarına göre kallus yaş ağırlığı üzerine eksplant tipi, epiBL dozları ve eksplant tipi x epiBL dozları interaksyonunun etkisi.....	109
Çizelge 3.32. Kotiledon eksplantlarından gelişen epiBL uygulamasız ve uygulamalı 30 günlük kallusların kuru ağırlığı (mg).....	110
Çizelge 3.33. Hipokotil eksplantlarından gelişen epiBL uygulamasız ve uygulamalı 30 günlük kallusların kuru ağırlığı (mg).....	112
Çizelge 3.34. Tuz dozlarına göre kallus kuru ağırlığı üzerine eksplant tipi, epiBL dozları ve eksplant tipi x epiBL dozları interaksyonunun etkisi.....	112
Çizelge 3.35. Kotiledon eksplantlarından gelişen epiBL uygulamasız ve uygulamalı 30 günlük kallusların çapı (cm).....	114
Çizelge 3.36. Hipokotil eksplantlarından gelişen epiBL uygulamasız ve uygulamalı 30 günlük kallusların çapı (cm).....	115
Çizelge 3.37. Tuz dozlarına göre kallus çapı üzerine eksplant tipi, epiBL dozları ve eksplant tipi x epiBL dozları interaksyonunun etkisi.....	116
Çizelge 3.38. EpiBL uygulamasız ve uygulamalı kotiledon eksplantlarından gelişen 30 günlük kallusların yaş ağırlığı (g).....	119
Çizelge 3.39. EpiBL uygulamasız ve uygulamalı hipokotil eksplantlarından gelişen 30 günlük kallusların yaş ağırlığı (g).....	120
Çizelge 3.40. Tuz dozlarına göre kallus yaş ağırlığı üzerine eksplant tipi, epiBL dozları ve eksplant tipi x epiBL dozları interaksyonunun etkisi.....	121
Çizelge 3.41. EpiBL uygulamasız ve uygulamalı kotiledon eksplantlarından gelişen 30 günlük kallusların kuru ağırlığı (mg).....	122
Çizelge 3.42. EpiBL uygulamasız ve uygulamalı hipokotil eksplantlarından gelişen 30 günlük kallusların kuru ağırlığı (mg).....	123
Çizelge 3.43. Tuz dozlarına göre kallus kuru ağırlığı üzerine eksplant tipi, epiBL dozları ve eksplant tipi x epiBL dozları interaksyonunun etkisi.....	123
Çizelge 3.44. MS ortamında epiBL uygulamasız ve uygulamalı hipokotil eksplantlarından rejenere olan sürgünlerin sayısı (adet/eksplant).....	127



Çizelge 3.45. MS ortamında epiBL uygulamasız ve uygulamalı hipokotil eksplantlarından rejenere olan sürgünlerin boyu (mm).....	127
Çizelge 3.46. MS ortamında epiBL uygulamasız ve uygulamalı hipokotil eksplantlarından rejenere olan sürgünlerin yaprak sayısı (adet).....	128
Çizelge 3.47. Tuz dozlarına göre rejenerasyon yüzdesi üzerine eksplant tipi, epiBL dozları ve eksplant tipi x epiBL dozları interaksiyonunun etkisi .....	135
Çizelge 3.48. BAP ilaveli MS ortamında epiBL uygulamasız ve uygulamalı kotiledon eksplantlarından rejenere olan sürgünlerin sayısı (adet/eksplant).....	136
Çizelge 3.49. BAP ilaveli MS ortamında epiBL uygulamasız ve uygulamalı hipokotil eksplantlarından rejenere olan sürgünlerin sayısı (adet/eksplant).....	137
Çizelge 3.50. Tuz dozlarına göre rejenere sürgün sayısı üzerine eksplant tipi, epiBL dozları ve eksplant tipi x epiBL dozları interaksiyonunun etkisi .....	137
Çizelge 3.51. BAP ilaveli MS ortamında epiBL uygulamasız ve uygulamalı kotiledon eksplantlarından rejenere olan sürgünlerin boyu (mm).....	138
Çizelge 3.52. BAP ilaveli MS ortamında epiBL uygulamasız ve uygulamalı hipokotil eksplantlarından rejenere olan sürgünlerin boyu (mm).....	139
Çizelge 3.53. Tuz dozlarına göre rejenere sürgün boyu üzerine eksplant tipi, epiBL dozları ve eksplant tipi x epiBL dozları interaksiyonunun etkisi .....	139
Çizelge 3.54. BAP ilaveli MS ortamında epiBL uygulamasız ve uygulamalı kotiledon eksplantlarından rejenere olan sürgünlerin yaprak sayısı (adet).....	140
Çizelge 3.55. BAP ilaveli MS ortamında epiBL uygulamasız ve uygulamalı hipokotil eksplantlarından rejenere olan sürgünlerin yaprak sayısı (adet).....	140
Çizelge 3.56. Tuz dozlarına göre rejenere sürgündeki yaprak sayısı üzerine eksplant tipi, epiBL dozları ve eksplant tipi x epiBL dozları interaksiyonunun etkisi .....	141

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Tuz stresine adaptasyonda rol oynayan SOS sinyal iletim yolu ve iyon dengesinin düzenlenmesi.....	7
Şekil 1.2. Prolin biyosentez yolu.....	9
Şekil 1.3. Kolinden glisin betain sentez yolu.....	10
Şekil 1.4. Çeşitli stres faktörlerinin etkisi ile ROT oluşumu ve bunların detoksifikasyonu.....	14
Şekil 1.5. BR'lerin bitki gelişimindeki etkileri.....	17
Şekil 1.6. En biyoktif BR çeşitlerinin kimyasal yapısı.....	18
Şekil 1.7. Erken C6-oksidasyon ve geç C6-oksidasyon yolu ile kampesterolden BL biyosentezi.....	19
Şekil 1.8. BL yokluğunda (A) ve varlığında (B) BR sinyal iletim yolu modeli.....	20
Şekil 2.1. Domates M-28 F <sub>1</sub> çeşidi.....	45
Şekil 2.2. Domates M-28 F <sub>1</sub> çeşidine ait a. tohumlar b. 10 günlük steril fideler c. Steril fidelerin kültüre alınan kotiledon eksplantları d. Steril fidelerin kültüre alınan hipokotil eksplantları.....	46
Şekil 2.3. Pigment içeriği analizi.....	51
Şekil 3.1. Tohumların kurutma kağıdı üzerinde kültüre alınmasından 17 gün sonraki çimlenme durumları.....	59
Şekil 3.2. Tuz stresine karşı epiBL uygulamasız ve uygulamalı tohumların kurutma kağıdı üzerinde çimlenme yüzdeleri.....	60
Şekil 3.3. Tohumların 0-60 mM tuz içeren ½ MS ortamında kültüre alınmasından 17 gün sonra gelişen bitkilerden örnekler.....	61
Şekil 3.4. Tuz stresine (0 ile 60 mM) karşı epiBL uygulamasız ve uygulamalı tohumların ½ MS ortamındaki çimlenme yüzdeleri.....	62
Şekil 3.5. Tohumların 0-100 mM tuz içeren ½ MS ortamında kültüre alınmasından 17 gün sonra gelişen bitkilerden örnekler.....	69-70
Şekil 3.6. Tuz stresine (0 ile 100 mM) karşı epiBL uygulamasız ve uygulamalı tohumların çimlenme yüzdeleri.....	71

Şekil 3.7. Kültüre alınan sürgün uçlarından 30 gün sonra gelişen bitkilerden örnekler.....	85
Şekil 3.8. Tuz stresine karşı epiBL uygulamasız ve uygulamalı sürgün uçlarından gelişen 30 günlük bitkilerin MDA içeriği ( $\mu\text{mol}/\text{yaş ağırlık}$ ).....	96
Şekil 3.9. Tuz stresine karşı epiBL uygulamasız ve uygulamalı sürgün uçlarından gelişen 30 günlük bitkilerin prolin içeriği ( $\mu\text{mol}/\text{g yaş ağırlık}$ ).....	98
Şekil 3.10. Tuz stresine karşı epiBL uygulamasız ve uygulamalı sürgün uçlarından gelişen 30 günlük bitkilerin total protein içeriği ( $\text{mg}/\text{g yaş ağırlık}$ ).....	100
Şekil 3.11. Tuz stresine karşı epiBL uygulamasız ve uygulamalı sürgün uçlarından gelişen 30 günlük bitkilerin SOD enzim aktivitesi (Unit SOD/mg protein).....	101
Şekil 3.12. Tuz stresine karşı epiBL uygulamasız ve uygulamalı sürgün uçlarından gelişen 30 günlük bitkilerin POX enzim aktivitesi ( $\Delta\text{A470}/\text{dak}/\text{mg protein}$ ).....	102
Şekil 3.13. Kotiledon eksplantlarından gelişen epiBL uygulamasız kallusların artan tuz dozlarına göre yaş ağırlığı (g) .....	104
Şekil 3.14. Hipokotil eksplantlarından gelişen epiBL uygulamasız kallusların artan tuz dozlarına göre yaş ağırlığı (g) .....	106
Şekil 3.15. Kotiledon eksplantından gelişen 80 mg'lık kallus kitlelerine epiBL uygulamasından 30 gün sonraki gelişme durumları.....	108
Şekil 3.16. Kotiledon eksplantlarından gelişen epiBL uygulamasız kallusların artan tuz dozlarına göre kuru ağırlığı (mg) .....	110
Şekil 3.17. Hipokotil eksplantlarından gelişen epiBL uygulamasız kallusların artan tuz dozlarına göre kuru ağırlığı (mg) .....	111
Şekil 3.18. Kotiledon eksplantlarından gelişen epiBL uygulamasız kallusların artan tuz dozlarına göre çapı (cm) .....	113
Şekil 3.19. Hipokotil eksplantlarından gelişen epiBL uygulamasız kallusların artan tuz dozlarına göre çapı (cm) .....	114
Şekil 3.20. EpiBL uygulamasız ve uygulamalı hipokotil eksplantlarından 30 gün sonra kallus oluşumları .....	117
Şekil 3.21. Artan tuz dozlarına göre epiBL uygulamasız kotiledon eksplantlarından gelişen kallusların yaş ağırlığı (g).....	118

Şekil 3.22. Artan tuz dozlarına göre epiBL uygulamasız hipokotil eksplantlarından gelişen kallusların yaş ağırlığı (g).....	119
Şekil 3.23. Artan tuz dozlarına göre epiBL uygulamasız kotiledon eksplantlarından gelişen kallusların kuru ağırlığı (mg).....	121
Şekil 3.24. Artan tuz dozlarına göre epiBL uygulamasız hipokotil eksplantlarından gelişen kallusların kuru ağırlığı (mg).....	122
Şekil 3.25. EpiBL uygulamasız ve uygulamalı kotiledon eksplantlarının MS ortamındaki kültürlerinde 30 gün sonraki durumları.....	124
Şekil 3.26. MS ortamında kültüre alınan epiBL uygulamasız ve uygulamalı hipokotil eksplantlarında rejenerasyon yüzdesi (%).....	125
Şekil 3.27. EpiBL uygulamasız ve uygulamalı hipokotil eksplantlarının MS ortamındaki kültürlerinde 30 gün sonraki durumları.....	126
Şekil 3.28. Artan tuz dozlarını içeren MS ortamında kültüre alınan epiBL uygulamasız ve uygulamalı hipokotil eksplantlarında 30 gün sonra gözlenen rejenerasyon safhalarının SEM görüntüsü.....	129
Şekil 3.29. BAP ilaveli MS ortamında kültüre alınan epiBL uygulamasız ve uygulamalı kotiledon eksplantlarında rejenerasyon yüzdesi (%).....	130
Şekil 3.30. EpiBL uygulamasız ve uygulamalı kotiledon eksplantlarının 2 mg/l BAP ilaveli MS ortamında kültürlerinde 30 gün sonraki rejenerasyon durumları.....	131
Şekil 3.31. BAP ilaveli MS ortamında kültüre alınan epiBL uygulamalı hipokotil eksplantlarında rejenerasyon yüzdesi (%).....	133
Şekil 3.32. EpiBL uygulamasız ve uygulamalı hipokotil eksplantlarının 2 mg/l BAP ilaveli MS ortamında kültürlerinde 30 gün sonraki rejenerasyon durumları.....	134
Şekil 3.33. Artan tuz dozlarını ve BAP'ı içeren MS ortamında kültüre alınan epiBL uygulamasız ve uygulamalı hipokotil eksplantlarında 30 gün sonra rejenerasyon safhalarının SEM görüntüsü.....	142

## SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

°	Derece
°C	Santigrat derece
%	Yüzde
cm	Santimetre
g	Gram
kg	Kilogram
m	Metre
mm	Milimetre
µm	Mikrometre
l	Litre
ml	Mililitre
M	Molar
mM	Milimolar
µM	Mikromolar
Ca	Kalsiyum
K	Potasyum
Mg	Magnezyum
Na	Sodyum
Cl	Klor
P	Fosfor
Cu	Bakır
Fe	Demir
Mn	Mangan
Zn	Çinko
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hidrojen peroksit
O <sub>2</sub> <sup>·-</sup>	Süperoksit radikali
<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	Singlet oksijen
OH <sup>·</sup>	Hidroksil radikali
EC	Electrical conductivity
MDA	Malondialdehit
SOD	Süperoksit dismutaz
APX	Askorbat Peroksidaz
POX	Peroksidaz
CAT	Katalaz

GR	Glutatyon Redüktaz
ROT	Reaktif Oksijen Türleri
NADPH	Nikotinamid dinükleotid fosfat
ATP	Adenozintrifosfat
RNA	Ribonükleik asit
DNA	Deoksiribonükleik asit
TCA	Trikloroasetik asit
TBA	Tiobarbitürik asit
BSA	Bovine Serum Albümin
EDTA	Etilen Diamin Tetraasetik Asit
NBT	p-nitro blue tetrazolium klorü
MS	Murashige-Skoog

# 1. GİRİŞ

## 1.1. Amaç ve Kapsam

Bitkiler, yaşamlarını sürdürdükleri alanlarda gelişimlerini kısıtlayan çeşitli olumsuz koşullara maruz kalmaktadır. Büyüme, gelişme ve metabolik pek çok olayı etkileyen veya engelleyen bu faktörlere **stres** adı verilmektedir (Gürel ve Avcıoğlu, 2004). Stres faktörleri biyotik (patojen canlılar, parazit canlılar, diğer organizmalarla rekabet vb.) ve abiyotik (kuraklık, tuzluluk, radyasyon, yüksek sıcaklık, don, ağır metaller, herbisitler, rüzgar, topraktaki mineral yetersizliği vb.) olmak üzere iki tiptir (Kalefetoğlu ve Ekmekçi, 2005; Mahajan ve Tuteja, 2005; Yılmaz vd., 2011; Çulha ve Çakırlar, 2011). Abiyotik stres faktörlerinden kuraklık %26, mineral stresi %20, soğuk ve don stresi %15, diğer tüm stres faktörleri ise %29 paya sahip olup sadece %10' luk bir alan herhangi bir stres faktöründen etkilenmemektedir (Kalefetoğlu ve Ekmekçi, 2005). Mineral stresinin çoğunu tuzluluk oluşturmaktadır ve dünyada tuzluluk tehdidi altında milyonlarca hektar alan bulunmaktadır (Çulha ve Çakırlar, 2011). **Tuzluluk**, kurak ve yarı kurak iklim bölgelerinde, yeraltı sularına karışan çözünebilir tuzların, kapillarite yoluyla yüksek taban suyu ile birlikte toprak yüzeyine çıkması ve buharlaşma sonucu toprak yüzeyinde veya yüzeye yakın bölümde birikimidir (Ekmekçi vd., 2005; Öz ve Karasu, 2007; Dölerslan ve Gül, 2012). Tuzluluk oluşum sebeplerine göre, primer ve sekonder tuzluluk olmak üzere iki gruba ayrılabilir. Primer tuzluluğun oluşma nedenlerini; ana kayaçların ayrışması, okyanuslar ve iklimsel etmenler oluşturmaktadır. Sekonder tuzluluğun oluşumu ise, tarımsal alanlardaki yoğun ve bilinçsiz sulama, aşırı otlatma, doğal vejetasyonun yok edilmesi ve toprakların çeşitli kimyasallarla kirletilmesinden kaynaklanmaktadır (Çulha ve Çakırlar, 2011).

Dünya genelinde 800 milyon hektarın üzerinde karasal alan tuzluluktan ve alkalilikten etkilenmekte olup bu da toplam karasal alanların %6'sından fazlasına tekabül etmektedir. Türkiye şartlarında ise, drenaj problemi olan toprakların yarıdan fazlası ile 1.5 milyon hektar arazi tuz ve/veya alkalilik sorunu ile karşı karşıyadır. 599 bin hektar alan hafif tuzlu, 508 bin hektar alan tuzlu, 15 bin hektar alan alkali, 127 bin hektar alan hafif tuzlu-alkali, 268 bin hektar alan tuzlu-alkali kabul edilmektedir (Yıldız vd., 2010).

Toprak tuzluluğu, doymuş toprak çözeltisinin elektriksel iletkenliği (EC= Electrical Conductivity) ile bağlantılıdır (Dölarıslan ve Gül, 2012). Suyun veya toprak çözeltisinin iletkenliği içerdiği çözünmüş iyonlara bağlı olarak değişmektedir (Taiz ve Zaiger, 2008). Tuzluluk, bitkinin kök zonundan alınan doymuş toprak ekstraktının elektriksel iletkenliği ile ölçülmektedir ve birimi dS/m (desiSiemens/metre)'dir (Shannon ve Grieve, 1999). Çizelge 1.1.'de toprak elektriksel iletkenliğine göre topraktaki tuz oranı ve bu topraklarda gelişim gösteren bitkilerin durumunu göstermektedir.

**Çizelge 1.1. Toprağın elektriksel iletkenliğine göre içerdiği tuz oranı ve bu topraklardaki bitkilerin gelişim durumu (Dölarıslan ve Gül, 2012)**

<b>İletkenlik (dS/m)</b>	<b>Tuz oranı</b>	<b>Bitki durumu</b>
0-2	düşük	Tüm bitkiler çok az zarar görür.
2-4	orta	Hassas bitkiler zarar görebilir.
4-8	yüksek	Hassas çoğu bitki zarar görür, tuza dayanıklı bitkiler az zarar görür.
8-16	aşırı	Tuza dayanıklı bitkiler gelişir, çoğu bitki ciddi zarar görür.
>16	çok aşırı	Çok az bitki türü dayanır ve gelişir.

Tuzluluk, hem tarımsal üretimin yapıldığı toprakların verimliliğini olumsuz etkilemekte hem de ürün verimi ve kalitesini sınırlandırmaktadır (Yaşar vd., 2008). Bitkilerin büyüme, gelişme ve verimliliğinin yanı sıra bitki canlılığını da etkilemektedir (Miyama ve Hanagata, 2007). Tuzluluğun toprak üzerindeki en büyük etkileri, toprak çözeltisinin düşük ozmotik potansiyele sahip olması (ozmotik stres) ve spesifik iyon dengesizliğinin baş göstermesidir. Ozmotik stres, Na iyonlarının direk bir etkisi olmaksızın topraklardaki su eksikliğinden kaynaklanmaktadır. İyonik dengesizlik, aşırı miktarda Na<sup>+</sup> ve Cl<sup>-</sup> birikiminden kaynaklanmakta ve bu birikim,



$K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  ve  $NO_3^-$  gibi yararlı besin elementlerinin toprakta bulunuşunu ve bitki tarafından alımını azaltmaktadır (Yıldız vd., 2010). Çünkü, tuz bitkide kökten sürgüne hareket etmekte ve bu hareket, bitkideki su içeriğini sağlayan transpirasyonel akış ile meydana gelmektedir (Hasegawa vd., 2000). Tuz stresinin bitkiler üzerindeki etkileri, bitkinin çeşidine, maruz kalınan tuz çeşidi ile miktarına ve tuza maruz kalma süresine bağlı olarak değişmektedir. Bitkilerin genotipik farklılıkları da tuz stresine farklı cevapların verilmesine neden olmaktadır (Çulha ve Çakırlar, 2011; Dölarslan ve Gül, 2012).

Tuz stresi, bitkinin topraktan su alımını, solunumunu ve terlemesini etkilemektedir. Tuz stresi ile, bitki kök gelişiminin yavaşlaması ve fotosentezin azalmasının yanında, nitrat alımının düşmesine bağlı olarak protein sentezinin azalması sonucu bitki boyunda kısalma, bitkilerin yaş ve kuru ağırlığında azalma gözlenmektedir (Dölarslan ve Gül, 2012). Tuz stresi, hücre uzamasını ve bölünmesini dolayısı ile mitotik aktiviteyi etkilemektedir. Böylelikle bitkilerin yaprak sayısı azalmakta, yaprakta küçülme ve incelme gözlenmektedir. Ayrıca kütikula tabakasında incelme ile vasküler doku farklılaşması ve gelişiminde azalma meydana gelmektedir. Reprodüktif dönemin etkilenmesine bağlı olarak çiçeklenme zamanı değişmekte, çiçek sayısı ve tohum üretiminde azalma gözlenmektedir (Çulha ve Çakırlar, 2011). Tuz stresi ozmotik etkisi ile büyüme oranının azalmasına, yaprak renginin ve kök/sürgün oranı gibi gelişimsel özelliklerin değişimine neden olmaktadır (Shannon ve Grieve, 1999). Tuzluluk, plazma membranı permeabilitesinde, membran yapı ve kompozisyonunda, sitoplazmik viskozite ve sitoplazmik akımda değişikliklere neden olmaktadır (Mansour ve Salama, 2004). Tuz stresinin büyüme, gelişme ve üretkenliğin yanında fotosentez, fotosentetik pigmentler ile proteinler, iyon düzeyleri, antioksidan enzimler ile antioksidanlar, nitrojen ve malat metabolizması üzerine de çeşitli etkileri bulunmaktadır (Parida ve Das, 2005).

Tuz stresinin etkilerine karşı bitkiler çeşitli yanıtlar vermektedirler. Çok yüksek konsantrasyonlarda çeşitli çözülebilir tuzları içeren ortamlarda bitkilerin büyüme ve yaşamlarını tamamlayabilme yeteneklerine **tuz toleransı** denmektedir. Yüksek tuz konsantrasyonlarına yanıt vermede bitkiler iki gruba ayrılmaktadırlar. **Halofitler**, tuzlu topraklara adapte olmuş ve bu alanlarda tüm yaşam döngülerini

tamamlayabilen bitkilerdir. **Glikofitler** ise, tuza duyarlı olan ve yüksek tuz konsantrasyonlarına sahip topraklarda yaşamlarını sürdüremeyen bitkilerdir (Taiz ve Zaiger, 2008). Bataklık bitkisi olan *Sueda maritima*, tuz çalısı olarak bilinen *Atriplex nummularia* ve *Salicornia herbacea* halofit bitkilerdir. Kültür bitkileri arasında ise mısır, soğan, limon, marul, fasulye, ceviz, fındık tuza çok duyarlıdır; arpa, pamuk ve domates orta derecede toleranslı; şeker pancarı yüksek toleranslıdır (Gürel ve Avcioğlu, 2004; Ekmekçi vd., 2005; Taiz ve Zaiger, 2008). Çiçeklerden ise sardunya ve zambak hassas; karanfil ve krizantem orta toleranslı; gül yüksek toleranslıdır. Ağaçlardan kayın, fındık, akçaağaç tuza çok duyarlı; alıç, ıhlamur, meşe, çınar, ceviz orta derecede toleranslı; dişbudak, kavak, karaçam ve söğüt yüksek toleranslıdır. Sebzelere ve tarla bitkilerinden fasulye, çilek, marul hassas; havuç, bezelye, turp, kabak, patates, tütün, ıspanak, karnabahar, pırasa orta derecede toleranslı; pancar, kolza, arpa yüksek toleranslıdır (Çizelge 1.2.), (Dölarslan ve Gül, 2012).

**Çizelge 1.2. Çiçeklerin, ağaçların, sebze ve tarla bitkilerinin tuz toleransı (Dölarslan ve Gül, 2012)**

Hassas EC<2 dS/m	Orta derecede toleranslı EC=2-3 dS/m	Yüksek toleranslı EC=3-4 dS/m
<b>Çiçeklerin tuz toleransı</b>		
Sardunya	Karanfil	Gül
Zambak	Krizantem	
Gerdenya		
<b>Ağaçların tuz toleransı</b>		
Kayın	Alıç	Dişbudak
Fındık	ıhlamur	Kavak
Akçaağaç	Manolya	Karaçam
	Meşe	Söğüt
	Çınar	
	Ceviz	
<b>Sebze ve tarla bitkilerinin tuz toleransı</b>		
Fasulye	Havuç	Şeker pancarı
Çilek	Kabak	Kolza
Marul	Patates	Buğday
Mısır	Tütün	Arpa
Soğan	Pırasa	
Limon	Karnabahar	
	Domates	
	Kereviz	
	ıspanak	
	Çavdar	

Tuz toleransı, tuz stresine dayanıklılığın bir göstergesidir ve tuz stresinin etkisine karşı bitkiler çeşitli fiziksel, biyokimyasal ve moleküler mekanizmaları devreye sokmaktadırlar. Biyokimyasal stratejileri aşağıdaki gibi sıralamak mümkündür (Parida ve Das, 2005)

- İyonların seçici biriktirilmesi veya hariç tutulması
- Kökler tarafından iyon alımının kontrolü ve yapraklara taşınması
- Hücresel ve tüm bitki düzeyinde iyonların kompartmanlaşması
- Uygun çözünen maddelerin (ozmolitlerin) sentezi
- Fotosentetik yolun değişmesi
- Membran yapısının değişimi
- Antioksidanların ve antioksidatif enzimlerin indüksiyonu
- Bitki hormonlarının indüksiyonu.

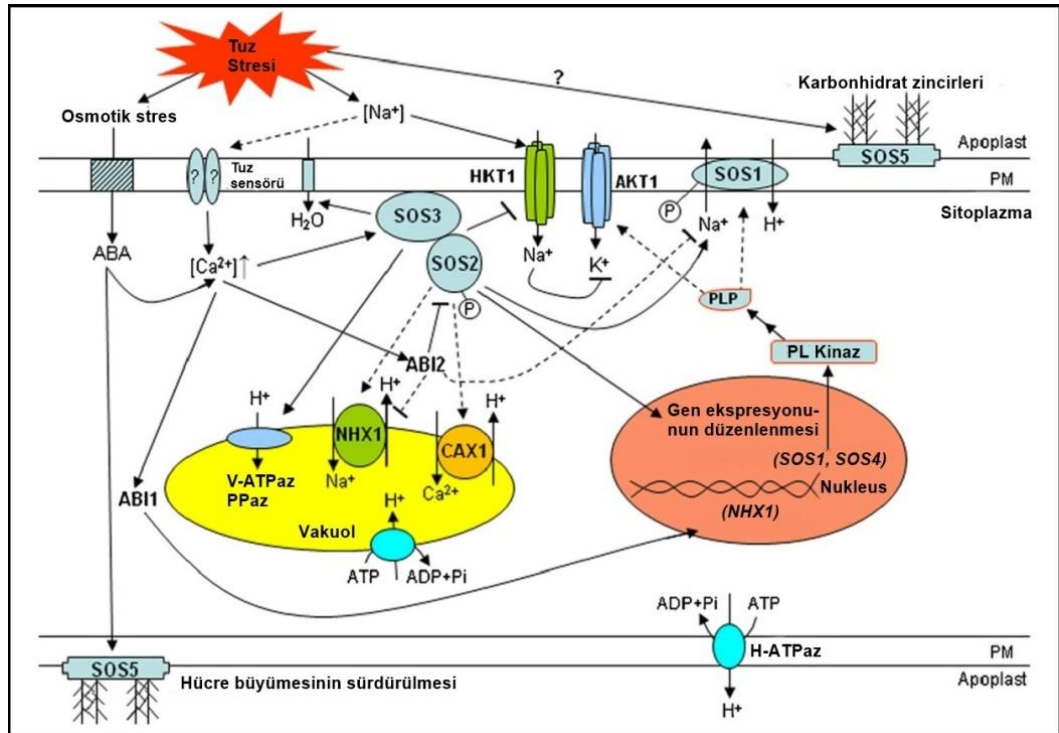
Tuzluluğun spesifik etkilerine karşı gösterilen tolerans mekanizmaları, tuzun bitki bünyesine girişini azaltmak ve sitoplazmada tuz konsantrasyonunu dengelemektir (Mugdal vd., 2010). Bu bağlamda doğal floraları Haliç ve Tuzla gibi tuzcul alanlar olan halofitler, çok özel anatomik ve morfolojik adaptasyonlar veya sakınma mekanizmaları nedeni ile ekstrem tuzluluğa uyum sağlama kapasitesine sahiptirler (Yokoi vd., 2002). Dolayısı ile halofitler, hücresel ve dokusal düzeylerde tuz stresine en iyi şekilde yanıt vermektedirler. Bazı halofitler dokudaki fazla tuzu bünyeden atmak veya toksik etkisini azaltmak için tuz bezlerine ve sukkulent dokulara sahiptirler (Munns ve Tester, 2008). Ayrıca, optimal büyümelerini gerçekleştirmek için etkin su kullanım stratejilerine de sahiptirler. Halofitler, düşük dış su potansiyellerine karşı suyun bitki bünyesine geçişini sağlamak için hücre vakuollerine  $Cl^-$  ve diğer anyonlarla dengeli şekilde  $Na^+$ 'un hücre vakuollerine kontrollü alımını yapmaktadırlar. Böylelikle, halofit hücrelerin sitoplazmalarına  $Na^+$ 'un girişi fazla olmasına karşın sitoplazmada  $Na^+$  konsantrasyonu toksik olmayan düzeylerde kalmaktadır. Bunun yanı sıra halofitler,  $NaCl$  geçirgenliğini azaltmak için glikofit tonoplastlarından farklı zar kompozisyonu sergilemektedirler ve daha yüksek doymuş yağ asiti içeriği ile düşük protein içeriğine sahip olmaktadır. Halofitler, tuza adaptasyon mekanizmalarında zar kanalları ve taşıyıcıların (özellikle kök ve yaprakların P-tipi  $H^+$ -ATPaz'ları) sentez ve aktivitelerinde

değişiklikler gözlenmektedir (Glenn vd., 1999). Vakuollerde biriktirilen  $\text{Na}^+$  ve  $\text{Cl}^-$ 'un ozmotik potansiyellerini dengelemek için halofitler hücresel düzeyde organik çözünenlerin (ozmolitler) birikimine gereksinim duymaktadırlar. Şekerler (sükroz), şeker alkolleri (sorbitol), aminoasitler (prolin), metillenmiş prolin bileşikleri (metil prolin), betainler (glisin betain), metillenmiş sülfonyo bileşikleri (DMSP; dimetil sülfonyo proprionat) gibi pek çok molekül halofitlerin hücre sitoplazmalarında biriktirilmektedir (Flowers ve Colmer, 2008).

Etkinliği halofitler kadar olmasa da glikofitler de tuz stresine karşı benzer adaptasyon mekanizmalarını devreye sokmaktadırlar. Bitkiler tuz stresine maruz kaldıkları durumlarda,  $\text{K}^+$  ve  $\text{Na}^+$  dengesini kurmaları gerekmektedir ve iyon taşınımını yeniden düzenlemektedirler.  $\text{Na}^+$  hücrelere girerek birikimi toksik seviyelere ulaştığında kök hücreleri tarafından  $\text{K}^+$  alımı engellenmektedir (Büyük vd., 2012). Diğer taraftan sitoplazmada  $\text{Na}^+$  ve diğer iyonların yüksek konsantrasyonları sitozolik enzimlerin çalışmasını engeller (Taiz ve Zaiger, 2008). Su dengesini devam ettirmek, büyüme gerilemesinin ve hücre ölümlerinin azaltılması için bitkiler tarafından fazla  $\text{Na}^+$  ve diğer iyonları glikofitik yanıt olarak hariç tutmakta veya halofitik yanıt olarak ise biriktirmektedirler. Çoğu bitki tuzlu şartlar altında  $\text{Na}^+$ 'un bir kısmını köklerinde biriktirirler ve sürgünlerinden dışarı atmaktadırlar. Tersine bazı türler,  $\text{Na}^+$ 'u yüksek konsantrasyonlarda sürgünlerinde biriktirmektedirler. Çünkü, iyon kanalları yoluyla bitki hücresi sitoplazmasına pasif  $\text{Na}^+$  hareketi mevcuttur ve tonoplasttaki ve hücre membranındaki proton pompaları ve antiportörlerin düzenli çalışmaları sonucunda iyon dengesi sağlanmaya çalışılmaktadır (Ashraf, 2004).

İyon dengesinin ve tuz toleransının kontrolünde etkin rol oynayan SOS (Salt Overly Sensitive) stres sinyal iletim yolu ve bunun komponentleri (SOS1, SOS2 ve SOS3) ortaya çıkarılmıştır. SOS sinyal iletim yolu  $\text{Na}^+$  ve  $\text{K}^+$  dengesini sağlamaktadır ve  $\text{Ca}^{2+}$ , aktive edilmektedir (Yokoi vd., 2002), (Şekil 1.1.). SOS3, tuz toleransı için ve tuz stresi ile indüklenen  $\text{Ca}^{2+}$  sinyalini gerçekleştirilmede temel olan bir  $\text{Ca}^{2+}$  sensörüdür ve SOS3 geni bir  $\text{Ca}^{2+}$  bağlayıcı proteini kodlamaktadır (Chinnusamy vd., 2004). SOS3 tarafından kodlanan bu miristole edilmiş kalsiyum bağlayıcı protein, tuzun neden olduğu kalsiyum sinyalini algılamakta ve bunu diğer alt

yanıtlara dönüştürmektedir (Zhu, 2002). SOS3, bir serin/treonin protein kinaz olan SOS2 ile etkileşime girmekte ve bunu aktive etmektedir. SOS2 ve SOS3, bir plazma zarı  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiportörünü kodlayan tuz toleransı efektör geni olan *SOS1*'in ekspresyon seviyelerini düzenlemektedir (Sairam ve Tyagi, 2004). Böylelikle SOS sinyal yolunun bu basamağı ile hücresel iyon dengesi yeniden düzenlenmiş olmaktadır. Son yıllarda SOS4 ve SOS5 komponentleri karakterize edilmiştir. SOS4, B6 vitaminin aktif formu olan piridoksal-5-fosfatın biyosentezinde gerekli olan piridoksal kinazı kodlamaktadır. SOS5, normal hücre uzaması için gerekli olan bir hücre yüzeyi adezyon proteinidir. Tuz stresi altında bitki hücresinin normal büyümesi ve uzaması daha önemli hale gelmekte ve SOS5, hücre duvarı yapı ve bütünlüğünün devamını sağlamaktadır (Mahajan vd., 2008).



Şekil 1.1. Tuz stresine adaptasyonda rol oynayan SOS sinyal iletim yolu ve iyon dengesinin düzenlenmesi (Türkan ve Demiral, 2009)

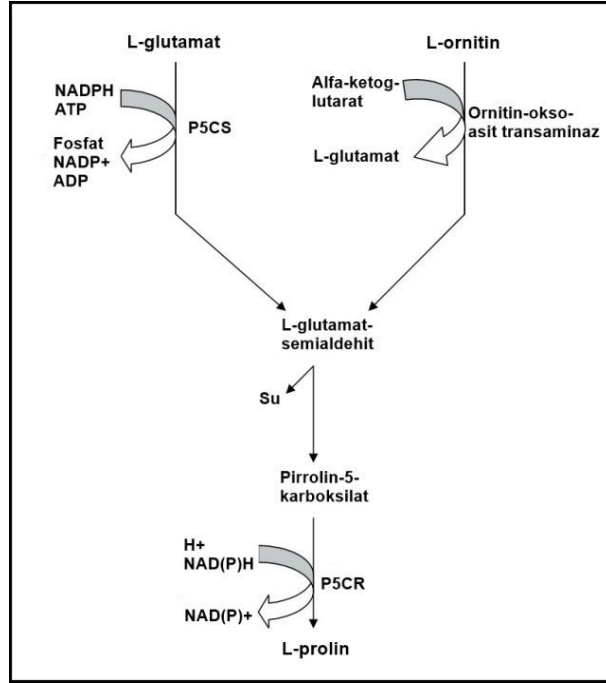
SOS sinyal iletiminin yanı sıra pek çok kimyasal, bitki büyüme ve gelişiminde kritik rol oynamakta ve biyokimyasal reaksiyonları, çeşitli transportörler/pompaları ve gen ifadesi mekanizmasını düzenleyerek, çeşitli stres sinyallerini başlatarak ve stres yanıtlarını kontrol ederek toleransta önemli rol oynamaktadırlar. Bu kimyasallar, kalsiyum, siklik nükleotitler, polifosfoinositler, nitrik oksit, şekerler,

absisik asit, jasmonatlar, salisilik asit ve poliaminleri içermektedirler. Kalsiyum, sinyal transdüksiyon yollarında çok önemli sekonder mesajcılardan biridir. cAMP ve cGMP hücreyi iyon toksisitesinden korumaktadır. Fosfoinositler, plazma membranı boyunca ve hücre içinde sinyalin iletiminde gereklidir. Nitrik oksitler, çeşitli savunma genlerini aktive etmekte ve bitkilerde gelişim düzenleyicisi olarak rol oynamaktadır. Şekerler, fotosentez, glikoliz, nitrojen metabolizması, sükröz ve nişasta metabolizmasında gerekli pek çok genin ifadesini etkilemektedir. Absisik asit, jasmonat, salisik asit ve poliaminler, çoğu stres yanıtında gereklidirler. Bu kimyasal sinyal yolları, stres yanıtında gereklidir ve bunlar arasındaki etkileşimler bulunmaktadır (Tuteja ve Sopory, 2008). Bunun yanı sıra, çeşitli mitojen aktive edilmiş protein kinazların (MAPK, MAPKK, MAPKKK) rol oynadığı sinyal iletimi tuz ve diğer abiyotik stres yanıtında, hücre bölünmesi ve farklılaşmasında etkin rol oynamaktadırlar (Kaur ve Gupta, 2005; Sinha vd., 2011).

Bitkilerde tuz stresine karşı verilen cevaplardan biri de ozmolitler (düşük molekül ağırlıklı çözünen maddeler) ile sıcaklık şoku (Heatschock) proteinleri ve LEA (Late embryogenesis abundant: geç embriyogeneze bağımlı) proteinleri gibi koruyucu moleküllerin sentezidir (Büyük vd., 2012). Ozmolitler arasında, amino asitler ve özellikle prolin, kuaterner amonyum bileşikler, poliaminler, polioller (şeker alkoller), çözülebilir şekerler ve çözülebilir proteinler bulunmaktadır (Yokoi, 2002). Ozmolitler, hem hücre yapısını korumakta hem de serbest radikal temizleyicisi olarak rol oynamaktadır ve ozmoprotektanlar (ozmotik koruyucular) olarak bilinmektedir (Chinnusamy vd., 2005).

Amino asitler, tuzluluk stresi altındaki bitkilerde biriktirilmektedir. Önemli amino asitler arasında alanin, arjinin, glisin, serin, lözin ve valin; imino asitler arasında prolin ve protein olmayan amino asitler arasında sitrullin ve ornitin yer almaktadır. Glutamin ve asparajin gibi amidler, tuz stresine maruz kalan bitkilerde biriktirilmektedir (Ashraf ve Haris, 2004). Diğer amino asitlere göre stres şartlarında daha fazla biriktirilen prolinin, bakterilerden yüksek bitkilere kadar pek çok farklı organizmada su eksikliği ve yüksek tuzluluğun etkilerine karşı canlılığın sürdürülmesinde etkin olduğu bilinmektedir. İyileşme sürecinde prolin, yararlanılacak organik azot kaynaklarını oluşturmaktadır. Prolin, glutamat veya

ornitinden sentezlenmektedir ve glutamat, ozmotik stres altındaki hücrelerde birincil haberci molekül olarak rol oynamaktadır. Prolinin biyosentez yolunda pirrolin karboksilik asit sentaz ve pirrolin karboksilik asit redüktaz enzimleri görev almaktadır (Sairam ve Tyagi, 2004), (Şekil 1.2.).

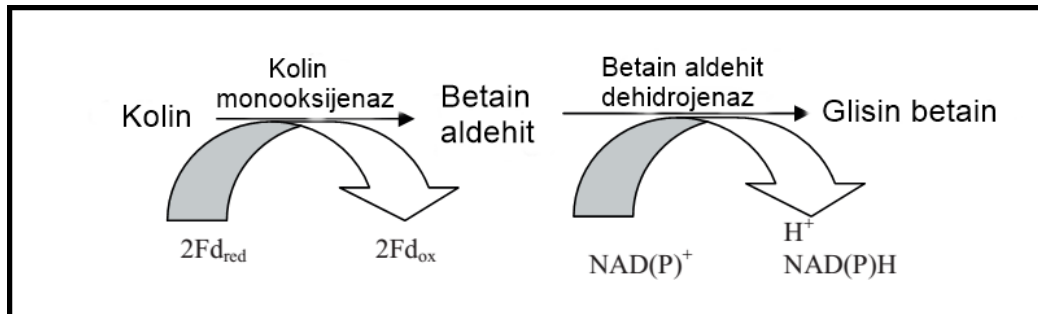


Şekil 1.2. Prolin biyosentez yolu (Parvaiz ve Satyawati, 2008)

Prolin birikimi, degradasyonunun azalması veya sentezinin artmasından dolayıdır. Prolin sentezi plastitler ve sitoplazmada olurken, degradasyonu ise mitokondride glutamata dönüştürülerek yapılmaktadır (Türkan ve Demiral, 2009). Prolin, hücrede sentezlenen proteinlerin yapısına katıldığından dolayı embriyo gelişiminden reproduktif döneme kadar bitki gelişiminde etkin rol oynamaktadır. Prolin, hücre genişlemesi, polen gelişimi, polen tübü gelişimi, sinyal iletimi ve çeşitli genlerin ekspresyonlarının düzenlenmesi gibi pek çok fizyolojik ve moleküler süreçte de gereklidirler (Trovato vd., 2008). Yüksek tuzluluk ile diğer abiyotik ve biyotik stres faktörleri altında prolin birikimi artmaktadır (Ashraf ve Foolad, 2007; Verbruggen ve Hermans, 2008; Szabadoz ve Savoure, 2009). Kuraklık ve tuz stresi altında artan prolin birikimi toleransın geliştirilmesi ile ilişkilidir ve serbest prolin, ozmoprotektan, protein stabilizatörü, metal şelatörü, lipid peroksidasyonu inhibitörü ve çeşitli radikalleri temizleyici olarak rol oynamaktadır (Gill ve Tuteja, 2010).

Ozmotik olarak oldukça aktif olan prolin, NaCl etkisi ile hücre membranındaki bozulmaları azaltarak membran stabilizasyonunu sağlamaktadır (Parvaiz ve Satyawati, 2008).

En iyi bilinen ozmolitlerden bir diğeri, kuaterner amonyum bileşiği olan glisin betain olup bu bileşik kolin monooksijenaz ve betain aldehit dehidrojenaz enzimlerinin katalizörlüğünde betain aldehit yoluyla kolinden sentezlenmektedir (Flowers vd., 1997), (Şekil 1.3.). Bileşik, tuz stresi altındaki bitkilerde ozmotik dengelemede ve ozmoproteksiyonda rol oynamaktadır. Glisin betainin varlığı, ürün veren bitkilerden arpada tespit edilmiştir (Flowers vd., 1997). Ayrıca, *Chenopodiaceae* ve *Poaceae* familyasının pek çok türünde sentezlenmektedir. Ancak, tütün, domates, patates ve çeltik gibi bazı bitkilerde sentezi yapılmamaktadır (Yeo, 1998). Glisin betain, artan dışsal ozmotik potansiyeli dengeleyerek hücrelerin ozmotik potansiyellerini arttırmakta, membran ve hücrel yapıların korunmasını sağlamaktadır (Holmberg ve Bülow, 1998). Diğer kuaterner amonyum bileşikleri  $\beta$ -alanin betain, prolin betain, kolin *O*-sülfat, hidroksi prolin betain ve pipekolat betaindir. Pek çok bitki türünde bu bileşikler ile yaprak ozmotik potansiyeli arasında pozitif bir ilişki söz konusudur. Glisin betain kloroplastlarda bulunmakta olup; kloroplast ile tilakoid membranlarının yapısının korunmasında ve böylelikle fotosentetik etkinliğin devamında hayatsal rol oynamaktadırlar. Glisin betain, tuz stresi altında fotosistem II proteinlerinin stabilizasyonunu sağlayarak fotosistem II kompleksini korumaktadır (Ashraf ve Harris, 2004). Ayrıca, rubisco gibi enzimlerin ve membranların stabilizasyonunu gerçekleştirmede koruyucu rolleri bulunmaktadır (Türkan ve Demiral, 2009).



Şekil 1.3. Kolinden glisin betain sentez yolu (Parvaiz ve Satyawati, 2008)



Poliaminler, iki veya daha fazla amino grubunu içeren polivalent bileşiklerdir. Yüksek bitkilerde poliaminler yaygın olup putresin, spermidin ve spermin örnekleridir. Diaminler bitkilerde daha az yaygındır, örnek olarak diaminoprapan ve kadaverin verilebilir. Biyolojik rollerine göre poliaminleri iki gruba ayırmak mümkündür. Bunlardan 1. grup putresin ile kadaverini içerir ve hücre uzaması, kök oluşumu gibi oksin ve gibberellin benzeri fonksiyonlar sergilemektedirler. 2. grup spermidin ve spermini içerir ve sitokinler gibi hücre bölünmesi, organogenezis ve senesens olaylarını düzenlemektedirler. Hücrelerde, nötral pH'da poliaminler, DNA, RNA ve fosfolipit gibi polianyonlara bağlanırlar ve böylelikle bu makromoleküllerin stabilizasyonunu sağlamaktadırlar. Poliaminler, membran yapısının korunmasında ve ozmotik dengenin sağlanmasında görev almaktadırlar (Ashraf ve Harris, 2004).

Polihidrik alkoller olan polioller, ozmoregülasyonda (ozmotik düzenlemede) ve serbest radikallerin temizlenmesinde gereklidirler ve bitki tuz toleransında önemli role sahiptirler. Asiklik polioller; mannitol, gliserol ve sorbitoldur; siklik polioller ise ononitol ve pinitoldur. Genel olarak polioller, vakuolde biriktirilmiş inorganik iyonların yüksek konsantrasyonları tarafından meydana gelen ozmotik dengesizliği yok etmek için hücre sitoplazmasında biriktirilmektedirler (Ashraf ve Harris, 2004).

Şekerler, tuzlu şartlara maruz kalan glikofitlerde total ozmotik potansiyelin %50'sinden fazlasını oluşturmaktadırlar. Bitkilerde net CO<sub>2</sub> asimilasyon oranında önemli düşüşler olmasına karşın tuzluluk veya kuraklığa yanıtta çözülebilir karbonhidrat birikimi gözlenmektedir (Ashraf ve Harris, 2004). Şekerler (glukoz, fruktoz, sükröz, fruktanlar) ve nişasta gibi karbonhidratlar, tuz stresi altında ozmoproteksiyon, ozmoregülasyon, karbon dengeleme ve radikal temizlenmesi için biriktirilmektedir. Bir disakkarit olan treholaz, çeşitli abiyotik stres faktörleri altında biriktirilmektedir ve denatüre olmuş proteinlerin kümelenmesinin engellenmesinde ve su eksikliğinin gözlemlendiği hücrelerde membran ve proteinlerin korunmasında rol oynamaktadır. Aynı zamanda apoplastik hücre ölümleri üzerinde baskılayıcı etkilere de sahiptir (Parvaiz ve Satyavati, 2008).

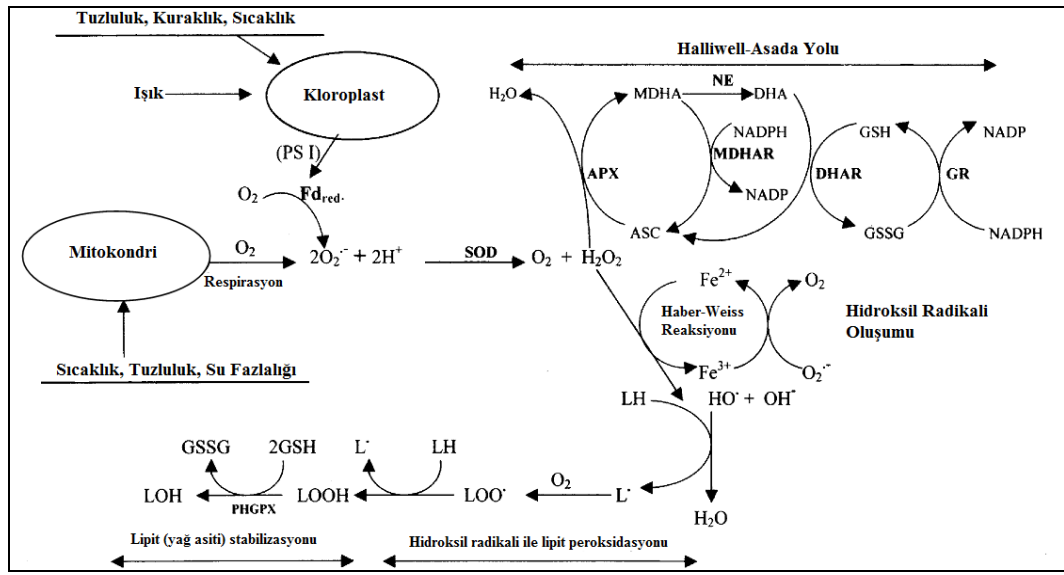
Tuzlu şartlar altında bitkilerde proteinler yaygın olarak biriktirilmekte ve ozmoregülasyonda rol oynamaktadırlar. Tuzlulukla indüklenen pek çok protein, hücrelerin sitoplazmik viskozitesini değiştirebilmektedir. Arpa, ayçiçeği ve çeltik gibi farklı bitki türlerinin tuza tolerant çeşitlerinde, çözülebilir proteinlerin yüksek içerikleri tespit edilmiştir (Parvaiz ve Satyawati, 2008). Pek çok bitki türünde tuzla indüklenen proteinleri, iki ayrı grupta toplamak mümkündür: sadece tuzdan dolayı biriktirilen tuz stresi proteinleri ve diğer abiyotik stres şartlarında biriktirilen stresle ilgili proteinlerdir. Tuzlu şartlar altında gözlenen protein birikimi, stres arttığında tekrar kullanılmak üzere depo azot kaynaklarını oluşturmada ve ozmoregülasyonda etkin rol oynamaktadır. Tuz stresine maruz kalmış tütünde ozmotin olarak isimlendirilmiş 26 kDA proteini, arpada germin olarak isimlendirilen ancak immünolojik olarak ozmotinle ilişkili olmayan 26 kDA proteini ve turpta 22 kDA proteini karakterize edilmiştir (Ashraf ve Haris, 2004). İlk olarak tohum embriyolarında karakterize edilen LEA proteinlerinin sentezi, abiyotik stres altında artmaktadır. Bu proteinler, stres şartlarında koruyucu etkilere sahiptir ve hasar semptomlarının ortaya çıkışını geciktirmektedir (Holmberg ve Bülow, 1998). Bitkilerin vejetatif dokularına dehidrasyon toleransı sağlayan LEA proteinlerin birikim düzeyleri, ozmotik stres altında koruyucu rollerini ortaya çıkararak farklı bitki türlerinde stres toleransını sağlamaktadır (Chinnusamy vd., 2005).

Tuzluluk, bitkilerde ozmolit ve bazı proteinlerin sentezini arttırmakta bunun yanında net fotosentetik oran, transpirasyon oranı ve stoma iletkenliğini azaltmaktadır. Düşük tuzluluk klorofil içeriğini arttırsa da yüksek tuzluluk klorofilleri degrede etmektedir. Tuzun tkisi ile indüklenen fotosentezdeki azalma, stoma kapanması ile ortaya çıkan stomatal sınırlandırma veya stomatal olmayan sınırlandırma veya her iki sınırlandırma ve fotosentetik aktivitenin bozulması ile olmaktadır. Tuzluluk, stoma iletkenliğinde, interselüler CO<sub>2</sub> konsantrasyonunda, klorofil içeriği ve rubisco enziminin aktivitesinde azalmaya neden olmakta ve elektron transferini ve sükroz birikimini değiştirmektedir. Fotosentetik dokularda tuz fazlalığı tilakoidlerin şişmesine ve granadaki bitişik membranların kümelenmesine neden olmaktadır. İyonik dengesizlik, kloroplastlarda K<sup>+</sup>un azalmasına ve fotosistem II'nin bozulmasına neden olmaktadır. Tüm bu olumsuz etkilere karşı tuz toleransının sağlanması, stoma iletkenliğine, net fotosentetik

oranın devamı ve klorofil konsantrasyonunun artırılması ile ilişkilidir. Tuz toleransı için fotosentez oranındaki genetik farklılıklar, hem farklı türler arasında hem de belli türün farklı çeşitleri arasında olabilmektedir. Ancak, tuz stresi altında büyüme ve fotosentez arasında yakın ilişki bulunan bu türlerde fotosentetik oran yararlı bir seleksiyon kriteridir (Ashraf, 2004).

Tuz toleransının diğer bir basamağı da reaktif oksijen türlerinin (ROT) oluşumuna neden olmasıdır. ROT'lar (Reaktive oxygen species: ROS) serbest radikaller olup en azından eşlenmemiş bir elektron çiftine sahip atom veya atom grubudurlar. Yüksek derecede stabil olmayan konfigürasyona sahiptirler ve daha fazla serbest radikal üretmek için diğer moleküllerle reaksiyona girebilmektedirler (Ashraf, 2009). Hücrelerde devam eden metabolik reaksiyonlar sürecinde sürekli sentezlenmektedirler ve hücrelerin detoksifikasyon mekanizmaları sayesinde zararlı etkilerini göstermemektedirler. ROT'lar başlıca kloroplastlarda fotosentez reaksiyonları esnasında fotosentetik elektron taşıma zincirinden; peroksizomlarda ve glioksizomlarda fotorespirasyon ve yağ asiti oksidasyonu sürecinde; mitokondrilerde sitrik asit döngüsünde; hücre duvarı peroksidazları gibi apoplastik enzimlerin etkisi ile ortaya çıkmaktadırlar (Gechev vd., 2006). Ayrıca ROT'lar sitoplazma ve endoplazmik retikulumda sitokrom P450 tarafından katalizlenen reaksiyonlar sonucunda üretilebilmektedir. Apoplast ve hücre membranları da ROT kaynakları olup pH'a bağlı hücre duvarı peroksidazları aktivitesi ile ROT üretimi yapılmaktadır (Gill ve Tuteja, 2010). Hücrelerde bilinen başlıca ROT'lar, singlet oksijen ( $^1O_2$ ), süperoksit anyonu ( $O_2^-$ ), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), hidroksil ( $OH^\cdot$ ) radikalleridir. Singlet oksijen,  $O_2$  molekülünün fazladan enerji alması sonucunda kendi dönüş yönünün tersi yöreğe yerleşmesi; nitrik oksit ile reaksiyonu veya  $H_2O_2$ 'nin hipoklorit ile reaksiyonu sonucunda oluşabilmektedir. Süperoksit anyonu, kloroplastlarda fotosistem I ve II'de elektron taşıma sisteminde görev alan  $O_2$  molekülünden bir elektronun transferi sonucunda indirgenmesi ile oluşmaktadır ( $2O_2 + 2Fd_{red} \rightarrow 2O_2^- + 2Fd_{ox}$ ). Hidrojen peroksit aerobik solunum yapan hücrelerde süperoksit radikalinin SOD (süperoksit dismutaz) enziminin katalizlemesi ile ortaya çıkmaktadır ( $2O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$ ). Hidroksil radikali ise,  $H_2O_2$  ve  $O_2^-$  radikallerinin metal iyonları varlığında Haber-Weiss ( $Cu^+$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ) veya Fenton ( $Fe^{2+}$  ve diğer geçiş metalleri; Cu, Zn, Mn, Cr, Co, Ni, Mo) reaksiyonları ile

meydana gelmektedirler (Haber-Weiss reaksiyonu:  $O_2^- + H_2O_2 \rightarrow O_2 (^1\Delta g) + OH + OH^-$ ; Fenton reaksiyonu:  $Fe^{3+} + O_2^- \rightarrow Fe^{2+} + O_2$ ;  $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + O_2 + OH + OH^-$ ). Bitkilerde tuz ve diğer abiyotik stres faktörleri altında ROT üretimi artmaktadır (Şekil 1.4.). ROT üretiminin artışı hücrelerde lipit peroksidasyonuna, protein oksidasyonuna, nükleik asit hasarına, enzim inhibisyonuna ve hücrelerin ölümüne neden olmaktadır (Büyük vd., 2012). ROT'lar, lipit, protein, nükleik asit gibi biyomoleküllerin hasarını bu biyomolekülleri okside etme eğilimleri ile gerçekleştirmektedirler (Bartwall vd., 2013).



Şekil 1.4. Çeşitli stres faktörlerinin etkisi ile ROT oluşumu ve bunların detoksifikasyonu (Bartwall vd., 2013)

Çeşitli çevresel stres faktörlerine karşı hücrenin korunmasında hücrel antioksidan mekanizmanın indüksiyonu önemlidir. Antioksidan savunma sisteminin bileşenleri, enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlardır (Ashraf, 2009), (Çizelge 1.3.). Enzimatik antioksidanlar SOD, CAT (Katalaz), POX (Peroksidaz), APX (Askorbat peroksidaz), GPX (Guaikol peroksidaz), MDHAR (Monodehidroaskorbat redüktaz), DHAR (Dehidroaskorbat redüktaz), GR (Glutasyon redüktaz) olup enzimatik olmayan antioksidanlar askorbik asit, glutasyon, flavonoidler, karotenoid ve tokoferoldür (Gill ve Tuteja, 2010).

**Çizelge 1.3. Enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar, fonksiyonları ve lokalizasyonları (Gechev vd., 2006)**

Enzimler/ Antioksidanlar	Fonksiyon	Lokalizasyon
SOD	$O_2^{\cdot-}$ 'nin dismutasyonu ile $H_2O_2$ oluşumunu sağlar.	sit, klo, mit, per
CAT	İndirgeyiciye gereksinim duymadan $H_2O_2$ 'i detoksifiye eder.	mit, per, gli
APX	İndirgeyici olarak askorbat ile $H_2O_2$ detoksifikasyonu sağlar.	sit, klo, mit, per
MDHAR	İndirgeyici olarak NAD(P)H ile monodehidroaskorbat radikallerini indirger.	sit, klo, mit
DHAR	İndirgeyici olarak GSH ile dehidroaskorbat radikallerini indirger.	sit, klo, mit
GR	İndirgeyici olarak NADPH ile yükseltgenmiş glutatyonu indirger.	sit, klo, mit, per
POX	İndirgeyici olarak çeşitli substratları kullanarak $H_2O_2$ 'i detoksifiye eder; hücre duvarı polimerleri ile etkileşim içindedirler.	hd, sit, mit, vak
GPX	İndirgeyici olarak GSH kullanarak lipitleri hidroperokside eder ve $H_2O_2$ 'i detoksifiye eder.	sit, klo, mit, er
GST	Lipit hidroksiperoksitleri detoksifiye eder ve DHAR aktivitesi sergiler.	apo, cit, klo, mit, nuk
Askorbat	APX'in substratıdır, $H_2O_2$ 'i detoksifiye eder.	apo, sit, klo, mit, per, vak
Glutatyon	Glutatyon transferazlar ve glutatyon redüktazların substratıdır. $H_2O_2$ ve diğer hidroksiperoksitleri detoksifiye eder.	apo, sit, klo, mit, per, vak
$\alpha$ -tokoferol	Membran lipitlerini peroksidasyondan korur, lipit peroksitlerini detoksifiye eder ve $^1O_2$ giderir.	membranlar
Karotenoidler	$^1O_2$ giderir, ABA'nın haberci molekülüdür, fotosentezde etkindir.	klo, kro, ami
Flavonoidler	Direk olarak $H_2O_2$ 'i temizler.	vak

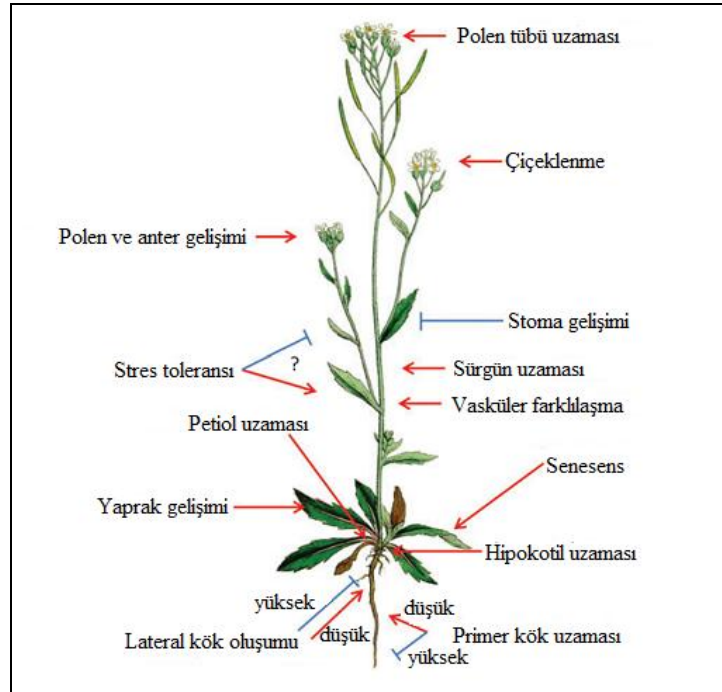
hd: hücre duvarı, apo: apoplast, sit: sitosol, klo: kloroplast, kro: kromoplast, ami: amiloplast, mit: mitokondri, er: endoplazmik retikulum, vak: vakuol, per: peroksizom, gli: glioksizom, nuk: nukleus

SOD,  $O_2^{\cdot-}$  radikalinin moleküler oksijen ve  $H_2O_2$ 'e dismutasyonunu katalizlemektedir. Bitki savunma sisteminde stres faktörlerine karşı kullanılan en önemli enzimlerden biri SOD olup bitkilerin her hücresinde bulunmaktadır. SOD enzimi multimerik metaloproteinlerdir ve aktif bölgelerinde bulunan metallere göre izoformlara sahiptir. Bilinen en yaygın izoformları, Cu/Zn-SOD, Mn-SOD, Fe-SOD ve Ni-SOD'dur. APX, bitki hücrelerinin sitoplazma ve kloroplastlarında  $H_2O_2$ 'i kullanarak askorbatın oksidasyonunu katalizler. Peroksizom ve glioksizomlarda bulunan CAT,  $H_2O_2$  dismutasyonu ile  $H_2O$  ve  $O_2$  oluşumunu katalizlemektedir. APX aktivitesi ile lipit peroksidasyonunun önemli bir göstergesi olan MDA (malondialdehit) üretilmektedir. Stromal MDA, MDHAR enzimi ile redüksiyonu katalizlenmektedir. DHAR, dehidroaskorbattan askorbat üretimini sağlamaktadır. GR, askorbat-glutatyon sisteminin diğer bir enzimi olup çoğunlukla kloroplastlarda az da olsa mitokondri ve sitoplazmada yer almaktadır. GR, glutatyonun redüksiyonunu katalizlemektedir (Ashraf, 2009).

Askorbik asit, bol bulunan, güçlü ve suda çözülebilir bir antioksidan olup bitkilerde oluşan ROT tarafından ortaya çıkan hasarı önlemede veya azaltmada rol oynamaktadır. Askorbik asit tüm bitki dokularında özellikle meristematik ve fotosentetik hücrelerde bulunmaktadır (Gill ve Tuteja, 2010). Stres şartlarında miktarı artan süperoksit ve hidroksil radikallerinin temizlenmesinde etkin rol oynamaktadır (Büyük vd., 2012). Glutasyon, bitki dokularında indirgenmiş formunda bulunur ve sitosol, endoplazmik retikulum, vakuol, mitokondri, kloroplast, peroksizom hatta apoplast gibi bitkilerin tüm kompartmanlarında bulunmaktadır. Glutasyon, sülfat taşınımının düzenlenmesi, sinyal transdüksiyon, metabolitlerin konjugasyonu, strese cevap veren genlerin ekspresyonu gibi pekçok proseste kilit rol oynamaktadır. Ayrıca, hücre farklılaşması, hücre ölümü, senesens, patojen resistansı ve enzimatik regülasyonda görev almaktadır. Glutasyon, singlet oksijen, hidrojen peroksit ve hidroksil radikallerinin temizlenmesinde etkindir. Flavonoidler, bitkilerde yaprak, floral kısımlar ve polenlerde bulunmaktadır ve hücrelerde vakuollerde glikozit olarak biriktirilmektedir. En biyoaktif sekonder metabolit olan flavonoidler, abiyotik stres şartlarında hücre hasarını önlemede etkin ROT temizleyicisi olarak görev almaktadır. Karotenoidler, stres toleransında etkin olan ve yağda çözülebilen antioksidanlardır ve doğada 600'den fazla çeşidi bulunmaktadır. Tüm fotosentetik organizmalarda lipit peroksidasyonunu baskılayarak ve ROT'ları temizleyerek önemli fotoprotektif rol oynamaktadır. Tokoferol, hücre membranlarında bulunan ve yağda çözülebilen en önemli antioksidandır. Kloroplastların tilakoid membranlarında da lokalize olmaktadır. Tokoferol, ROT ve lipit radikalleri temizleyicisidir ve membran stabilizasyonunu sağlayarak strese karşı bitkilerin toleransını arttırmaktadır (Gill ve Tuteja, 2010).

Son yıllarda tuz stresinin etkilerine karşı bitki toleransının geliştirilmesinde ve artırılmasında farklı biyomoleküllerin kullanımı ön plana çıkmıştır. Antistres özelliğe sahip bu biyomoleküllerden biri de brassinosteroidlerdir. Brassinosteroid (BR)'ler hayvansal steroid hormonlara yapısal benzerlik gösteren ve bitkilerde büyümeyi arttıran yeni bir bitki hormon sınıfıdır (Fujioka vd., 1998). Mikromolar ve nanomolar düzeylerde ekzojen uygulandığında hücre uzaması ve proliferasyonu sağlamaktadır (Clouse, 1996; Sakurai, 1999; Haubrick ve Assmann, 2006). Fizyolojik çalışmalar sonucunda BR'lerin gövde uzaması, polen tübü gelişimi,

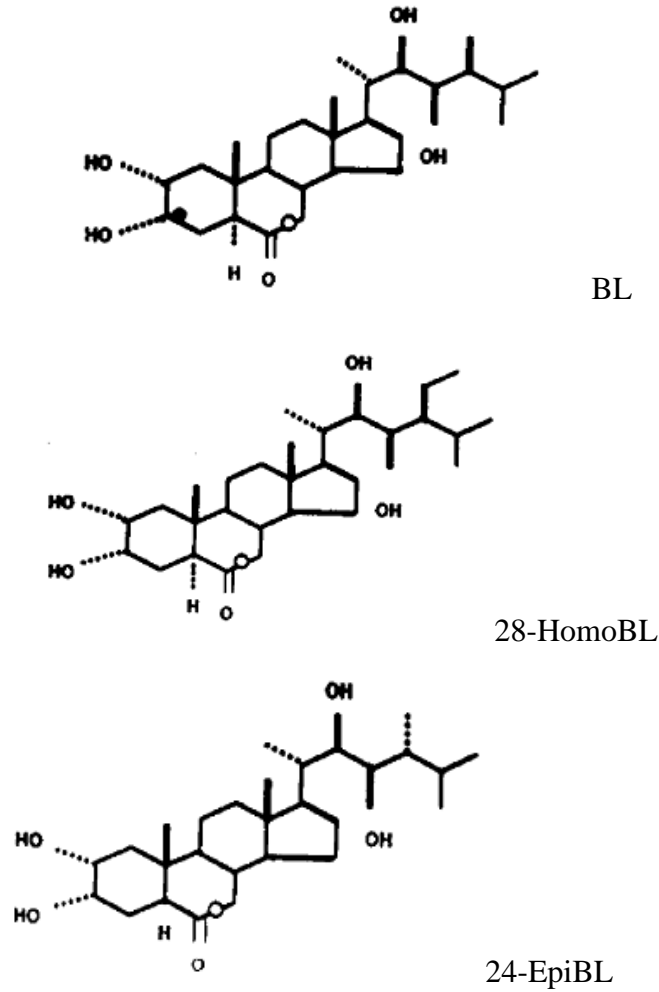
yaprak gelişimi, yaprak kıvrılması ve epinasti, kök gelişimi, reproduktif organların gelişimi, etilen biyosentezinin induksiyonu, proton pompası aktivasyonu, ksilem farklılaşması ve gen ekspresyonunun (gen ifadesinin) düzenlenmesi gibi çok farklı hücrel cevaplardan sorumlu oldukları ortaya çıkarılmıştır. Ayrıca, pek çok kültür bitkisinde verimliliğin artırılması ve stres toleransının geliştirilmesi gibi yararlı tarımsal uygulamaları da mevcuttur (Li ve Chory, 1998; Xia vd., 2010; Yang vd., 2011; Gudesblat ve Russinova, 2011; Hao vd., 2013). BR'ler yüksek ve düşük sıcaklık, tuzluluk, kuraklık gibi abiyotik stres ve viral, bakteriyel, fungal patojenler gibi biyotik stres faktörlerine karşı bitki adaptasyonunu arttırmaktadır (Clouse, 2003).BR'lerin bitki gelişimindeki etkileri Şekil 1.5.'de gösterilmiştir.



Şekil 1.5. BR'lerin bitki gelişimindeki etkileri (Düşük: düşük BR konsantrasyonu, yüksek: yüksek BR konsantrasyonu; kırmızı oklar: gelişim üzerine indükleyici etkiyi, mavi oklar: engelleyici etkiyi göstermektedir), (Yang vd., 2011)

İlk kez 1979 yılında Grove vd. tarafından izole edilen ve *Brassica napus* L. polenlerinden elde edilen hidrofobik ekstrakt **brassin** olarak adlandırılmıştır (Müssig ve Altmann, 1999). Daha sonra günümüze kadar yapılan çalışmalarla 65 serbest BR ve 4 BR konjugantı izole edilmiştir (Bajguz, 2007). Tüm BR'ler daima biyolojik olarak aktif değildir; BL (brassinolid), 24-epiBL (24-epibrassinolid) ve 28-homoBL

(28-homobrassinolid) en aktif BR'lerdir ve fizyolojik çalışmalarda yaygın kullanılmaktadırlar (Şekil 1.6.). Doğal BR'ler  $5\alpha$ -kolestan iskeletine sahiptirler ve yapısal farklılıkları, iskelet üzerindeki işlevselliğin çeşidi ve oryantasyonundan kaynaklanmaktadır. Yan zincirdeki alkil gruplarının yer değiştirmesi sonucunda BR'ler  $C_{27}$ ,  $C_{28}$  ve  $C_{29}$  olarak gruplandırılmaktadırlar. Genç bitki dokuları, polen ve olgunlaşmamış dokular yüksek konsantrasyonda BR içerirken; sürgün ve yapraklar daha düşük konsantrasyonda BR içermektedir (Rao vd., 2002).

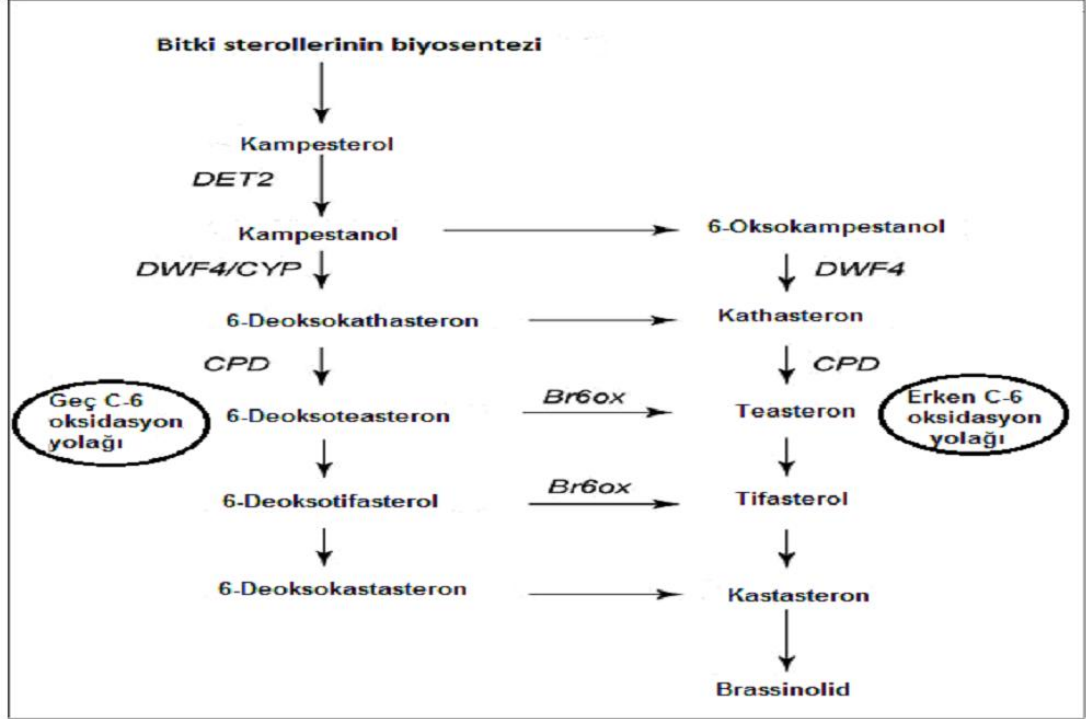


Şekil 1.6. En biyoaktif BR çeşitlerinin kimyasal yapısı (Rao vd., 2002)

BR'ler izoprenoid metabolizmasının mevalonat yolu ile sentezlenmektedir (Schaller, 2003). BL, kampesterolün dönüşümünde dallanan erken  $C_6$ -oksidasyon yolu ve geç  $C_6$ -oksidasyon yolu olarak adlandırılan iki yol üzerinden sentezlenmektedir. Biyosentetik yol, kampesterolden başlayarak teasteron, tifasterol, kastasteron ve

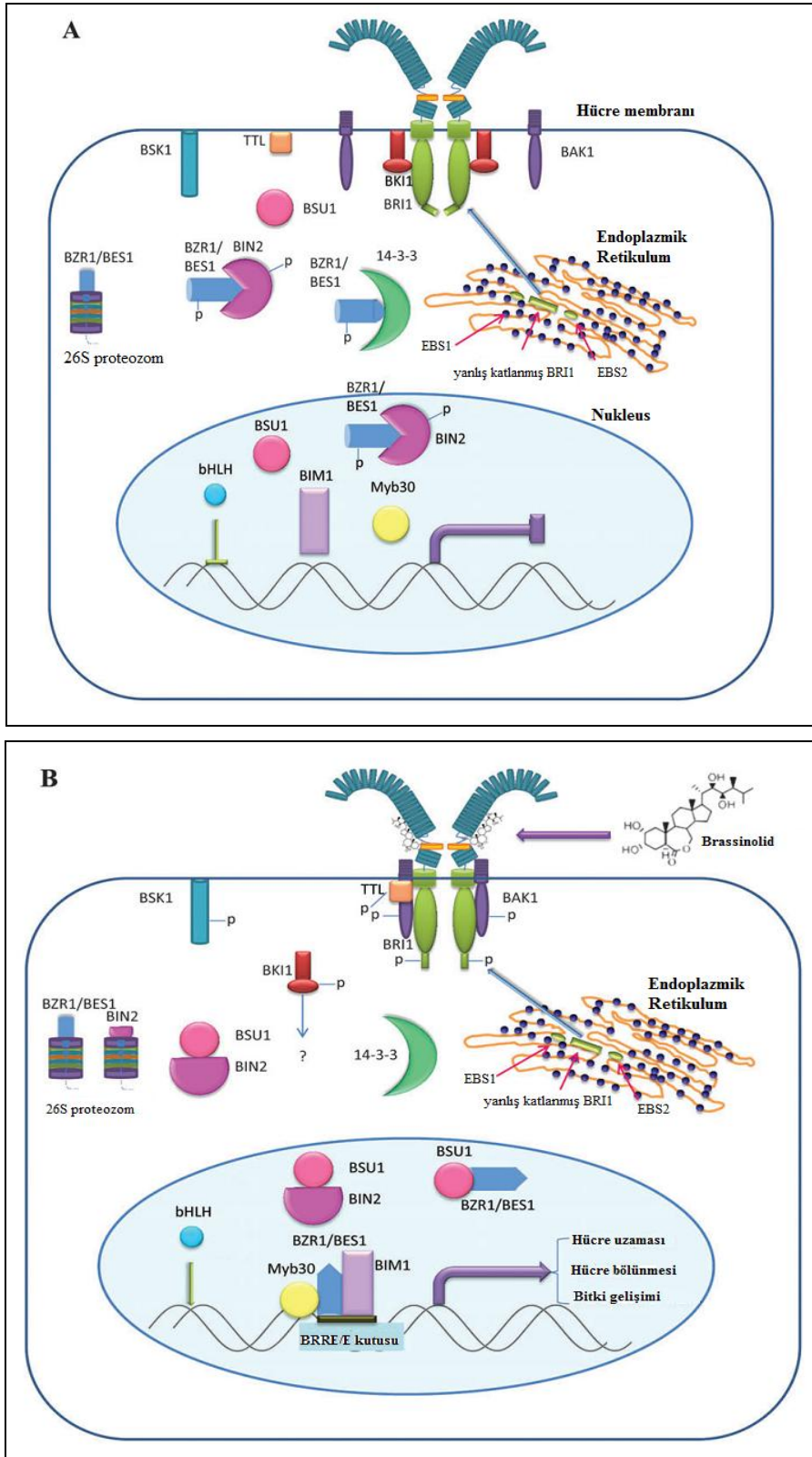


brassinolide dönüşerek gerçekleşmektedir (Sakurai, 1999). BR biyosentez reaksiyonlarını yan zincir hidroksilasyon serisine ilaveten içerdikleri A ve B halkalarının redüksiyonları, oksidasyonları ve epimerizasyonları oluşturmaktadır (Clouse, 2000). Şekil 1.7.'de kampesterolden BL'nin biyosentezi gösterilmiştir.



Şekil 1.7. Erken C6-oksidasyon ve geç C6-oksidasyon yolu ile kampesterolden BL biyosentezi (Surgun vd., 2012)

BR sinyal iletimi, plazma membranından nukleusa kadar devam eden bir süreçtir (Şekil 1.8.), (Yang vd. 2011). BR sinyal iletimi analizleri ilk olarak, BR reseptörü olan BRI1 (Brassinosteroid Intensitive 1) üzerine olmuştur. Daha sonra BRI1 ile etkileşime giren ve BAK1(BRI1 ile ilgili reseptör kinaz 1) olarak adlandırılan lözince zengin 2. reseptör kinaz tanımlanmıştır. BR bağlanması, aktif dimer oluşumunu tetikler ve trans fosforilasyon yolu ile reseptör kinazların her ikisinin aktivasyonunu sağlar. BR sinyal iletim yolunda rol oynayan komponentler de belirlenmiştir. Bunlardan biri de sinyal iletiminin negatif regülatörü BIN2 (Brassinosteroid Intensitive 2)'dir. BRI1 reseptör kompleksi, BIN2'yi inhibe eder. BIN2, potansiyel substratları olan BZR1 ve BES1'i fosforilize etmektedir (Müssig ve Altmann, 2003).



Şekil 1.8.'de gösterildiği gibi BL yokluğunda (A) ve varlığında (B) desteklenen sinyal iletim yolunu şu şekilde özetlemek mümkündür: (A) BL yokluğunda, BR reseptörü BRI1, karboksil ucu ve BAK1 ile BSK'lar gibi diğer pozitif substratlarla etkileşimini önlemek için negatif düzenleyici BKI1 tarafından inhibe edilir. BSU1 inaktiftir ve bunun sonucu olarak, BIN2, BES1/BZR1'i fosforile etmek için bir aktif kinaz olarak rol oynamaktadır ve BES1/BZR, 26S proteozomu tarafından parçalanmaktadır veya 14-3-3 proteinleri tarafından sitoplazmada tutulmaktadır. EBS1/EBS2, BRI1'in doğru katlanmasını ve hücre membranına ulaşmasını sağlamaktadır. (B) BL varlığında, plazma membranından BKI1'in ayrılmasına önderlik ederek BRI1'in ekstraselüler domaini BR'leri algılamaktadır ve BRI1 ile BAK1 ilişkisi ve bunların trans fosforilasyonu tam aktif BR reseptör kompleksini oluşturur. BRI1 kinaz tarafından BSK'ların fosforilasyonundan sonra, BIN2'nin inhibisyonu ve defosforilasyonla sonuçlanarak BSK'lar BSU1'e bağlanmaktadır. Sonra, fosforile edilmemiş BES1/BZR1 nükleusta biriktirilir ve Myb30 ve BIM1 gibi proteinler farklı transkripsiyonel komplekslerini oluşturmaktadır. Bu kompleksler, BR'ye yanıt genlerinin promotor bölgesindeki E-kutusuna bağlanır ve bu genlerin ekspresyonlarını düzenlemektedir (Yang vd., 2011). Yapılan son çalışmalar, BR sinyal iletimi yolunda rol oynayan yeni komponentler, multifonksiyonel proteinler ve BR ile ilgili genlerin ekspresyonunu düzenleyen yeni transkripsiyon faktörlerinin tanımlanmasına katkı sağlamaktadır (Gruszka, 2013).

BR'ler pek çok in vitro çalışmada kullanılmıştır ve böylelikle farklı in vitro kültürler ile BR'lerin fizyolojik etkileri ortaya çıkarılmaya çalışılmıştır. Tatlı patatestede oksin sitokinin dengesinin sağlandığı kültürlerde kullanılan iki BR analogu, kallus ve sürgün indüksiyonu üzerine olumlu etki göstermiştir (Gonzales vd., 2003). Marulda kullanılan iki spirostan BR analogu BAP (6-benzil amino pürin) ile kombine kullanıldığında, kotiledon eksplantından kallus oluşumu ve sürgün rejenerasyonunu arttırmıştır (Nunez vd., 2004). Hindistan cevizinde homoBL'nin, plumula eksplantından kallus, embriyonik kallus ve somatik embriyo oluşumu kapasitesini arttırıcı etki gösterdiği belirlenmiştir (Azpeitia vd., 2003). BR'lerin, pamukta hipokotil eksplantından (Aydın vd., 2006; Aydın vd., 2010), bazı kozalaklı bitkilerde ve çeltikte olgun zigotik embriyolardan (Pullman vd., 2003), *Pinus wallichiana* A. B. Jacks (Malabadi ve Nataraja, 2007) ve *Pinus caribaea* Mor. türünde yine olgun

zigotik embriyolardan (Malabadi vd., 2011) somatik embriyogenezisi stimule ettiği gözlenmiştir. EpiBL, *Cymbidium elegans* Lindl orkide türünde sürgün ucu eksplantından in vitro rejenerasyonu olumlu etkilemiştir (Malabadi ve Nataraja, 2007). *Brassica napus* L. türünde epiBL ve BL mikrospor embriyogenezisini olumlu etkilemiş ve embriyo sayısını arttırmıştır (Ferrie vd., 2005). *Brassica napus* türünde yapılan diğer bir çalışmada, BL'nin embriyo gelişiminde anahtar bir enzim olan APX enzimi aktivitesini arttırdığı bulunmuştur (Khamiss vd., 2011). Yer fıstığında BR'lerin kotiledon nodundan bitki gelişimi ve antioksidan enzim aktivitelerini arttırıcı etkileri belirlenmiştir (Verma vd., 2012).

Tuz stresinin bitkilerde pek çok morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler değişikliklere neden olduğu belirtilmektedir (Bajguz ve Hayat, 2009). Domateste (Santa-Cruz, 1997; Khavari-Nejad ve Mostofi, 1998; Shalata ve Tal., 1998; Shalata vd., 2001; Mittova vd., 2002-a; Mittova vd., 2002-b; Juan vd., 2005; Koca vd., 2006; Tuna vd., 2007; Gapinska vd., 2008; Hassan vd., 2008; Keser vd., 2009; Yaman vd., 2009) ile susam (Koca vd., 2007), turp (Keser vd., 2009), ceviz (Akça ve Samsunlu, 2012), kavun (Kuşvuran, 2010), karpuz (Yaşar vd., 2008), hıyar (Erdal vd., 2000), arpa (Tabur ve Demir, 2008), buğday (Öncel ve Keleş, 2002) ve pamuk (Öz ve Karasu, 2007) gibi diğer bitkilerde de tuz stresinin etkilerini belirlemeye yönelik çok sayıda çalışma yapılmıştır. Son yıllarda tuzun etkilerinin belirlenmesinin yanı sıra tuz toleransının artırılması için çeşitli makroelementler (K, Ca) (Türkmen vd., 2000; Türkmen vd., 2002; Akıncı ve Şimşek, 2004) ve mikroelementler (Se, Si) (Avcu vd., 2013), salisilik asit (Çanakçı ve Munzuroğlu, 2004; Stevens vd., 2006; El-Khallal vd., 2009; Ashraf vd., 2010; Joseph vd., 2010; Hayat vd., 2012; Sajid ve Aftab, 2012), askorbik asit (Aly vd., 2012), prolin (El-Enany, 1995; Trovato, 2008), sekonder metabolitler (Ramakrishna ve Ravishankar, 2011), metil jasmonat (Yoon vd., 2009), poliaminler (Tekin ve Bozcuk, 1998; Mutlu ve Bozcuk, 2000; Fariduddin vd., 2013), çeşitli bitki büyüme düzenleyicileri (Çavuşoğlu ve Kabar, 2007; Kaya vd., 2010; Javid vd., 2011) ve özellikle BR'lerin (Anuradha ve Rao, 2001; Nunez vd., 2003; Özdemir vd., 2004; Ali ve Abdel-Fattah, 2006; Sahahbaz ve Ashraf, 2007; Ali vd., 2008; Shahbaz vd., 2008; El-Khallal vd., 2009; Ashraf vd., 2010; Houimili vd., 2010; Shahid vd., 2011; Ding vd., 2012; Hayat vd., 2012; Fariduddin vd., 2013) kullanımının olumlu etkileri belirlenmiştir. Dolayısı ile tez çalışmamızın amacı, M-

28 hibrit domates çeşidinde tuz toleransını arttırmak için tuz stresine karşı 24-epiBL'nin ekzojen kullanımının etkilerini in vitro kültür çalışması ile morfolojik ve biyokimyasal parametrelerle araştırmaktır.

## 1.2. Kaynak Özetleri

BR'ler genellikle bitki niteliği ve niceliğini geliştirmede koruyucu ve stimule edici rollere sahiptirler. Tuz stresi ve diğer abiyotik stres faktörlerine karşı BR'lerin kullanımı yararlı etkiler göstermektedir. Stres ve stresin olmadığı şartlar altında, tohumu ıslatma, köklerin bulunduğu besin ortamına ilave ve yaprakdan spreyleme gibi farklı ekzojen BR uygulamaları pek çok bitkide büyüme ve gelişimi olumlu etkilemektedir (Ashraf vd., 2010). Çevresel streslere karşı bitki toleransını arttırmak için farklı bitkilerde BR kullanımı ile ilgili in vitro (laboratuvar) ve in vivo (sera ve tarla) şartlarında yapılan çalışmalar mevcuttur ve bu çalışmalar artarak devam etmektedir (Krishna, 2003).

### 1.2.1. Tuz stresine karşı BR'lerin kullanıldığı in vivo çalışmalar

Tuz stresine karşı bitki toleransını geliştirmede BR'lerin etkilerini belirlemeye yönelik çok sayıda çalışma yapılmıştır. Özdemir vd. (2004), tuza duyarlı IR-28 çeltik (*Oryza sativa* L.) çeşidine ait fidelerin gelişiminde, 24-epiBL'nin etkisini araştırmışlardır. Yüzey sterilizasyonu yapılan tohumlar dört gruba ayrılmıştır. 1. grup distile su (kontrol), 2. grup 3 µM epiBL çözeltisi, 3. grup 120 mM NaCl çözeltisi ve 4. grup 3 µM epiBL+120 mM NaCl çözeltisinde 24 saat bekletilmişlerdir. Tohumlar, söz edilen çözeltilerle nemlendirilmiş filtre kağıtları bulunan petri kaplarında karanlıkta çimlendirmeye bırakılmıştır. 96 saat sonra çimlenen bitkiciklerin bulunduğu petri kapları, karanlıktan fotoperiyodik koşula alınmıştır. Sonuç olarak, 7 gün sonra çeltik fidelerinin gelişimi, tuz stresine karşı yapılan epiBL uygulaması ile artmıştır. Tuz stresi altında epiBL uygulamasında SOD, CAT, GR enzim aktivitelerinde önemli farklılık gözlenmezken, APX aktivitesindeki artış önemli olmuştur. Lipit peroksidasyonu ve prolin içeriği tuz stresi altında epiBL uygulaması

ile azalırken, çözülebilir protein içeriği artmıştır. Araştırmacılar, tuz stresi ile ortaya çıkan oksidatif hasarı epiBL'nin azalttığını ve fide gelişimini arttırdığını belirlemişlerdir. Çeltikte yapılan diğer bir çalışmada, ticari önemi olan Pusa Basmati-1 çeşidinde tuz stresi altında, ekzogen uygulanan epiBL'nin etkisi çeşitli stres markörlerinin yanıtları ile araştırılmıştır. Tohumlar yüzey sterilizasyonunu takiben distile su (kontrol) ve farklı dozlarda ( $10^{-11}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-7}$  M) epiBL çözeltilerinde 8 saat bekletilmişlerdir. Ön uygulamalı tohumlar, farklı konsantrasyonlardaki (0, 75, 100, 125 mM) NaCl çözeltileri ile sulanmış kuma ekilmişlerdir ve 12 gün sonunda hasat edilerek gelişimleri, klorofil içerikleri, protein ile prolin içeriği, lipid peroksidasyonu, antioksidan enzim aktiviteleri ve BR sinyali, antioksidan enzim aktiviteleri ile tuza duyarlı genlerin ekspresyonları araştırılmıştır. Sonuç olarak, tuza maruz kalan fidelerin gelişim parametrelerinde önemli azalma ile antioksidan enzim aktivitelerinde değişimler gözlenmiştir. Bununla birlikte, epiBL uygulamasının bitki gelişimi, protein düzeyleri, prolin içeriği ve antioksidan enzim aktivitelerini iyileştirdiği gözlenmiştir. Çeltik fidelerinde tuz stresi süresince artan MDA içeriği epiBL uygulaması ile azalmıştır. EpiBL uygulaması, çeşitli oksidatif stres markör genlerinin ekspresyonlarını arttırmıştır (Sharma vd., 2013).

Ali ve Abdel-Fattah (2006), tuz stresinin fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) ve arpada (*Hordeum vulgare* L.) ozmolit-antioksidan içerikleri üzerine etkilerini araştırmışlardır. Bitki tohumları yüzey sterilizasyonundan sonra distile su bulunan petri kabında 24 saat kontrollü serada bekletilmiştir. Tohumlara, distile su (kontrol), 6 saat distile su ve akabinde 150 mM NaCl uygulaması, 6 saat 5  $\mu$ M BR ve akabinde su, 6 saat 5  $\mu$ M BR ve akabinde 150 mM NaCl uygulaması yapılmıştır. 8 gün sonra fideler, vermikulit içeren saksılara alınmış ve 10 gün boyunca yarı güçlü Hoagland çözeltisi ile günlük sulanmışlardır. BR uygulaması yapılan tohumlarda, çimlenme sürecinde tuz stresine karşı tolerans artmıştır. Çimlenme periyodu boyunca tuz stresine maruz kalan fidelerde prolin içeriği önemli derecede artarken, tuz stresine karşı BR kullanımı prolin içeriğini fazla arttırmamıştır. Glisin betain içeriğinde, BR uygulamaları sonucu önemli artış tespit edilmiştir. Tuz stresine karşı BR hem gelişimi arttırmış hem de klorofil içeriğindeki azalışı önlemiştir. Araştırmacılar, BR etkisi sonucu antioksidan glutatyon ve tuz toleransı arasında ilişki olduğunu belirlemişlerdir.

Çavuşoğlu ve Kabar (2007), turpta (*Raphanus sativus* L.) tuzlu koşullarda tohum çimlenmesi ve fide gelişimine çeşitli bitki büyüme düzenleyicilerinin ( $GA_3$ , kinetin, BAP, etilen, triakontanol, epiBL, kadaverin, putresin, spermidin, spermin) tek veya kombinasyonlarının etkisini araştırmışlardır. Tohumlar, yüzey sterilizasyonundan sonra eşit hacimlerdeki bitki büyüme düzenleyicileri çözeltilerinde 24 saat karanlıkta tutulduktan sonra, 0.25, 0.30 ve 0.35 M NaCl çözeltileri ile sulanan iki katlı filtre kağıtları içeren petri kaplarına aktarılmıştır. 7 gün sonra tohum çimlenmesi ve fide gelişimi ile ilgili veriler alınmıştır. 0.25 ve 0.30 M tuz stresinde epiBL tohum çimlenme yüzdesini ve fidelerin yaş ağırlığını arttırmıştır. Hipokotil çıkış yüzdesi ve hipokotil uzunluğu üzerine epiBL'nin etkisi gözlenmezken, radikula uzunluğu üzerine 0.25 M tuzlulukta epiBL etkisi istatistiki önemli olmuştur. EpiBL'nin  $GA_3$ , kinetin ve kadaverin ile kombine kullanımı tohum çimlenme yüzdesini arttırırken diğer parametreler üzerinde olumlu etki göstermemiştir. EpiBL ile kinetin kombine kullanımı, sadece fidelerin taze ağırlığını arttırmıştır.

Shahbaz ve Ashraf (2007), tuzlu şartlarda buğday (*Triticum aestivum* L.) S-24 ve MH-97 çeşitlerinde büyüme ve mineral içeriği ( $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Cl^-$ ) üzerine epiBL'nin etkisini çalışmışlardır. Ekimi yapılan tohumlar, Hoagland çözeltisi ile sulanmış ve tohum ekiminden 41 gün sonra bitkilere NaCl uygulaması (0 ve 150 mM) yapılmıştır. Tuz uygulamasından 2 gün sonra epiBL uygulaması (0, 0.0125, 0.025, 0.0375 mg/l) yaprakdan spreyleme ile yapılmış ve BR uygulamasından 45 gün sonra bitki örneklerinin analizleri yapılmıştır. EpiBL'nin ekzojen uygulaması, tuzlu ve tuzsuz şartlar altında bitki biyokütlesini arttırmıştır ancak, yaprakta  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Cl^-$  içeriğinde ve  $K^+/Na^+$  oranında önemli etki göstermemiştir. Shahbaz vd. (2008), buğdayda tuzla indüklenen büyüme inhibisyonu üzerine ekzojen epiBL uygulamasının etkisini araştırmışlardır. S-24 (tuza tolerant) ve MH-97 (tuza orta derecede duyarlı) çeşitleri üzerine tuz ve epiBL uygulaması, yukarıdaki çalışma ile (Shahbaz ve Ashraf, 2007) aynı şekilde yapılmıştır. Genel olarak buğdayda tuzun kötü etkilerini ekzojen uygulanan 24-epiBL azaltmıştır. Tuzsuz şartlar altında her iki çeşitte de bitki başına düşen yaprak alanı ve bitki biyokütlesi epiBL uygulaması ile artmıştır. Tuzlu şartlar altında ise, epiBL sadece tuza tolerant çeşitte, gelişimi olumlu etkilemiştir. İki buğday çeşidinde de tuz stresi fotosentetik oranı azaltmış, bu engelleyici etki epiBL kullanımı ile önemli derecede iyileşme göstermiştir. SOD,

POX, CAT gibi antioksidan enzim aktiviteleri, her iki çeşitte tuz stresi ile artarken, epiBL uygulaması antioksidan sistemde farklı etkiler göstermiştir. SOD aktivitesi epiBL uygulaması ile iki çeşitte değişmezken, POX ve CAT aktiviteleri tolerant çeşitte artış göstermiştir. Ali vd. (2008), aynı buğday çeşitlerini kullandıkları çalışmalarında, yüzey sterilizasyonundan sonra tohumları, 0 ve 150 mM NaCl ile 0, 0.052, 0.104, 0.156  $\mu$ M epiBL içeren yarı güçlü Hoagland çözeltisi ile sulayarak 1 hafta çimlenmeleri için petri kaplarında tutmuşlardır. Fideler, hidroponik kültüre transfer edilerek 45 gün kültürde bırakılmıştır. Öncelikle epiBL uygulaması, her iki buğday çeşidinde bitki gelişimi ve tane verimini artırmıştır ve tuz stresi ile indüklenen bitki gelişimi ve tane verimliliği inhibisyonunu engellemiştir. 0.052  $\mu$ M epiBL uygulaması total tane verimliliği ve 100 tane ağırlığını tuzlu şartlarda arttırmıştır ve araştırmacılar total tane verimliliğinin, epiBL etkisi ile tanelere daha fazla fotoasimilantların taşınımı sonucu tane boyutundaki artışla ilişkilendirmişlerdir. Son olarak, iki çeşitte gelişimin artışının, epiBL uygulamasının fotosentetik kapasiteyi artırması ile ilgili olduğu belirtilmiştir.

Arora vd. (2008), mısır (*Zea mays* L.) bitkilerinde tuz etkisi ile ortaya çıkan oksidatif stres üzerine 28-homoBL'nin etkisini araştırmışlardır. Yüzey sterilizasyonu yapılan tohumlar, farklı konsantrasyonlarda (0,  $10^{-8}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-4}$  mM) hazırlanan homoBL çözeltilerinde 12 saat bekletilmiştir. Tohumlar, farklı dozlarda (0, 25, 50, 75 mM) tuz tatbik edilmiş toprak bulunduran bloklanmış tarlaya ekilmiş ve 30 günlük gelişimleri değerlendirilmiştir. HomoBL uygulanmış bitkilerde, antioksidan enzim aktivitesi ve protein içeriği artmıştır. Sadece tuz stresi şartlarında enzim aktivitesi iyileşmesine karşın, lipid peroksidasyonu artmış ve protein içeriği azalmıştır. Bununla birlikte homoBL'nin ön uygulaması, lipid peroksidasyonunu düşürmesi ve protein konsantrasyonunu arttırmasının yanında antioksidatif enzim aktivitesini de arttırmıştır. Elde edilen bu sonuçlar, tuz stresine maruz kalan mısır bitkilerinde ortaya çıkan oksidatif stresini homoBL'nin hafiflettiğini göstermiştir. El-Khallal vd. (2009), tuz stresi altındaki mısır bitkilerinde brassinolid (BL) ve salisilik asit uygulamalarının antioksidan enzim aktivitesi, hormonal denge ve protein profilleri üzerine etkilerini çalışmışlardır. Yüzey sterilizasyonundan sonra tohumlar 3 gruba ayrılmış ve 12'şer saat distile su, 0.25 ppm BL ve 0.15 ppm Salisilik Asit (SA) çözeltilerinde bekletilmişlerdir. 24 saat kurutulduktan sonra toprak içeren saksılara



ekilmiştir. Saksılar 0, 50 ve 100 mM NaCl çözeltileri ile sulanmışlardır. Bitkilerin yapraklarına distile su, BL ve SA ile spreyleme yapılmıştır. Tohumu ıslatma ve yapraktan spreyleme yöntemi ile ekzojen uygulanan BL ve SA, tuz stresi altında büyüyen mısırdaki indüklenen oksidatif stresi azaltmıştır. SOD, POX, CAT, APX gibi antioksidan enzim aktiviteleri, stres altında artış göstermiştir. BL uygulamalı bitkilerde en yüksek aktivite kaydedilmiştir. Tuz stresi, IAA (Indol-3-asetik asit), GA<sub>3</sub>, zeatin içeriklerinde keskin düşüşe neden olurken, ABA (absisik asit) içeriğini arttırmıştır. Tuzlu şartlarda BL ve SA uygulamaları, hormon düzeylerini arttırmıştır. 50 mM tuz stresinde BL ve SA, total çözülebilir protein ve nükleik asit (DNA ve RNA) içeriğini arttırmıştır. Mısır sürgünlerinin protein profilleri, tuz toleransında aktif rol oynayan spesifik polipeptitlerin sentezini arttırmasının yanı sıra tuz stresi ile indüklenen proteinlerin ifadesinin düzenlendiğini ortaya koymuştur.

Houimli vd. (2010), biber (*Capsicum annuum* L.) Beldi çeşidinde, gelişim, klorofil, elektrolit kaybı ve prolin içeriği gibi fizyolojik parametrelerle tuz toleransı üzerine epiBL'nin rolünü araştırmışlardır. Tohumlar torf içeren viyollere ekilmiş ve 2. gerçek yaprakları çıktıktan sonra uniform fideler torf içeren saksılara aktarılmıştır. Transplantasyondan 7 gün sonra fideler 4 g/l NaCl çözeltisi ile sulanmış ve 0 ile 0.5 mg/l epiBL uygulaması spreyleme yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Tuz ve epiBL uygulamasından 28 gün sonra bitkiler hasat edilmiştir. Sonuçta, tuz stresi altında biyokütle ve klorofil içeriği önemli derecede azalmış, elektrolit kaybı ve prolin içeriği ise artış sergilemiştir. Bununla birlikte epiBL uygulaması, test edilen parametrelerde tuzun kötü etkilerini iyileştirmiştir. Daha önceki çalışmalarla ekzojen uygulanan epiBL'nin, stres altındaki bitkilerde gelişimi arttırdığı ve hücrel membran bütünlüğünü koruduğu doğrulanmıştır.

Shahid vd. (2011), bezelye (*Pisum sativum* L.) Climax çeşidinde tuz stresine karşı 24-epiBL etkisini çalışmışlardır. Tohumlar yüzey sterilizasyonundan sonra 3 sette ayrılmıştır. 1. sette tohumlar 4'er saat distile su, 5 ve 10 µM epiBL ile 1 ve 10 mM NaCl çözeltilerinde bekletilmiştir. 2. sette tohumlar önce 2 saat NaCl sonrasında 2 saat epiBL çözeltilerinde bekletilmişlerdir. 3. sette tohumlar, önce 2 saat epiBL sonrasında 2 saat NaCl çözeltilerinde tutulmuşlardır. Tohumlar uygulamalardan sonra kum içeren saksılara ekilmiş ve 90 gün sonra bitkiler elde edilmiştir. Tohum

çimlenmesinde, tohumlar sterilizasyondan sonra NaCl ve epiBL çözeltileri uygulandıktan sonra filtre kağıdı içeren petri kaplarında 5 gün tutulmuşlardır. 4 saat epiBL çözeltisinde ıslatılan tohumların çimlenmesi, gelişen embriyoların eksen (plumula+radikula) boyu, sürgün ve kök gelişiminde artış gözlenmiştir. Fide döneminde, 10 µM epiBL uygulamasında, yaş ve kuru ağırlık, fide boyu (sürgün+kök), fotosentetik oran, stoma iletkenliği, total klorofil içeriği, prolin içeriği, SOD, POX, CAT, nitrat redüktaz, nitrit redüktaz aktivitesi kontrole (sadece suda bekletme) göre önemli artış sergilemiştir. Benzer şekilde daha ileriki gelişim döneminde (10 µM epiBL ile ön muameleden gelişen bitkilerde), kuru ağırlık, fizyolojik gelişimler, enzimatik aktiviteler, yaprakta prolin içeriği, kökteki nodül sayısı, köklerin nodül kuru ağırlığı, tohum verimliliği, tohum sayısı ve tohum protein içeriği artmıştır. Tuz stresine maruz kalan bitkilerde, tüm morfo-fizyolojik ve enzimatik özelliklerde (nitrat ve nitrit redüktaz aktiviteleri) azalma gözlenirken, prolin içeriği ve antioksidan enzim aktivitelerinde artış belirlenmiştir. Bununla birlikte, tuz stresi ile indüklenen etkiler, önce veya sonra epiBL uygulaması ile azalma göstermiştir.

Ding vd. (2012), tuz stresi altındaki patlıcan (*Solanum melongena* L.) fidelerinde büyüme ve gelişme, oksidatif hasar, antioksidan sistem ve iyon içeriği üzerine ekzojen epiBL uygulamasının etkisini araştırmışlardır. Sera koşullarında yetiştirilen fideler 2 günde bir Hoagland çözeltisi ile sulanmışlardır. Bitkilerin 4. veya 5. gerçek yaprakları çıktığında Hoagland çözeltisine 90 mM NaCl ve farklı dozlarda (0, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2 mg/dm<sup>3</sup>) epiBL eklenerek 1 hafta boyunca sulamaya devam edilmiştir. EpiBL (özellikle 0.05 mg/dm<sup>3</sup> dozu), NaCl stresinin neden olduğu büyüme baskılamasını engellemiş, elektrolit kaybı, süperoksit üretimi, MDA ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içeriğini azaltmıştır. EpiBL uygulaması, SOD, guaiakol peroksidaz, CAT, APX aktivitesi, askorbik asit ve indirgenmiş glutatyon içeriğini arttırmıştır. Tuz stresine karşı epiBL, Na<sup>+</sup> ve Cl<sup>-</sup> içeriğini azaltmış, K<sup>+</sup> ve Ca<sup>2+</sup> içeriği ile K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> ve Ca<sup>2+</sup>/Na<sup>+</sup> oranını arttırmıştır.

Hayat vd. (2012), *Brassica juncea* L. Varuna çeşidinde tuz stresi varlığında ve yokluğunda homoBL uygulamasının etkisini çalışmışlardır. Tohumlar yüzey sterilizasyonundan sonra toprak içeren saksılara ekilmiştir. Ekimden 6 gün sonra 4.2

$\text{dsm}^{-1}$  NaCl toprağa ilave edilmiştir. Ekimden 29 gün sonra homoBL ( $10^{-8}$  M) spreyleme ile uygulanmıştır. Ekimden 30 gün ve 45 gün sonra bitkiler hasat edilmiştir. Tuzluluk, bitki gelişimi, gaz değişimi parametrelerini önemli derecede azaltmış, yapraklardaki prolin içeriği ve elektrolit kaybını arttırmıştır. Ekimden 30 ve 45 gün sonra hasat edilen bitkilerde homoBL, bahsi geçen parametreler üzerinde olumlu etkiler sergilemiştir. Tuz stresi tarafından oluşan toksik etkiler, ekimden 45 gün sonra hasat edilen bitkilerde homoBL uygulaması ile ortadan kalkmıştır.

### **1.2.2. Tuz stresine karşı BR'lerin ve diğer bazı kimyasalların kullanıldığı in vitro çalışmalar**

İn vitro hücre ve doku temelli sistemler, klonal çoğaltım, genetik mühendisliği ve değerli metabolitlerin üretimi gibi ticari uygulamalar ve deneysel araştırmalarda muazzam potansiyele sahiptirler (Neelakandan ve Wang, 2012). Ayrıca, bitki hücre ve doku kültürü metotları, bitkilerde tuzluluk mekanizmalarının ve stres toleransının ortaya çıkarılmasında oldukça yararlı olabilmektedir (Akıncı ve Şimşek, 2004; Yokaş vd., 2008). Çünkü uniform ve düzenli olan in vitro sistemler, gerekli olan değişmezliği sağlamakta ve kısa süreçte bitkilerde tuz toleransı için başarılı seleksiyona izin vermektedir. Ayrıca hücre kültürü teknikleri, tuz toleransının fizyolojisi hakkında temel sorulara cevap vermesi bakımından da önem arz etmektedir (Shibli vd., 2007). İn vitro kültürler, toprak ve çevresel faktörlerin karmaşıklığını ortadan kaldırarak etkili bir alternatif ortam sağlamaktadır. Ayrıca, hücre ve doku kültürü teknikleri, iki farklı in vitro kültür yaklaşımını (İlk yaklaşım, kültüre alınmış hücrelerden mutant hücre hatlarının seçimi ve bu hücrelerden bitki rejenerasyonudur. İkinci yaklaşım ise, tuz toleransı için bitki germplazmalarının in vitro taramasıdır) kullanarak tuza tolerat bitkilerin elde edilmesinde kullanılmaktadır (Hassan vd., 2008). Biyotik ve abiyotik stres, tarımı ve verimliliği olumsuz etkileyen en önemli tehdit olmasından dolayı, strese tolerat bitkilerin geliştirilmesi, verimliliği arttırmada kritik bir öneme sahiptir. Son yıllarda, in vitro seleksiyona dayanan doku kültürü çalışmaları strese tolerat bitkilerin geliştirilmesinde uygulanabilir ve en etkili araçlar olarak kabul edilmektedir (Rai vd.,

2011). Tuz stresinin etkilerini belirlemeye yönelik olarak farklı bitkilerde, *Lycopersicon esculentum* Mill. (Cano vd., 1998; Dorion vd., 1999; Rodriguez-Rosales vd., 1999; Mercado vd., 2000; Talano vd., 2003; El-Meleigy vd., 2004; Hassanein, 2004; Amini ve Ehsanpour, 2005; Amini ve Ehsanpour, 2006; Mohamed vd., 2007; Shibli vd., 2007; Hassan vd. 2008; Yokaş vd., 2008; Aazami vd., 2010; Abu-Khadejeh vd., 2011; Mohamed ve Ismail, 2011; Mohamed vd., 2011; Smolik vd., 2011), *Medicago sativum* L. (Noaman ve Ahmad, 2004), *Brassica napus* L. (Chamandoosti, 2007), *Vigna radiata* L. (Hassan vd. 2008), *Citrus spp.* (Montoliu vd., 2009), *Triticum durum* Desf. (Koyuncu, 2012) ve *Triticum aestivum* L. (Benderradji vd., 2012) türlerinde farklı in vitro kültür tekniklerinin kullanıldığı çalışmalar mevcuttur. Buna karşılık, bitkilerde tuz stresine karşı BR'lerin kullanıldığı in vitro çalışmalar mevcut olsa da sınırlı sayıda kalmıştır. Anuradha ve Rao (2001), tuzlulukla indüklenen çeltikte (*Oryza sativa* L.) çimlenme ve fide gelişiminin inhibisyonu üzerine 24-epiBL'nin etkisini araştırmışlardır. Yüzey sterilizasyonundan sonra tohumlar, 24 saat boyunca distile su (kontrol), 150 mM NaCl, 150 mM NaCl+0.5 µM epiBL, 150 mM NaCl+1 µM epiBL, 150 mM NaCl+3 µM epiBL çözeltilerinde bekletilmişlerdir. Tohumlar nemli Whatman No:1 filtre kağıdı içeren petri kaplarında kültüre alınmışlardır. 2 gün sonra test çözeltileri eklenmiş ve 7 gün sonra kültürler boşaltılmıştır. Sonuç olarak, tuz stresinin neden olduğu çimlenme ve fide gelişiminin engelleyici etkisini BR'ler ortadan kaldırmıştır. Tuz stresi altında BR uygulaması ile fide gelişimi aktivasyonu, çözülebilir protein ve nükleik asit düzeylerindeki artış ile ilgili bulunmuştur. Nunez vd. (2003), NaCl eklenen kültür ortamında büyüyen çeltikte antioksidan enzimler üzerine BR analoglarının etkisini çalışmışlardır. Yüzey sterilizasyonu yapılan tohumlar MS ortamına ekilmişlerdir. İlk olarak 6 günlük steril fideler 75 mM NaCl ve BR analogu olan BB-16 (0, 0.001, 0.01mg/dm<sup>3</sup>) içeren MS ortamında kültüre alınmışlardır. 16 gün sonra analiz için sürgünler elde edilmiştir. İkinci olarak 3 günlük steril fideler 3 farklı dozda BR analogu içeren MS ortamına aktarılmışlardır. 4 gün sonra sürgünler 75 mM NaCl içeren MS ortamına transfer edilmişlerdir. 14 gün sonra bitkiler in vitro kültürlerden boşaltılmışlardır. 0.01 mg/dm<sup>3</sup> BB-16 içeren ortamdaki 16 günlük fidelere, SOD, CAT, GR enzim aktivitelerinde önemli bir artış ve APX enzim aktivitesinde hafif bir artış gözlenmiştir. 0.001 mg/dm<sup>3</sup> dozunda 4 gün BR analoguna maruz kalan

fidelerde, sadece SOD ve CAT enzim aktivitelerinde artış olmuştur. Araştırma sonucunda doğal BR'lerin yan zincirindeki modifikasyonla oluşan BB-16 analogunun, tuz stresine toleransta rol oynayan anahtar antioksidan enzimlerin aktivitesinde değişikliklere neden olduğu saptanmıştır.

Bajguz (2000), yeşil alg *Chlorella vulgaris*'de, çeşitli ağır metallerin (bakır, kurşun, kadmiyum, çinko) hücre gelişimi ve bu ağır metallerin hücrelerde birikimi üzerine 24-epiBL'nin etkisini araştırmışlardır. *Chlorella*, sıvı hücre kültüründe üretilmişlerdir ve alg kültürlerine epiBL ( $10^{-8}$  M) ve nitrat formundaki ağır metaller ( $10^{-6}$ - $10^{-3}$  M) eklenmiştir. Ağır metallerin tekli kullanımına göre  $10^{-6}$ - $10^{-4}$  M dozlarının epiBL ile kombinasyonu, hücre sayısı üzerine daha güçlü stimule edici etki sergilerken, aynı zamanda hücrelerin ağır metal birikimi engellenmiştir. EpiBL'nin alg hücreleri tarafından yapılan ağır metal birikimindeki engelleyici etkisi sırası ile çinko>kadmiyum>kurşun>bakır şeklinde olmuştur. Bu çalışmaya paralel olarak aynı araştırmacı tarafından yapılan diğer bir çalışmada, ağır metal stresi (bakır, kurşun, kadmiyum) altındaki *Chlorella vulgaris* hücre kültürlerinde BL'nin ( $10^{-8}$  M) gelişim ve antioksidan sistem üzerine etkisi araştırılmıştır. Ağır metal stresi altında, alg hücrelerinde total askorbat ile indirgenmiş glutatyon içeriği ve antioksidan enzim aktivitelerinde (CAT, APX, GR, SOD) konsantrasyona bağlı artış gözlenmiştir. Ağır metal stresi altındaki alg kültürlerinde, non-enzimatik ve enzimatik sistemi BL aktive etmiştir. Sonuç olarak ağır metal stresine yanıtta, BL'nin önemli rol oynadığı belirlenmiştir.

İn vitro kültürlerde tuz stresine karşı BR'lerin kullanıldığı çalışmaların yanı sıra bitkilerin tuz toleransını geliştirmek için farklı maddelerin kullanımı da söz konusudur. Akıncı ve Şimşek (2004), salatalık (*Cucumis sativus* L.) bitkisinde embriyo kültürü ile potasyum ve kalsiyumun tuz stresi üzerine etkilerini çalışmışlardır. Yüzey sterilizasyonu yapıldıktan sonra tohumlar, testalarından uzaklaştırılmışlardır. Embriyolar, 1 mg/l 2,4-D+1 mg/l Kin ilaveli ve farklı konsantrasyonlarda NaCl (0, 100, 150 mM), K<sup>+</sup> (0, 5, 10, 18, 28 mM) ve Ca<sup>2+</sup> (0, 5, 10, 15, 20, 25 mM) içeren MS ortamında kültüre alınmışlardır. NaCl, kök (köklenme yüzdesi, kök sayısı, kök boyu ve kök yaş ağırlığı) ve sürgün (sürgün boyu, sürgün yaş ağırlığı, yaprak yaş ağırlığı, tüm bitki yaş ağırlığı) gelişimini, kök/sürgün boyu

indeksi ve kök/bitki yaş ağırlığı indeksini olumsuz etkilemiştir. Ancak, NaCl uygulaması salatalık embriyo kültüründe kallus indüksiyonunu arttırmıştır. Tuz stresine karşı  $K^+$  ve  $Ca^{2+}$  uygulamaları, kallus indüksiyonunu azaltmıştır. Ancak, özellikle tuz stresine karşı 10 mM  $KNO_3$  ve 20 mM  $Ca(NO_3)_2$  kullanımı, kök ve sürgün gelişimini olumlu etkilemiştir.

Sajid ve Aftab (2012), ekzojen salisilik asit uygulaması ile patateste (*Solanum tuberosum* L.) tuz toleransını geliştirmek amacıyla ekonomik olarak önemli olan Cardinal ve Desiree çeşitlerine ait 60 günlük in vitro fidelerin tek nodlu eksplantları (1 cm), farklı dozlarda NaCl (0 ve 60 mM) ve salisilik asit (0.125, 0.25, 0.50, 0.75 mM) içeren MS ortamında kültüre alınmıştır. İnokülasyondan 60 gün sonra büyüme (sürgün boyu, sürgün sayısı, kök boyu, kök sayısı, nod sayısı, yaş ağırlık, kuru ağırlık) ve biyokimyasal (protein içeriği) parametreler değerlendirilmiştir. Genel olarak, in vitro gelişen patates fidelerinde tuz uygulaması, biyokimyasal parametrelerin yanı sıra gelişimi de olumsuz etkilemiştir. Oysa, ekzojen uygulanan salisilik asitin düşük dozları her iki patates çeşidinde gelişimi arttırmıştır. Bu sonuçlar, düşük ile orta derecede uygulanan salisilik asitin, gelecekte tuzlu şartlar altında patates bitkisinin verimliliğini arttırmada yararlı olabileceği hususunda ipucu vermiştir.

El-Enany (1995), tuz stresi altındaki domates in vitro kültürlerinde sürgün organogenesizi ve protein sentezi üzerine prolinin etkisini araştırmışlardır. Tohumlar, Murashige-Skoog (MS) besin ortamında çimlendirilmiş ve 10-12 günlük steril fidelerin kotiledon ve hipokotil eksplantları,  $6 \text{ mg/dm}^3$  IAA+ $5 \text{ mg/dm}^3$  Kin+ $40 \text{ mg/dm}^3$  Adenin sülfat içeren MS ortamında kültüre alınmıştır. Bu besin ortamına NaCl (0, 25, 50, 100, 150 mM) ve prolin ( $100 \text{ mg/dm}^3$ ) ilave edilmiş ve üç haftalık kültürde yüksek tuz (100 ve 150 mM) sürgün rejenerasyonunu inhibe etmiş, yaş ve kuru ağırlığı azaltmıştır. NaCl'ye karşı prolinin kullanımı tuzun engelleyici etkisini ortadan kaldırarak sürgün rejenerasyonunu arttırmıştır. SDS-PAGE analizleri prolinin, ekstra yeni polipeptitlerin birikimini indüklediğini ortaya koymuştur. Aynı şekilde tuz stresine karşı prolinin kullanımı, farklı polipeptit birikimini arttırmıştır. Araştırmacılar çalışmalarında tuz stresine hücrel adaptasyonda ve protein birikiminde prolinin direk veya indirek olarak önemli rol oynayabileceğini belirtmişlerdir.

### 1.2.3. Diğer abiyotik stres faktörlerine karşı BR'lerin kullanıldığı in vivo çalışmalar

Tuz stresinin yanı sıra yüksek sıcaklık, düşük sıcaklık, kuraklık, oksidatif stres, ağır metal, hipoksiya (O<sub>2</sub> yetersizliği) stresi ile çeşitli pestisitlere ve farklı kimyasal maddelere karşı BR'lerin kullanıldığı çalışmalar oldukça yaygındır. Mazorra vd. (2002), farklı sıcaklık şartlarında yetiştirilen domates bitkilerinin antioksidan enzim aktiviteleri üzerine BR'lerin etkisini araştırmışlardır. Domates tohumları petri kaplarındaki distile su ile sulandırılmış filtre kağıtları üzerinde oda sıcaklığında çimlendirilmişlerdir. Domates fideleri torf:zeolit karışımı bulunan saksılara aktarılmış ve saksılar iklimlendirme dolabına yerleştirilmiştir. 20 günlük fidelerin 1 cm çapındaki yaprak diskleri, distile su (kontrol), 10.60 nM epiBL ve 2.12 nM polihidroksile spirostanik BR analogu (MH5) çözeltilerinde 24 saat bekletilmiş, sonrasında 2 saat boyunca 40°C ve 25°C'de bekletilen yaprak disklerinde SOD, CAT, POX aktiviteleri belirlenmiştir. Sonuç olarak kullanılan BR'ler her iki sıcaklıkta SOD aktivitesini arttırmıştır. POX aktivitesi, 25°C'de değişmezken 40°C'de artmıştır. CAT aktivitesindeki değişimler, BR yapısına, dozuna ve sıcaklığa büyük ölçüde bağlı kalmıştır. Sonuçlar, enzimatik antioksidanların indüksiyonu nedeni ile sıcaklık stresi ile ortaya çıkan hücre hasarı azaltmada epiBL ve MH5'in olası rolünü desteklemiştir.

Singh ve Shono (2005), domatesin termotoleransı üzerine 24-epiBL'nin fizyolojik ve moleküler düzeyde etkisini araştırmışlardır. 25°C serada yetiştirilmiş olan 4 haftalık sağlıklı fidelere farklı dozlarda (1, 10, 20 µM) hazırlanan epiBL'nin çözeltileri, spreyleme ile uygulanmıştır. EpiBL uygulamasından 1 hafta sonra bitkiler, 45°C'de 2-3 saat tutulduktan sonra tekrar normal koşullara (25°C) alınmışlar ve bu koşullarda 1 hafta tutulmuşlardır. Araştırmacılar uygulamasız bitkilere göre epiBL uygulamalı domates bitkilerinin, yüksek sıcaklığa daha tolerant olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca, epiBL uygulamalı bitkiler daha iyi fotosentetik etkinlik göstermişlerdir. Aynı zamanda yüksek sıcaklıkta epiBL uygulaması, daha yüksek in vitro polen çimlenmesi, artan polen tübü gelişimi, düşük polen patlamasına neden olmuştur. Moleküler çalışmanın sonucunda ise, epiBL uygulamalı bitkilerde normal koşullarda (25°C'de) mitokondriyal düşük sıcaklık şoku proteinlerinin ayrıcalıklı olarak

biriktirilmediği, oysa sıcaklık stresinde epiBL uygulaması ile bu proteinlerin daha fazla biriktirildiği belirlenmiştir.

Ogweno vd. (2010), domates yapraklarında fotoinhibisyonla indüklenen fotosentez azalması üzerine absisik asit (ABA), sitokinin ve BR'lerin etkisini araştırmışlardır. 9021 domates çeşidi tohumları vermikulite ekilmiş ve 3 hafta sonra gündüz/gece sıcaklığı 25°C/15°C ayarlanarak çalışma, 12 saat karanlık-12 saat yüksek ışık şiddetinde devam ettirilmiştir. Çimlenmeden 8 hafta sonra orta yapraklar seçilmiş ve 15 ml'lik 0.1 M CaCl<sub>2</sub> ile 24-epiBL (0.01, 0.1, 1.0 mg/l), bir sitokinin tipi olan fenilürea (0.1, 1.0, 10.0 mg/l) ve ABA (1.0, 10.0, 100.0 mg/l) içeren çözeltilerde 28°C'de orta ışık şiddetinde 6 gün inkübe edilmişlerdir. Sonuç olarak 28°C'de orta ışık şiddetinde bile domates yapraklarında net fotosentetik oran ile PS II'nin kuantum etkinliğindeki keskin düşüş ile ilgili olarak fotoinhibisyon gözlenmiştir, ancak bitki büyüme düzenleyicilerinin kullanımı (1 mg/l ABA, 0.1 mg/l fenilürea, 0.01 mg/l epiBL) ile bu parametreler önemli derecede azalmıştır. Yapraklarda SOD ve APX aktivitesi, 1-100 mg/l ABA, 0.1-10 mg/l fenilürea, 0.01-1.0 mg/l epiBL dozlarında artış göstermiştir. CAT ve guaicol peroksidaz aktivitesi, artan dozlarda epiBL kullanımı ile artmıştır, oysa fenilürea ve ABA'nın artan dozlarında ise azalma sergilemiştir. MDA içeriği, fenilüreanın artan dozlarında, ABA'nın sadece 1.0 mg/l ve epiBL'nin sadece 0.01 mg/l dozundaki kullanımı ile azalmıştır. Sonuç olarak fotoinhibisyonla indüklenen fotosentezdeki azalış, epiBL, fenilürea ve ABA tarafından önemli derecede azaltılmıştır.

Fuji ve Saka (2001), düşük sıcaklıktaki Nipponbare çeltik çeşidinde, yaprak ayası hücrelerinin uzaması, çimlenme ve fide gelişimi üzerine BR'nin destekleyici etkisini araştırmışlardır. Çalışmada, çeltik fidelerinin yaprak segmentleri kullanılarak düşük sıcaklıkta lamina eğiklik testi, BR'lerin (kastasteron ve homoBL) tohumu uygulaması, petri kaplarında çimlendirme ve dış koşullara ekim ve genç fidelerin sürgünlerine spreyleme çalışmaları yapılmıştır. HomoBL ve kastasteron, 15°C'de hücre uzamasını arttırmıştır. Aynı sıcaklıkta, BR ve IAA kombinasyonu da hücre uzamasını sinerjistik olarak arttırmıştır. İlk 24 saat kuru tohumların BR çözeltisinde ( $2 \times 10^{-8}$  M) bekletilmesi erken fide gelişimini arttırmıştır. Bu uygulama, düşük sıcaklıkta (15°C) serada saksılara direk ekimden sonra çimlenme oranı ve fide



gelişimini de olumlu etkilemiştir. Düşük sıcaklıkta, 4. gerçek yaprak safhasındaki fidelere spreyleme şeklindeki BR uygulaması, kök ve toprak üstü bitki kısımlarında boyu ve yaş ağırlığı arttırmıştır. Elde edilen sonuçlar, BR'lerin düşük sıcaklık stresi altındaki genç çeltik fidelerinde hücre uzamasını, tohum çimlenmesini ve erken fide gelişimini indüklediğini göstermiştir.

Behnamnia vd. (2009), domateste kuraklıkla indüklenen oksidatif strese karşı ekzojen epiBL uygulamasının etkisini çalışmışlardır. Tohumlar, çimlenmesi için komposta ekilmiş ve 2. gerçek yapraklı fide döneminde, serada, kum:toprak:torf içeren saksılara aktarılmışlardır. Fideler her gün Hoagland çözeltisi ile sulanmış ve 3 yapraklı dönemde 5 günlüğüne kontrollü iklimlendirme dolabına alınmışlardır. Adaptasyondan sonra 0.01  $\mu\text{M}$  ve 1  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarda epiBL çözeltisi spreyleme ile yapraklara 3 gün boyunca uygulanmıştır. Kuraklık stresi üç düzeyde (düzenli sulama: kontrol, 3 gün susuz ve 5 gün susuz) uygulanmış ve 4. yapraklar hasat edilerek biyokimyasal analizler yapılmıştır. Sonuç olarak, lipit peroksidasyonu ve  $\text{H}_2\text{O}_2$  içeriği, BR uygulanmış bitkilerde azalmıştır. Stres enzimlerinin (APX, POX) bazı bantlarının yoğunluğu, kuraklık stresi altındaki bitkilerle kıyaslandığında strese maruz kalan ve epiBL uygulanan bitkilerde farklı olduğu gözlenmiştir. Askorbat, karotenoidler, prolin gibi antioksidatif bileşiklerin içerikleri ve antioksidan enzimlerin aktivitesi, BR ön uygulamasını takiben kuraklık stresine maruz kalan bitkilerde artış göstermiştir. Yapılan bu çalışma ile, epiBL ön uygulamasının MDA içeriğinde azalma ile birlikte antioksidan enzimlerde artışa neden olduğu ve su stresi ile ortaya çıkan hasarı BR'lerin azalttığı vurgulanmıştır.

Farooq vd. (2009), kuraklık stresi altındaki Super-B-basmati çeltik çeşidinde BR'lerin su ilişkisi ve gaz değişimi üzerine etkilerini araştırmışlardır. Yüzey sterilizasyonunu takiben tohumlar, 28°C'de 2 gün homoBL ve epiBL (0.01 $\mu\text{M}$ ) çözeltilerinde bekletilmişlerdir. Tohumlar, toprak içeren saksılara ekilmiş ve 3 hafta sonra (4. yaprak safhası) fideler kuraklık stresine maruz bırakılmışlardır. Yapraklara foliar uygulama için aynı dozdaki BR çözeltileri, tohum ekiminden 4 hafta sonra (5. yaprak safhası) yapraklara sprey şeklinde uygulanmış ve bitkilerin sulanması Hoagland çözeltisi ile haftada bir yapılmıştır. Kuraklık stresi uygulamasından 3 hafta sonra bitkiler hasat edilmiştir. Kuraklık stresi, yaş ve kuru ağırlığı azaltmıştır.

Ekzojen uygulanan BR'ler, net CO<sub>2</sub> asimilasyonunu, su kullanım etkinliğini, yaprak su durumunu, membran özelliklerini, serbest prolin, antosiyaninler ile çözülebilir fenoliklerin üretimini arttırmış, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve MDA içeriğini azaltmıştır. Sonuç olarak, BR uygulamaları yapraktaki su ekonomisini ve CO<sub>2</sub> asimilasyonunu geliştirmiş ve kuraklığa toleransı arttırmıştır. Çalışmada, yaprağa uygulama tohumu göre daha iyi etki göstermiş ve kullanılan iki BR'den epiBL kuraklığa karşı geliştirilen toleransta daha etkili bulunmuştur.

Cd toksisitesi ile yapılan bir başka çalışmada Hasan vd (2008), nohut (*Cicer arietinum* L.) Uday çeşidinde, antioksidanların stimülasyonu yoluyla homoBL'nin etkisini çalışmışlardır. Tohumlar yüzey sterilizasyonunu takiben toprak içeren saksılara ekilmişlerdir. 15 günlük fidelere farklı dozlarda (0, 50, 100, 150 µM) CdCl<sub>2</sub> ve fideler 30 günlük iken spreyleme ile homoBL uygulanmıştır. Ekimden 90 gün sonra büyüme ile ilgili ve biyokimyasal analizler yapılmıştır. Sonuçta artan Cd konsantrasyonlarına bağlı olarak bitki yaş ve kuru ağırlığı, nodül sayısı, nodül yaş ve kuru ağırlığı, nodüllerin leghemoglobin, nitrojen ve karbonhidrat içeriği, yaprak klorofil içeriği, nitrat redüktaz ve karbonik anhidraz aktiviteleri azalırken, prolin içeriği ile CAT, POX, SOD aktiviteleri artmıştır. Çalışmada Cd tarafından ortaya çıkan olumsuz etkilerin homoBL etkisi ile azaltıldığı sonucuna varılmıştır. Hayat vd. (2010), domates K-25 ile Sarvodya çeşitlerinde Cd stresine karşı BR'lerin koruyucu etkisini araştırmışlardır. Tohumlar yüzey sterilizasyonundan sonra 100 µM CdCl<sub>2</sub> çözeltisinde 8 saat bekletilmişler ve bu uygulamalı tohumlar, toprak içeren saksılara ekilmişlerdir. Ekimden 59 gün sonra bitkiler, 10<sup>-8</sup> M homoBL ve epiBL çözeltileri ile spreyleneştir. Uygulamalı bitki örneklerinde, ekimden 60 ve 90 gün sonra çeşitli biyokimyasal analizler yapılmıştır. Her iki domates çeşidi, Cd stresine farklı yanıtlar vermiştir. K-25 çeşidi ile kıyaslandığında Sarvodya çeşidinde gelişim, fotosentetik etkinlik, nitrat redüktaz ve karbonik anhidraz enzimlerinin aktivitelerini Cd kısıtlamıştır. Antioksidan enzimlerin aktiviteleri, K-25 çeşidinde daha yüksek olmuştur. Cd stresi altında BR uygulaması, yüksek olan prolin içeriği ve antioksidan enzimlerin aktivitelerini daha fazla arttırmıştır. Sonuç olarak, BR'lerin spreyleme ile uygulanması, çeşitler tarafından daha iyi bir fotosentetik ve antioksidan performans göstererek Cd stresinin kötü etkilerini nötralize etmede daha iyi sonuçlar vermiştir.

Ali vd. (2008), *Vigna radiata* L. Wilczek (maş fasulyesi) T-44 çeşidinde alüminyum stresine karşı BR'lerin etkisini antioksidan sistem parametrelerinde incelemiştir. Sterilizasyonu yapılan tohumlar, kum içeren saksılara ekilmiş ve distile su ile sulanmışlardır. Çimlenmeden sonraki sulamalar, besin çözeltisi ile günlük olarak yapılmıştır. 1 haftalık fideler, besin çözeltisine eklenen farklı dozlardaki (0, 1, 10 mM)  $\text{AlCl}_3$  uygulamasına tabi tutulmuşlardır. 14 günlük fidelerin yaprakları,  $10^{-8}$  M epiBL ve  $10^{-8}$  M homoBL çözeltileri ile spreyleneştir. Tohum ekiminden 21 gün sonra uygulamalı bitkilerde yapılan gözlem ve analizlere göre, alüminyum stresi, bitki gelişimi, karbonik anhidraz aktivitesi, nispi su içeriği, su kullanım etkinliği, klorofil içeriği ve fotosentez oranında keskin düşüşe neden olmuştur. Yapraklarda antioksidan enzimlerin (CAT, POX, SOD) aktiviteleri ve kök ile yapraklarda prolin içeriği alüminyum stresi ile artış göstermiştir. Alüminyum stresine karşı BR'lerin kullanımı bu parametreleri iyileştirmiştir. Sonuç olarak, BR uygulamaları ile antioksidan sistemle ilgili olarak prolin içeriğinin iyileşmesi maş fasulyesinde alüminyum stresine toleransı sağlamıştır.

Kang vd. (2007), hipoksiya ( $\text{O}_2$  yetersizliği) stresi altındaki salatalık (*Cucumis sativus* L.) köklerinde, ROT, antioksidanlar ve antioksidan enzim aktivitelerindeki değişimler üzerine 24-epiBL'nin etkilerini araştırmışlardır. Hipoksiya stresine dayanıklı ve duyarlı çeşitlerinin tohumları, yüzey sterilizasyonundan sonra filtre kağıdı bulunan steril petri kaplarına yerleştirilmiş ve çimlenmeye kadar karanlıkta tutulmuşlardır. Çimlenen tohumlar, kuartz kumuna aktarılmışlardır ve yarı güçlü Hoagland çözeltisi ile sulanmışlardır. 2 gerçek yaprak taşıyan fideler seçilmiş, kökleri yıkandıktan sonra hidroponik koşullara transfer edilmişlerdir. 3 gerçek yapraklı dönemde bitkiler başlıca üç uygulamaya tabi tutulmuşlardır (i. Kontrol: güçlü havalandırma ile çözünmüş oksijen içeren yarı güçlü Hoagland çözeltisi ii. kontrol+ $10^{-3}$  mg/l epiBL iii. Hipoksiya stresi: az çözünmüş oksijen içeren yarı güçlü Hoagland çözeltisi iv. Hipoksiya stresi+ $10^{-3}$  mg/l epiBL). Uygulamadan 0, 2, 4, 6, 8 gün sonra analiz için bitkilerin kökleri örnek olarak alınmıştır. Hipoksiya stresi altındaki köklerde, ROT düzeyleri ve lipit peroksidasyonu önemli derecede artmıştır, ancak epiBL uygulaması, bu parametrelerdeki artışı inhibe etmiştir. EpiBL uygulaması, hipoksiya stresi altında bitki gelişimi, SOD, APX, GR aktivitesi ve askorbik asit içeriğinde önemli artışa neden olmuştur. Bu çalışmadan, hipoksiya

stresi ile bitki köklerindeki oksidatif hasarın epiBL tarafından büyük ölçüde azaltıldığı ve bitki toleransını geliştirdiği belirlenmiştir.

Petisitlerle indüklenen fotosentetik depresyonuna karşı 24-epiBL'nin etkisi salatalıkta araştırılmıştır. Tohumlar, toprak:perlit karışımına ekilmiş ve 4 yapraklı bitkilere 0.1 mg/l epiBL uygulaması spreyleme yöntemi ile yapılmış, farklı dozlardaki 9 çeşit pestisit uygulanmıştır. Pestisitler, net fotosentetik oranda azalma ve pekçok fitotoksik semptomlar oluşturmuştur. Ayrıca pestisitler, stoma iletkenliği, interselüler CO<sub>2</sub> konsantrasyonu ve PS II'nin maksimum kuantum etkinliğinde azalmaya neden olmuştur. Pestisitlere karşı epiBL kullanımı, net fotosentetik oranındaki inhibisyonu azaltmış ve PS II'nin etkinliğini arttırmıştır. EpiBL'nin antioksidan enzim aktivitesi ve CO<sub>2</sub> asimilasyon kapasitesini artırarak salatalık fidelerinin pestisitlere karşı dayanıklılığını arttırdığı sonucuna ulaşılmıştır (Xia vd., 2006).

Ahmed vd. (2013), domates Hezuo 903 çeşidinde fenantren (bitkilerin yaşadığı çevrede bol bulunabilen, bitkiler üzerinde olumsuz etkileri olan, karsinojen, kompleks bir hidrokarbon) stresinin iyileştirilmesinde 24-epiBL'nin etkisini araştırmışlardır. Tohumlar, torf+vermikulit karışımında çimlendirilmiş ve ekimden 3 hafta sonra fideler daha büyük kaplara aktararak Hoagland çözeltisi ile sulanmışlardır. Transferden 2 hafta sonra sürgünler, spreyleme yöntemi ile 0.1 µM epiBL çözeltisi uygulanmış ve ertesi gün besin çözeltisine 0 ve 300 µM fenantren eklenmiştir. Sonuç olarak, fenantren stresi, sürgün ve kök boyunu, sürgün ve kök yaş ağırlığını, klorofil a, klorofil b ve karotenoid içeriğini azaltmıştır. Ayrıca fenantren, MDA içeriği ve sekonder metabolizma ile ilgili enzimlerin (glutatyon-S-transferaz: GST), glikoz-6-fosfat dehidrojenaz (G6PDH), şikimeyt dehidrojenaz (SKDH), fenilalanin amino-lyaz (PAL), kinnamil alkol dehidrojenaz (CAD)) aktivitelerini arttırmıştır. *GST1*, *PPO*, *SKDH*, *PAL*, *CAD* genlerinin ekspresyon düzeyleri, fenantren tarafından indüklenmiştir. Fenantren stresine karşı epiBL kullanımı, büyüme, gelişim, biyokütle ve enzim aktivitesini arttırmıştır. Aynı şekilde *GST1*, *PPO*, *SKDH*, *PAL* ve *CAD* genlerinin transkripsiyon düzeylerinde daha fazla artış göstermiştir. MDA içeriği ise, epiBL kullanımı ile önemli derecede azalmıştır. Fenoller, flavonoidler ve antioksidan aktivitesi fenantren tarafından artırılırken, strese karşı bu parametreler epiBL ile daha da artış göstermiştir. Araştırma

sonuçlarına göre epiBL, domateste sekonder metabolizmayı düzenleyerek fenantren toleransını arttırmada önemli rol oynamaktadır.

#### **1.2.4. Diğer abiyotik stres faktörlerine karşı BR'lerin kullanıldığı in vitro çalışmalar**

Domateste tuz stresi dışında, in vitro kültür yöntemleri ile su eksikliği (Abu-Shama vd., 2005), kuraklık stresi (Roy vd., 2009), ozmotik stresin (Aazami vd., 2010) etkileri üzerine çalışmalar yapılmıştır. Farklı bitkilerde sıcaklık, soğuk, kuraklık, metal stresi gibi diğer abiyotik stres faktörlerine karşı BR'lerin kullanıldığı in vitro çalışmalar da mevcuttur. Dhaubhadel vd. (1999), *Brassica napus* (kanola) ve domates fidelerinin termotoleransı üzerine epiBL'nin etkisini araştırmışlardır. Yüzey sterilizasyonunu takiben kanola tohumları, Whatman No:3 filtre kağıtlarında hava ile kurutulduktan sonra 1µM epiBL içeren MS ortamında kültüre alınmışlardır. 14 günlük fideler 45°C yüksek sıcaklık şokuna maruz bırakılmış ve sonrasında 20°C'lik sıcaklıkta 7 gün tutulmuşlardır. Domates tohumları da yüzey sterilizasyonundan sonra filtre kağıdı ile suyu giderilmiş ve 1µM epiBL içeren MS ortamında kültüre alınmışlardır. 14 günlük fideler 45°C yüksek sıcaklığa maruz bırakılmış ve sonrasında 23°C'lik kültür sıcaklığına alınarak 7 gün daha kültürde tutulmuşlardır. Sonuç olarak, kanola ve domateste epiBL uygulaması ile letal sıcaklığa karşı toleransın arttığı ifade edilmiştir. Kanola fidelerinde, sıcaklık şoku proteinleri, kontrol sıcaklığında epiBL uygulaması ile ayrıcalıklı olarak biriktirilmemiştir. Ancak, sıcak stresinden sonra bu proteinlerin epiBL uygulaması ile daha yüksek oranda biriktirildiği belirlenmiştir. Çalışmanın sonuçları, sıcaklık şoku proteinleri ekspresyonunun epiBL ile indüklendiği hususunda ilk direk kanıt olmuştur.

Nassar (2004), in vitro kültüre alınmış Grande muz çeşidinin apikal meristemlerinden sürgün rejenerasyonun indüksiyonu ve rejenere sürgünlerin uzaması üzerine IAA veya izopentil adenin (2-ip) ile homoBL'nin etkisini araştırmışlardır. Kısa kümeler halinde bulunan apikal meristemler, hormonsuz veya 0.2 µM homoBL, 1 µM IAA ve 10 µM 2-ip'i yalnız veya kombine içeren MS ortamında kültüre alınmıştır. Ayrıca apikal meristemler, 0.2 µM homoBL çözeltisinde 24 saat tutulduktan sonra IAA veya 2-ip içeren MS ortamında da kültüre

alınmışlardır. 4 hafta sonra sürgün gelişimleri kaydedilmiş ve sürgünler 15 dakika veya 30 dakika süre ile 40°C veya 50°C sıcaklığa maruz bırakılmıştır. HomoBL, kontrole göre sürgün proliferasyonu üzerinde stimule edici etki göstermiştir. IAA tek başına kullanıldığında, homoBL'ye göre sürgün uzaması üzerinde daha az stimule edici etkiye sahip olmuştur. 2-ip ise, apikal meristemlerden, rejenere sürgün sayısı üzerine en yüksek stimule edici etki sergilemiştir. Bununla birlikte, sürgün uzamasındaki 2-ip aktivitesi, homoBL ve IAA'ya göre daha az olmuştur. HomoBL uygulamasını takiben IAA içeren ortamda gelişen sürgünlerin uzamasında sinerjistik etki gözlenmiştir. HomoBL ön uygulamasından sonra 2-ip ilaveli ortamda apikal meristemlerin kültüründen sürgün indüksiyonu ve sürgün uzamasını önemli derecede arttırmıştır. Sonuç olarak, homoBL'nin sıcak hasarı yüzdesini büyük oranda azalttığı ve önemli antistres etkiye sahip olduğu ifade edilmiştir. Muzla yapılan diğer bir çalışmada, sıcak stresine maruz kalan FHIA-18 çeşidine ait bitkiciklerde BR analogunun etkisi araştırılmıştır. Bitkicikler, BAP ilaveli likit MS ortamı kullanılarak geçici immersiyon biyoreaktörlerde mikroçoğaltımla üretilmiştir. İn vitro kültürün sonunda bitkiler, ex vitro şartlarına transfer edilmiştir. 4 hafta sonra bitkiler, 0.1 mg/l BR analogu çözeltisi ile spreyleneştir. 2 saat sonra her bir grup üçe ayrılarak 7°C, 27°C ve 34°C'de 72 saat bırakılmış ve 10 gün sonra ilgili gözlem ve analizler yapılmıştır. Sonuçta, 72 saat sonra 7°C'de ve 10 gün sonra 7°C ve 34°C'de tutulan bitkilerin canlılık yüzdesini BR analogunun kullanımı arttırmıştır. Tüm sıcaklıklarda BR analogunun uygulaması prolin içeriğini düşürürken, yaprak sayısı ve yaş ağırlığını arttırmıştır. 7°C ve 34°C'de BR analogunun kullanımı kök sayısı ve bitki boyunu arttırmıştır. Net fotosentetik oran, 24 saat sonra 34°C'de ve 7 gün sonra 27°C ile 34°C'de BR analogunun etkisi ile artış göstermiştir (Gonzales-Olmedo vd., 2005).

Janeczko vd. (2009), soğuk stresi altında (5°C ve 20°C) kültüre alınan kolza kallusunda şeker içeriği ve doymuş asit kompozisyonu üzerine 24-epiBL'nin etkisini çalışmışlardır. Tohumlar yüzey sterilizasyonundan sonra MS ortamında kültüre alınmıştır. 2 haftalık steril fidelerin 1 cm'lik hipokotil eksplantları 2 mg/dm<sup>3</sup> BAP+1 mg/dm<sup>3</sup> 2,4-Diklorofenoksi asetik asit (2,4-D) içeren MS ortamında kallus indüksiyonu için kültüre alınmışlardır. 2 hafta sonra kalluslar 10 nM BR ilaveli aynı içerikli MS ortamında kültüre alınmıştır. Kültürler iki gruba ayrılarak yarısı 5°C'de

diğer yarısı 20°C'de 2 hafta tutulmuşlardır. Çalışma sonucunda, BR etkisinin büyük ölçüde sıcaklığa bağlı olduğu belirlenmiştir. BR ilavesi, sadece 20°C'de tutulan kalluslarda şeker (sükroz, glikoz ve fruktoz) içeriğini arttırmıştır. 5°C'de BR'nin hafif farklı etkisi gözlenmiş, şeker içeriği soğukta artmasına karşın BR uygulaması ile azalmıştır. 20°C'de BR uygulaması fosfolipitlerin doymuş asit kompozisyonu üzerine benzer etki sergilemiştir. 5°C'de ise BR, fosfolipitlerin doymuş asit kompozisyonunu etkilememiştir.

Liu vd. (2009), *Brassicaceae* familyasına ait *Chorispora bungeana* türünün hücre süspansiyonunda, düşük sıcaklıkla indüklenen oksidatif hasara karşı BR'lerin etkisini çalışmışlardır. Steril yaprak eksplantları, kallus oluşumu için 4.0 mg/l GA<sub>3</sub>+0.2 mg/l Naftelen asetik asit (NAA)+0.2 mg/l 2,4-D ilaveli MS ortamında kültüre alınmış ve 2 haftada bir aynı ortamda alt kültür yapılmıştır. Alt kültürlerden, 0.2 mg/l 2,4-D+0.2 mg/l NAA+0.2 mg/l BAP+0.2 mg/l Kin ilaveli sıvı MS ortamında süspansiyon oluşturulmuştur. Besin ortamı haftada bir yenilenecek süspansiyonlar devam ettirilmiştir. 7 günlük stok kültür, 0.05 mg/l epiBL içeren MS ortamına aktarılmıştır. 4°C ve 0°C'de, 5 gün bekletilen hücreler filtreden geçirilerek ROT üretimi, lipit peroksidasyonu, antioksidan enzim aktivitesi ve antioksidan içeriği analizleri yapılmıştır. EpiBL uygulanmış hücreler, kontrole kıyaslandığında düşük sıcaklığa maruz kaldıktan sonra daha yüksek canlılık göstermişlerdir. Soğuk stresi altında, kültüre alınan hücrelerde ROT düzeyleri ve lipit peroksidasyonu artış göstermiş, epiBL uygulaması ile bu durum engellenmiştir. APX, CAT, POX, SOD gibi antioksidan enzimlerin aktiviteleri, soğuk uygulaması süresince artmıştır, epiBL uygulaması ile bu artış daha önemli olmuştur. EpiBL uygulaması soğuk stresi şartlarında askorbik asit ve indirgenmiş glutatyon içeriğini arttırmıştır. Elde edilen bu sonuçlarla, soğuk stresine maruz kalmış hücre kültürlerinde toleransı geliştirmede antioksidan savunma sistemini indükleyerek aşırı ROT üretiminden ortaya çıkan oksidatif stresin azaltılmasında epiBL'nin pozitif rol oynayabileceği doğrulanmıştır.

Kagale vd. (2007), *Arabidopsis thaliana* ve *Brassica napus*'da yüksek sıcaklık, soğuk ve kuraklık stresi toleransı üzerine BR'lerin etkilerini araştırmışlardır. *A. thaliana* Columbia yabani çeşidi *det2-1* ve *dwf4* mutantları ile *B. napus* Westar çeşidine ait tohumlar, yüzey sterilizasyonundan sonra Whatman No:3 filtre kağıtları üzerine

yerleştirilmiş ve hava ile kurutulmuşlardır. *A. thaliana* tohumları, 1 µM epiBL içeren MS ortamında kültüre alınmış ve 3 gün 4°C'de karanlıkta tutulmuşlardır. *B. napus* tohumları da Dhaubhadel vd. (1999)'e göre kültüre alınmıştır. 21 günlük *A. thaliana* ve 14 günlük *B. napus* fidelerine kuraklık, soğuk ve sıcak şoku uygulaması yapılmıştır. Çalışma sonucunda, epiBL uygulaması, her iki bitki türünde de soğuk ve kuraklık stresine karşı fide toleransını arttırmış ve tuz stresi ile indüklenen tohum çimlenmesi inhibisyonunu kaldırmaya yardımcı olmuştur. Farklı stres faktörlerine maruz kalan bitkilerde epiBL'nin tolerans sağlama yeteneği, kuraklık ve soğuk stres markör genlerinin ekspresyon analizleri ile desteklenmiştir. Bu genlerdeki transkripsiyonel değişimler, epiBL uygulaması yapılmış *A. thaliana*'da özellikle gelişimin erken dönemlerinde daha açık görülmüştür. Mutantlarda yapılan analizler sonucunda, sıcak stresine yanıtta epiBL'nin temel rolü olduğu belirlenmiştir.

Vardhini vd. (2011), kuraklık stresi altındaki *Sorghum vulgare* Pers. türüne ait CSH-15R, CSH-14, ICSV-745 (kuraklığa duyarlı) ve M-35-1 (kuraklığa tolerant) çeşitlerinde enzimler üzerine BR'lerin (homoBL ve epiBL) etkisini çalışmışlardır. Tohumlar yüzey sterilizasyonundan sonra Whatman No:1 filtre kağıtları bulunan steril petri kaplarında çimlendirilmiş ve fideler büyütülmüştür. Petriker, distile su (kontrol), %20 polietilen glikol (PEG), %20 PEG+2 µM BR ve %20 PEG+3 µM BR çözeltileri ile 2. ve 4. günlerde sulanmıştır ve 6 günlük kültür sonunda, BR uygulamasının, SOD ve GR aktivitelerini arttırdığı; IAA oksidaz, polifenol oksidaz, proteaz ve nükleaz aktivitelerini azalttığı belirlenmiştir. Sonuç olarak, *Sorghum*'un kuraklığa tolerant çeşitlerinin yanı sıra duyarlı çeşitlerinde de BR'lerin kuraklık stresinin etkilerini azalttığı ortaya konmuştur.

Janeczko vd. (2005), kadmiyum stresi altında kolza bitkisinde 24-epiBL'nin etkisini fotosistem parametrelerini değerlendirerek araştırmışlardır. Sterilizasyonu yapılan tohumlar, MS ortamında kültüre alınmışlardır. 3 günlük fideler, MS (kontrol), MS+100 nM epiBL, MS+300 µM CdSO<sub>4</sub> ve MS+100 nM epiBL+300 µM CdSO<sub>4</sub> ortamlarına aktarılmıştır ve kültür 2 hafta devam ettirilmiştir. Cd, kotiledonlarda yüksek oranda biriktirilirken, epiBL uygulaması ile birikim azalmıştır. Cd stresi, spesifik enerji akışını, aktif reaksiyon merkezi sayısını, fotosentetik elektronların taşınımını, O<sub>2</sub> açığa çıkaran merkezin aktivitesini düşürürken, enerji kaybını



arttırmıştır. Cd stresine karşı epiBL, fotokimyasal reaksiyon aktivitelerini çok az arttırmasına karşın fideleri güçlü şekilde etkilemiştir. Cd+epiBL uygulaması, spesifik enerji akımları ve fotosentetik elektronların taşınımını arttırmış, aynı zamanda stresle indüklenen enerji kaybı azalmıştır ve O<sub>2</sub> açığa çıkaran merkezin aktivitesini arttırmıştır. Sonuç olarak epiBL'nin, etkin elektron taşıma sisteminin devamlılığı yanında fotokimyasal sürecin sağlıklı devam ettirilmesinde Cd'un toksik etkilerini azaltmada etkin rol oynadığı belirlenmiştir.

Anuradha ve Rao (2007), kadmiyum toksisitesi altında, turp (*Raphanus sativus* L.) bitkisinde tohum çimlenmesi ve fide gelişimi üzerine epiBL ve homoBL'nin etkisini çalışmışlardır. Yüzey sterilizasyonu yapılan tohumlar, distile su (kontrol), 1 mM CdCl<sub>2</sub>, 1 mM CdCl<sub>2</sub>+1 µM epiBL, 1 mM CdCl<sub>2</sub>+2 µM epiBL, 1 mM CdCl<sub>2</sub>+3 µM epiBL çözeltilerinde 24 saat bekletilmişlerdir ve tohumlar filtre kağıdı içeren petri kaplarında karanlıkta çimlendirmeye bırakılmıştır. 2 gün sonra fidelere Cd ve epiBL'li çözeltilerden verilmiştir ve 5. günde gelişimsel parametreler için, 6. günde prolin analizinde kullanılacak bitkiler ayrılmıştır. BR uygulaması, ağır metalin toksik etkisini azaltmış ve tohum çimlenmesi ile fide gelişimini arttırmıştır. Stresin etkisini azaltmada homoBL, epiBL'ye göre daha etkili bulunmuştur ve özellikle 3 µM homoBL dozu tohum çimlenmesi ile fide gelişimi üzerine en iyileştirici doz olmuştur. Metal toksisitesi altında BR'ler tarafından fide gelişimin iyileşmesi serbest prolin içeriğinin artışı ile ilgili olmuştur. Cd stresine karşı BR uygulaması, CAT, SOD, APX, GPX gibi antioksidan enzimlerin aktivitelerini arttırmıştır. Lipit peroksidasyonu, Cd stresi ile artarken, BR uygulaması ile düşmüştür. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar, Cd toksisitesinin engelleyici etkilerini BR'lerin hafiflettiğini ortaya koymuştur.

Sharma vd. (2011), krom (Cr) toksisitesi altındaki turpta (*Raphanus sativus* L.) antioksidan savunma sistemi üzerine 28-homoBL'nin etkisini araştırmışlardır. Yüzey sterilizasyonundan sonra tohumlar, farklı dozlarda 28-homoBL çözeltilerinde (0, 10<sup>-11</sup>, 10<sup>-9</sup>, 10<sup>-7</sup> M) 8 saat bırakılmıştır. Ön uygulamalı tohumlar, petri kaplarına ekilmişler ve farklı konsantrasyonlarda K<sub>2</sub>CrO<sub>4</sub> çözeltileri (0, 0.5, 1.0, 1.5 mM) ile sulanmıştır. 7 gün sonra bitkilerde çeşitli biyokimyasal analizler yapılmıştır. Sonuç olarak, yapılan bu analizlerin ışığında, homoBL'nin Cr stresinin etkilerini azalttığı

bulunmuştur. Gelişimin, klorofil, protein, prolin içeriğinin azalması, MDA içeriğinin artması, metal alımının artması gibi toksik Cr etkileri, homoBL uygulaması ile azaltılmıştır. Ayrıca, guaikol peroksidaz hariç tüm antioksidan enzimlerin aktiviteleri, Cr stresine maruz kalan bitkilerde homoBL uygulaması ile artış sergilemiştir. Cr stresinin etkilerini azaltmada en etkili homoBL dozunun  $10^{-7}$  M olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışma ile homoBL'nin, antioksidan enzimlerin regülasyonu üzerindeki koruyucu rolü ve bitkilerde stresin etkilerini azaltmada olası bağlantısı olduğu vurgulanmıştır.

Ulaşılan literatürler, domateste ve diğer bitkilerde tuz stresi ve diğer abiyotik stres faktörlerinin etkilerini belirlemeye yönelik in vivo ve in vitro çok sayıda araştırma yapıldığını göstermektedir. Son yıllarda BR'lerin anti stres özelliği ön plana çıkmış ve epiBL'nin bitkilerde stres toleransını belirlemeye yönelik pek çok bitkide farklı stres şartları altındaki etkisi üzerinde durulmaktadır. Ancak, domates in vitro kültürlerinde tuz stresine karşı BR'lerin etkileri üzerinde herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Dolayısı ile bu tez çalışmasında epiBL, tohum, kallusa ve eksplanta uygulanmış, kallus ve sürgün ucu kültürlerinde tuz stresine karşı epiBL'nin etkisi araştırılmıştır. Domateste farklı çeşitlerde hem in vitro sürgün rejenerasyonu üzerine hem de tuzlu şartlarda rejenerasyon üzerine birçok çalışma yapılmış olmasına rağmen tuz stresine karşı epiBL'nin etkisi üzerinde çalışmaya rastlanmamıştır. Bu tez çalışması ile tuz stresi şartlarında, in vitro kültürler ile epiBL'nin etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

## 2. MALZEME VE YÖNTEM

### 2.1. Bitki Materyali

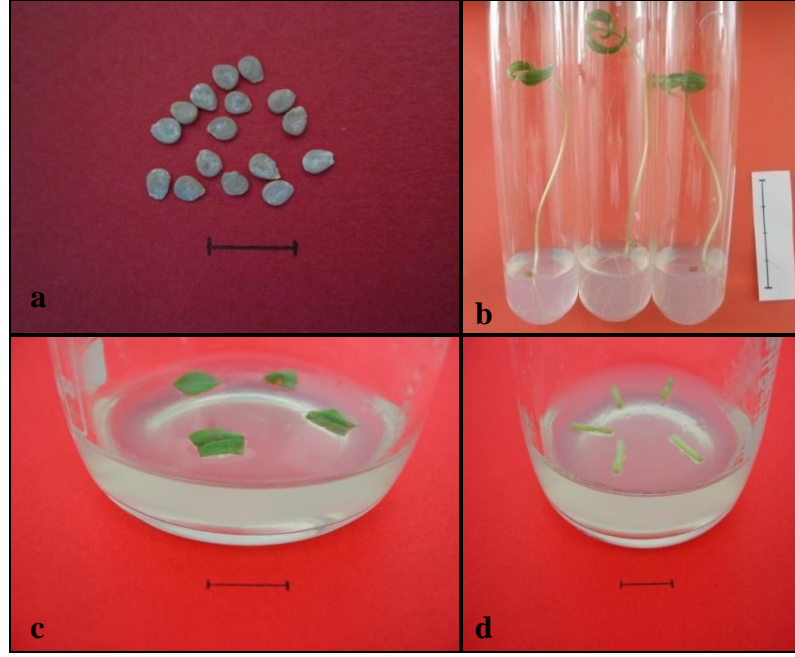
Tez çalışmasında *Solanaceae* familyasına ait domates (*Lycopersicon esculentum* Mill.) M-28 F<sub>1</sub> (hibrit) çeşidi kullanılmıştır (Şekil 2.1.). Çeşide ait tohumlar, Agrotek Tohumculuk Tarım Sanayi ve Ticaret Limited Şirketinden temin edilmiştir. Verimli, meyve kalitesi yüksek, raf ömrü uzun ve lezzetli bir çeşittir. Sonbahar ve ilkbahar yetiştiriciliğine uygun olup; ekimleri, sonbahar mevsiminde Ağustos-Eylül ayı, ilkbahar mevsiminde ise Şubat-Mart aylarında yapılmaktadır. *Fusarium*, *Verticillum*, domates mozaik virüsü gibi hastalık etmenlerine yüksek direnç göstermektedirler.

M-28 hibrit çeşidinin tuza toleransı ile ilgili herhangi bilgi bulunmamaktadır. Ancak domates, tuzluluğa orta derecede tolerant (1.3 dS/m<doymuş toprak ekstraktının elektriksel iletkenliği (EC)<6 dS/m) bir bitkidir ve toprak tuzluluğuna maruz kalan alanlarda da kültürü yapılmaktadır (Yokaş vd., 2008).



Şekil 2.1. Domates M-28 F<sub>1</sub> çeşidi (www. agrotektohum.com)

Tez çalışmamızda, M-28 F<sub>1</sub> hibrit çeşidine ait tohumlar (Şekil 2.2.a) ve 10 günlük steril fidelerin (Şekil 2.2.b) kotiledon (Şekil 2.2.c), hipokotil eksplantları (Şekil 2.2.d) ve sürgün uçları kültüre alınmıştır.



**Şekil 2.2. Domates M-28 F1 çeşidine ait a. tohumlar b. 10 günlük steril fideler c. Steril fidelerin kültüre alınan kotiledon eksplantları d. Steril fidelerin kültüre alınan hipokotil eksplantları (ölçü çizgisi, 1cm)**

## **2.2. 24-EpiBL'nin Uygulanması**

Uygulamalar için Brassinosteroidlerin en biyoaktif formlarından olan 24-Epibrassinolid (24-EpiBL, Sigma 1641) seçilmiştir. EpiBL (10 mg), birkaç damla etanolde çözüldükten sonra üzeri distile su ile 10 ml'ye tamamlanarak konsantrasyonu 1 mg/ml olacak şekilde stok çözelti hazırlanmıştır. Stok çözülden, uygulamada kullanılacak 1-2  $\mu$ M arasındaki dozlarda epiBL çözeltileri hazırlanmıştır. Tohuma uzun süreli (24 saat) uygulamalarında epiBL çözeltisi, distile su ile hazırlanmış, tohuma kısa süreli (10 saniye) epiBL uygulamalarında ve diğer tüm in vitro çalışmalarda %70'lik aseton ile hazırlanmıştır. Tohum, eksplant veya kallus kitleleri, epiBL çözeltisine batırılıp çıkarılarak uygulama ekzojen olarak yapılmış ve uygulama sonrası in vitro kültüre alma işlemi yapılmıştır (Yılmaz vd., 2009).

### 2.3. Tuz Stresinin Uygulanması

Stres faktörü olarak NaCl (Merck) tuzu seçilmiş ve farklı in vitro kültürlerde dozu değişmek üzere 0 mM ve 150 mM konsantrasyonları arasında NaCl besin ortamına ilave edilmiştir.

### 2.4. Temel Besin Ortamı

İn vitro kültürde temel besin ortamı olarak Murashige-Skoog (1962) (MS) ortamı kullanılmıştır. MS ortamı içeriğinde su, makroelementler, mikroelementler, vitaminler, amino asitler, karbon kaynağı olarak şeker ve katılaştırıcı olarak agar bulunmaktadır (Çizelge 2.1.). İn vitro tohum kültürlerinde ve steril fide elde edilmesinde yarı güçlü MS (½ MS) ortamı kullanılmış ve ortam 20 g/l sükröz ve 7 g/l agar ilavesi ile pH'ı 5.8'e ayarlanarak hazırlanmıştır. Kallus kültürlerinde ve diğer in vitro kültürlerde kullanılan MS ortamı, 30 g/l sükröz ve 7 g/l agar ilavesi ile pH'ı 5.8'e ayarlanarak hazırlanmıştır. Tüm ortamların sterilizasyonu otoklavda (buharlı basınç 1.5 atmosfer) yapılmıştır.

Çizelge 2.1. MS ortamının komponentleri ve konsantrasyonları (mg/l), (Babaoğlu vd., 2001)

Komponent tipi	Komponentler	MS ortamındaki konsantrasyonu (mg/l)
Makroelementler ve Mikroelementler	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650
	KNO <sub>3</sub>	1900
	Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O	37.3
	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27.8
	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	440
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2
	Na <sub>2</sub> Mo <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.25
	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.025
	KI	0.83
	MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	22.3
	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370
	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.025
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8.6	
Vitaminler	Myo-inositol	100
	Pridoksin-HCl	0.5
	Nikotinic Asit	0.5
	Thiamin-HCl	0.1
Amino Asit	Glisin	2

## 2.5. İn Vitro Kültür Çalışmaları

### 2.5.1. Tuz stresine karşı 24-epiBL'nin kullanıldığı in vitro tohum kültürü çalışmaları

2.5.1.1. Uzun süreli (24 saat) epiBL uygulamalı tohumların kurutma (filtre) kağıdı üzerinde petri kabında çimlendirilmesi

**Tohum Sterilizasyonu:** Tohumlar, %2.25'lik sodyum hipoklorit (NaOCl) solüsyonunda 5 dakika bekletildikten sonra 3 kez steril distile su ile yıkanarak sterilize edilmiştir (Yokaş vd., 2008).

**Tuz Konsantrasyonları:** 0-50-100-150 mM NaCl

**EpiBL Konsantrasyonu:** 1 µM'lık epiBL (Steril distile su ile hazırlanmıştır.)

**EpiBL'nin Uygulanma Şekli:** Yüzey sterilizasyonundan sonra tohumlar 24 saat epiBL çözeltisinde bekletilmiştir.

**Kültür Şartları:** Petri kapları 25°C sıcaklıktaki inkübatörde karanlıkta tutulmuşlardır.

Çimlendirme testi, petri kapları içinde steril filtre kağıtları üzerinde yapılmıştır. Kültüre alınacak tohumların yarısı epiBL çözeltisinde diğer yarısı steril distile suda 24 saat bırakılmıştır. Tohumlar, 4 katlı filtre kağıdı içeren steril petri kaplarında kültüre alınmıştır. Filtre kağıtlarının farklı konsantrasyonlardaki tuz çözeltileri ile tamamen ıslatılması sağlandıktan sonra petriler 25°C sabit sıcaklığa ayarlanmış inkübatöre alınmışlardır. Her bir faktör, 2 tekerrürlü yapılmıştır ve her bir tekerrürde 10'ar tohum kullanılmıştır. Petri kaplarına iki günde bir ilgili dozdaki NaCl çözeltilerinden 0.5 ml verilmiştir. Tohum çimlenme yüzdesini belirlemek için radikulanın testadan 2 mm uzunlukta çıkması yeterli bir kriter olarak alınmıştır (Doğan vd., 2008; Çolak vd., 2008; Turhan ve Şeniz, 2010). Tohumların kültüre alınmasından 17 gün sonra tohumların çimlenme yüzdeleri belirlenmiştir.

2.5.1.2. Kısa süreli (10 saniye) epiBL uygulamalı tohumların semi-solid ½ MS ortamında çimlendirilmesi

**Kullanılan Besin Ortamı:** ½ MS ortamı

**Tuz Konsantrasyonları:** 1) 0-20-40-60 mM NaCl

2) 0-20-40-60-80-100 mM NaCl

**EpiBL Konsantrasyonları:** 1) 0.5-1-1.5 µM'lık epiBL

2) 0.5-1-1.5-2 µM'lık epiBL

**EpiBL'nin Hazırlanması:** EpiBL çözeltileri %70'lik aseton ile hazırlanmıştır.

**EpiBL'nin Uygulanma Şekli:** Yüzey sterilizasyonundan sonra tohumlar epiBL çözeltilisine batırılıp çıkarılmıştır (10 saniye bekletme).

**Kültür Şartları:** Kültür kapları, 3500-4000 lux floresan aydınlatmalı, 16 saat aydınlık-8 saat karanlık fotoperiyotta ve 20±4°C sıcaklıkta kültür odasında tutulmuştur.

Domates tohumları yüzey sterilizasyonu yapıldıktan epiBL çözeltilerine kısa süreli (10 saniye) batırılmış ve asetonun uçmasından sonra farklı NaCl dozlarını içeren ½ MS besin ortamlarında kültüre alınmıştır. Kültür kapları, 3500-4000 lux floresan aydınlatmalı, 16 saat aydınlık-8 saat karanlık fotoperiyotta ve 20±4°C sıcaklıkta kültür odasında tutulmuştur. Çalışma 2 tekerrürlü düzenlenmiş ve her bir tekerrürde 6'şar tohum kullanılmıştır. Tohumlar iki günde bir çimlenmeleri ve çimlenmeden sonraki gelişimleri gözlenmiş ve kültürdeki bitkilerin fotoğrafları çekilmiştir. 17 gün sonra, kültürler boşaltılarak çimlenme yüzdesi (%), bitki boyu (cm), köklenme durumu, yaprak sayısı (adet) ve yaş ağırlık (g) ölçülmüştür.

## 2.5.2. Tuz stresine karşı epiBL'nin kullanıldığı in vitro sürgün ucu kültürü çalışmaları

**Kullanılan Eksplant Tipi:** 10 günlük steril fidelerin sürgün uçları (5 mm)

**Kullanılan Besin Ortamı:** 2 mg/l K+0.4 mg/l NAA ilaveli MS besin ortamı (El-Meleigy vd., 2004)

**Tuz Konsantrasyonları:** 0-20-40-60-80-100 mM NaCl

**EpiBL Konsantrasyonları:** 1 ve 2 µM epiBL

**EpiBL'nin Hazırlanması:** 1 ve 2 µM konsantrasyondaki epiBL çözeltisi %70'lik aseton ile hazırlanmıştır.

**EpiBL'nin Uygulanma Şekli:** Sürgün ucu eksplantları, kısa süre (40 saniye) epiBL çözeltisinde bekletilmiştir.

**Kültür Şartları:** Kültür kapları, 3500-4000 lux floresan aydınlatmalı, 16 saat aydınlık-8 saat karanlık fotoperiyotta ve 20±4°C sıcaklıkta kültür odasında tutulmuştur.

10 günlük steril fidelerin in vitro sürgün uçları, 2 mg/l K+0.4 mg/l NAA ilaveli MS ortamında kültüre alınmıştır. 12 günlük kültürde gelişim gösteren bitkicikler %70'lik asetonla hazırlanmış 1 ve 2 µM epiBL çözeltilerinde 40 saniye kadar muamele edildikten sonra 0-20-40-60-80-100 mM NaCl içeren MS ortamlarına aktarılmıştır. Kontrol bitkileri, sadece %70'lik aseton çözeltisi ile muamele edilmiştir. Çalışma 2 tekerrürlü düzenlenmiş ve her tekerrürde 15 sürgün ucu kullanılmıştır. NaCl içeren ortamlarda 17 günlük kültürlerinden sonra bitkicikler kültür kaplarından boşaltılarak bitki boyu (cm), bitki yaş ağırlığı (g), bitki kuru ağırlığı (mg), yaprak sayısı (adet) ile köklenme yüzdesi (%), kök boyu (cm), kök yaş ağırlığı (g) ve kök kuru ağırlığı (mg) belirlenmiştir.

#### *2.5.2.1. In vitro sürgün ucu kültüründen elde edilen bitkilere yapılan analizler*

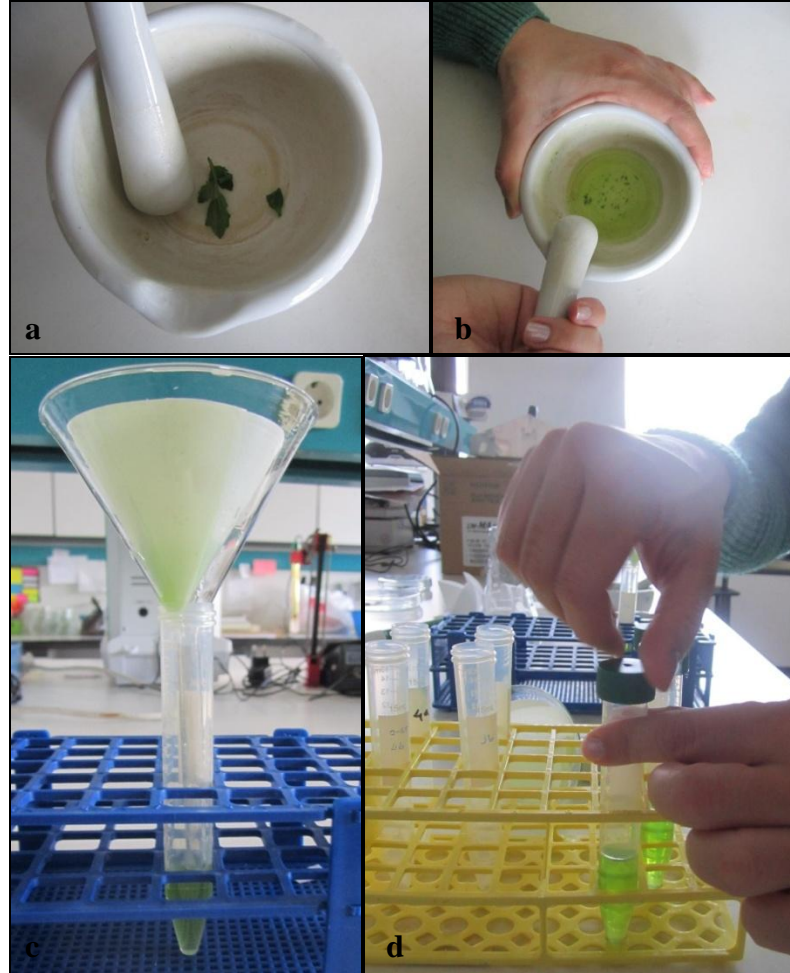
Sürgün ucu kültüründen elde edilen bitkilerde pigment içeriği analizi (Klorofil a, klorofil b, total klorofil, karotenoid), MDA, prolin, toplam çözülebilir protein içeriği, antioksidan enzim aktivitesi (SOD, POX) analizleri yapılmıştır. Pigment içeriği Strain ve Svec (1966), MDA içeriği Heath ve Packer (1968) ile Lutts vd. (1996)'ya göre; prolin içeriği Bates vd. (1973)'ne göre; total çözünebilir protein içeriği



Bradford (1976)'a göre yapılmıştır. SOD (E.C. 1.15.1.1) aktivitesi; Beauchamp ve Fridovich (1971) tarafından belirlenen, nitroblue tetrazoliumun fotokimyasal azalmayı inhibe etme yeteneğinin ölçümü ile analiz edilmiştir. POX (E.C. 1.11.1.7) aktivitesi ise; Chance ve Maehly (1955) metoduna göre guaiacol oksidasyonu kullanılarak belirlenmiştir.

### ***Pigment İçeriği Analizi :***

Her bir faktöre ait bitkiciklerin yapraklarından 0.05 g tartılmış ve 5 ml %80'lik aseton ile havanda ezilmiştir (Şekil 2.3.a, b). Süzüntü filtre kağıdından geçirilmiş (Şekil 2.3.c) ve ekstrakt 4730 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant başka tüpe alınmıştır ve %80'lik aseton ile 10 ml'ye tamamlanmıştır (Şekil 2.3.d). Okuma 450, 645 ve 663 nm dalga boyunda yapılmıştır.



**Şekil 2.3. Pigment içeriği analizi**

### ***Prolin İÇeriği Analizi :***

Her bir faktöre ait bitki örneğinden 0.5 g tartılmış ve 10 ml'lik %3'lük sülfosalisik asit ile havanda ezilmiştir. Whatman No:2 filtre kağıdından süzülen 2 ml ekstrakta, 2 ml ninhidrin reagent ve 2 ml glasiyel asetik asit eklendikten sonra 100°C su banyosunda 1 saat tutulmuşlardır. Reaksiyon, tüplerin buza alınması ile sonlandırılmıştır. Soğuyan karışıma 4 ml toluen ilave edilerek sıvı fazdan aspire edilen fraksiyonunun, 520 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçümü yapılmıştır. Hesaplama L-prolin standartları kullanılmıştır.

### ***MDA İÇeriği Analizi :***

Her bir faktöre ait bitkilerin yaprak örneklerinden 0.5 g alınmış ve 5 ml, %0.1'lik TCA (trikloroasetik asit) ile havanda ezilmiştir. 13000 rpm'de 10 dakika santrifüjden sonra 1 ml süpernatant üzerine 4 ml TCA+TBA (tiobarbütirik asit) karışımı eklenmiş ve 95°C su banyosunda 30 dakika tutulmuşlardır. Örnekler buza alınıp soğutulduktan sonra 13000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatantın 532 ve 600 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçümü yapılmıştır.

### ***Total Çözülebilir Protein İÇeriği Analizi :***

Her bir faktöre ait bitkilerin 0.5 g yaprak örneği, 5 ml 0.05 M pH:7 Na-P (Sodyum-fosfat) tampon çözeltisi ile homojenize edilmiştir. Homojenat, +4°C'de 13000 g'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Her bir faktör için tüplerde, süpernatant (25, 50, 75, 100 µl), distile su (75, 50, 25, 0 µl) ve CBB (Coomassie Brilliant Blue) (3'er ml) kullanılarak farklı 4 reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. Tüpler, 20 saniye vortekslenip 10 dakika beklendikten sonra, örneklerdeki protein miktarının tespiti için, 595 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçüm yapılmıştır. Hesaplama için bovine serum albumin standartları kullanılmıştır.

### ***SOD Enzim Aktivitesi Analizi :***

Her bir faktöre ait bitkilerin 0.5 g yaprak örneklerinden alınmış ve örnekler, 5 ml 0.05 M pH: 7.8 Na-P tampon çözeltisi ile homojenize edilmiştir. Homojenat, +4°C'de 13000 g'de 15 dakika santrifüj edilmiştir ve süpernatanttan enzim aktivite tayinleri yapılmıştır. Tüplerde her bir faktöre ait süpernatanttan 0, 50, 100, 150, 200 µl, Na-P

tamponundan 200, 150, 100, 50, 0 µl ve reaksiyon karışımından 3'er ml karıştırılarak tüplerde 5 farklı reaksiyon hazırlanmıştır. Reaksiyon karışımı, Na-P tamponu, NBT (Nitro blue tetrazolium klorür), L-methionin, Na<sub>2</sub>EDTA.2H<sub>2</sub>O ve riboflavin çözeltilerinden oluşturulmuştur. Tüplerde hazırlanan reaksiyonlar, 500 µE.m<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup> ışık şiddetinde 10 dakika lüminesansa bırakılarak 560 nm dalga boyunda NBT'nin indirgenmesi takip edilmiştir. Bir ünite SOD aktivitesi, NBT'nin 560 nm dalga boyunda %50 inhibisyona neden olan miktar olarak belirlenmiştir.

#### ***POX Enzim Aktivitesi Analizi :***

Her bir faktöre ait bitkilerin 0.5 g yaprak örneklerinden alınmış ve 5 ml 0.05 M pH:6 Na-P tampon çözeltisi ile homojenize edilmiştir. Homojenat, +4°C'de 13 000 g'de 15 dakika santrifüj edilmiştir ve süpernatanttan enzim aktivite tayinleri yapılmıştır. POX aktivitesi, kuarz küvette süpernatant, guaikol, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve Na-P tampon çözeltisinden oluşan reaksiyon karışımının 470 nm dalga boyunda ölçümü ile yapılmıştır. Reaksiyon, karışıma H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin eklenmesi sonucu başlamış ve 30 saniye aralıklarla 180 saniye boyunca absorbans artışı kaydedilmiştir.

### **2.5.3. Tuz stresine karşı epiBL'nin kullanıldığı in vitro kallus kültürü çalışmaları**

In vitro kallus kültürü çalışmalarında epiBL uygulaması, kallus kitlelerine ve eksplantlara (kotiledon ve hipokotil) olmak üzere iki şekilde yapılmıştır.

#### ***2.5.3.1. EpiBL'nin kallusa uygulandığı in vitro kültür çalışması***

***Kullanılan Eksplant Tipi:*** 10 günlük steril fidelerin kotiledon (5 mm x 5 mm) ve hipokotil (5 mm) eksplantları

***Kullanılan Besin Ortamı:*** 1 mg/l BAP+1 mg/l 2,4-D ilaveli MS ortamı (Aazami vd., 2010)

***Tuz Konsantrasyonları:*** 0-20-40-60-80-100 mM NaCl

***EpiBL Konsantrasyonları:*** 1 ve 2 µM epiBL

***EpiBL'nin Hazırlanması:*** 1 ve 2 µM konsantrasyondaki epiBL çözeltisi %70'lik aseton ile hazırlanmıştır.

***EpiBL'nin Uygulanma Şekli:*** 80-100 mg'lık kallus kitleleri, 40 saniye epiBL çözeltisinde bekletilmiştir.

***Kültür Şartları:*** Kültür kapları, 3500-4000 lux floresan aydınlatmalı, 16 saat aydınlık-8 saat karanlık fotoperiyotta ve 20±4°C sıcaklıkta kültür odasında tutulmuştur.

10 günlük steril fidelerin kotiledon ve hipokotil eksplantlarının 1 mg/l BAP+1 mg/l 2,4-D ilaveli MS ortamındaki 1 aylık kültürlerinden elde edilen kalluslar, 80-100 mg'lık kitlelere ayrılarak epiBL uygulaması yapıldıktan sonra NaCl eklenmiş aynı bitki büyüme düzenleyicileri kombinasyonu ilaveli MS besin ortamında kültüre alınmışlardır. Kontrol grubu kalluslar ise sadece %70'lik aseton ile muamele edilmişlerdir. Her bir uygulama için bir tekerrürde kallus kültüründen gelen 30 kallus kitlesi kullanılmıştır ve çalışma 2 tekerrürlü gerçekleştirilmiştir. 1 aylık gelişimden sonra kallusların yaş ağırlığı (g), kuru ağırlığı (mg) ve çapı (cm) ölçülmüştür.

#### ***2.5.3.2. EpiBL'nin eksplantlara uygulandığı in vitro kültür çalışması***

***Kullanılan Eksplant Tipi:*** 10 günlük steril fidelerin kotiledon (5 mm x 5 mm) ve hipokotil (5 mm) eksplantları

***Kullanılan Besin Ortamı:*** 1 mg/l BAP+1 mg/l 2,4-D ilaveli MS ortamı (Aazami vd., 2010)

***Tuz Konsantrasyonları:*** 0-20-40-60-80-100 mM NaCl

***EpiBL Konsantrasyonları:*** 1 ve 2 µM epiBL

***EpiBL'nin Hazırlanması:*** 1 ve 2 µM konsantrasyondaki epiBL çözeltisi %70'lik aseton ile hazırlanmıştır.

***EpiBL'nin Uygulanma Şekli:*** Eksplantlar, 30 saniye epiBL çözeltisinde bekletilmiştir.

**Kültür Şartları:** Kültür kapları, 3500-4000 lux floresan aydınlatmalı, 16 saat aydınlık-8 saat karanlık fotoperiyotta ve  $20\pm 4^{\circ}\text{C}$  sıcaklıkta kültür odasında tutulmuştur.

Bir önceki çalışmadan farklı olarak epiBL uygulaması eksplantlara yapılmış ve 1 aylık kültürden elde edilen kalluslarda tuz stresine karşı epiBL uygulamasının etkisi değerlendirilmiştir. EpiBL aynı dozlarda kullanılmış ve 10 günlük steril fidelerin kotiledon ve hipokotil eksplantları 30 saniye kadar epiBL çözeltisi ile muamele edildikten sonra artan tuz dozlarını ve 1 mg/l BAP+1 mg/l 2,4-D içeren MS ortamında kültüre alınmıştır. Çalışma 2 tekerrürlü düzenlenmiş ve her tekerrürde 30 adet kotiledon ve 30 adet hipokotil eksplantı kullanılmıştır. 1 aylık gelişim sürecinden sonra kültür kapları boşaltılmış; kallus yaş ağırlığı (g) ve kuru ağırlığı (mg) belirlenmiştir.

#### **2.5.4. Tuz stresine karşı epiBL'nin kullanıldığı in vitro direk sürgün rejenerasyonu çalışması**

**Kullanılan Eksplant Tipi:** 10 günlük steril fidelerin kotiledon (5 mm x 5 mm) ve hipokotil (5 mm) eksplantları

**Kullanılan Besin Ortamı:** Bitki büyüme düzenleyicileri ilavesiz MS ortamı, 2 mg/l BAP ilaveli MS ortamı (Mohamed vd., 2010)

**Tuz Konsantrasyonları:** 0-20-40-60-80-100 mM NaCl

**EpiBL Konsantrasyonları:** 1 ve 2  $\mu\text{M}$  epiBL

**EpiBL'nin Hazırlanması:** 1 ve 2  $\mu\text{M}$  konsantrasyondaki epiBL çözeltisi %70'lik aseton ile hazırlanmıştır.

**EpiBL'nin Uygulanma Şekli:** Eksplantlar, 30 saniye epiBL çözeltisinde bekletilmiştir.

**Kültür Şartları:** Kültür kapları, 3500-4000 lux floresan aydınlatmalı, 16 saat aydınlık-8 saat karanlık fotoperiyotta ve  $20\pm 4^{\circ}\text{C}$  sıcaklıkta kültür odasında tutulmuştur.

Tuz stresi şartlarında, sürgün rejenerasyonu üzerine epiBL'nin etkisinin araştırıldığı bu çalışmada 10 günlük steril fidelerin kotiledon ve hipokotil eksplantları, 30 saniye kadar epiBL çözeltisi (Kontrol grubu eksplantlarına, sadece %70'lik aseton uygulaması yapılmıştır.) ile muamele edildikten sonra iki gruba ayrılmıştır. Birinci grup, bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen ancak artan tuz dozlarını içeren MS ortamında kültüre alınmıştır. Kültür kapları, 1 ay fotoperiyodik koşulun sağlandığı kültür odasında tutulmuşlardır. İkinci grup ise, artan tuz dozlarını ve 2 mg/l BAP içeren MS ortamında kültüre alınmıştır. Kültür kapları ilk 15 gün kültür odasında karanlıkta tutulduktan sonra 15 gün 3500-4000 lux floresan aydınlatmalı, 16 saat aydınlık-8 saat karanlık fotoperiyodik koşula alınmışlardır. Çalışma 2 tekerrürlü düzenlenmiş ve her tekerrürde 20 adet kotiledon ve 20 adet hipokotil eksplantı kullanılmıştır. 1 aylık gelişim sürecinden sonra kültür kapları boşaltılmış; rejenerasyon yüzdesi (%), eksplant başına adventif sürgün sayısı (adet), ortalama sürgün boyu (mm) ve sürgündeki yaprak sayısı (adet) belirlenmiştir.

1 aylık gelişimden sonra in vitro kültürlerin boşaltılması sırasında bazı örnekler ayrılmış ve bu örneklerde somatik embriyoidlerin Scanning Elektron Mikroskobu (SEM)'nda incelenmesi ve fotoğraflaması yapılmıştır. SEM incelemesi için rejenerasyon sürgünlerinin olduğu bölgelerden 0.5 ile 1 cm çapından örnekler alınmış ve sırası ile %2.5'lük gluteraldehit, PBS (phosphate buffered saline solution: Fosfat tamponunda hazırlanmış tuz çözeltisi; 0.1 M, pH: 7.4), OsO<sub>4</sub> (osmiyum tetra oksit), PBS'de fiksasyon işlemi yapılmıştır. Dehidrasyon için örnekler önce yükselen etanol serilerinden akabinde etanol:amil asetat serilerinden geçirilmiştir. Son olarak örnekler saf amil asetata alınmış, kurutulmuş ve altın kaplama yapılarak incelemeye hazır hale getirilmiştir. SEM incelemesi, MSKÜ Araştırma Laboratuvarı Merkezi'nde gerçekleştirilmiştir.

Tez kapsamında kullanılan sarf malzemeler ve SEM incelemesi için gerekli maddi kaynak, MSKÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü, 2011/17 numaralı projeden aktarılan destek ile gerçekleştirilmiştir.

## 2.6. Verilerin İstatistiksel Analizleri

Tohum kültürü çalışmalarından elde edilen verilerin istatistiksel analizlerinde, SPSS Software Paket Programının 14.0 versiyonu kullanılmıştır. Örnek sayısına (n) göre;  $n > 30$  One-way Anova çoklu karşılaştırma için Duncan ve Tamhane's T2 testleri kullanılmıştır;  $n < 30$  ise non-parametrik testlerden çoklu karşılaştırma için Kruskal-Wallis H testi ile ikili karşılaştırma için Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. Diğer in vitro kültür çalışmalarından elde edilen verilerin analizinde ise Statistica 7 istatistik programı kullanılmıştır. Çoklu karşılaştırma için, Tukey HSD (Tukey's honestly significant difference test) testi kullanılmıştır. Tüm analizlerde, %95 güven aralığı kullanılmış ve  $p < 0.05$  göre önemlilik belirlenmiştir.

### 3. BULGULAR VE İRDELEME

#### 3.1. İn Vitro Tohum Kültürü Çalışmalarına Ait Bulgular

##### 3.1.1. Uzun süreli (24 saat) 1 µM epiBL uygulamalı tohumların kurutma (filtre) kağıdı üzerinde çimlendirme çalışmalarına ait bulgular

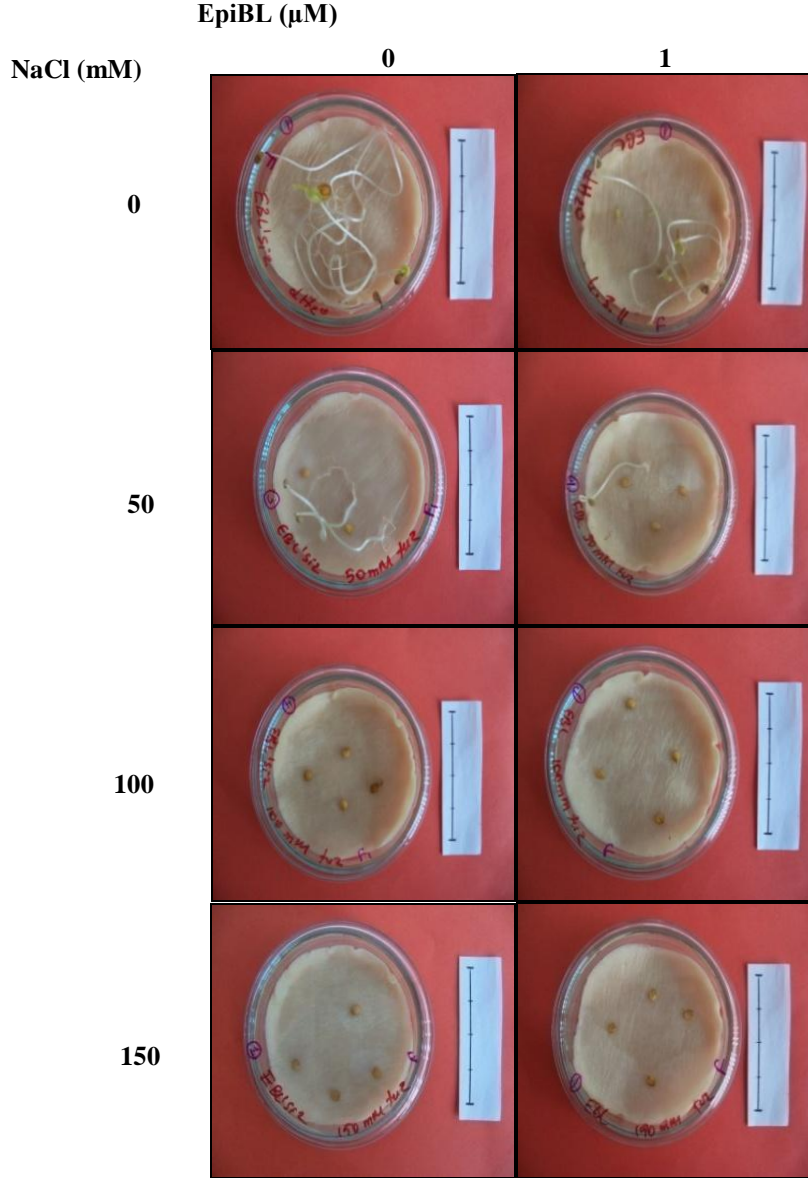
Tuz stresine karşı epiBL uygulamasının tohum çimlenmesi üzerine etkisini belirlemeye yönelik çalışmada tohumlar, filtre kağıdı üzerinde petri kaplarında kültüre alınmış ve filtre kağıtlarının nemlendirilmesinde 0, 50, 100 ve 150 mM NaCl çözeltileri kullanılmıştır. Hazırlanan çözeltilerin EC değerleri ölçülmüş ve EC sonuçları aşağıda verilmiştir.

- i. 0 mM NaCl çözeltisi (Kontrol, steril distile su) = 3 µS/cm
- ii. 50 mM NaCl çözeltisi = 5.26 mS/cm
- iii. 100 mM NaCl çözeltisi = 10.74 mS/cm
- iv. 150 mM NaCl çözeltisi = 15.30 mS/cm

Petri kaplarına iki günde bir uygun NaCl çözeltilerinden 0.5 ml verilmiştir ve tohumların kültüre alınmasından 17 gün sonra çimlenme yüzdeleri belirlenmiştir. Çimlenme, ilk olarak kültürün 3. gününde epiBL uygulamasız ve steril distile su ile sulanan tohumlarda gözlenmiştir. Bunu kültürün 5. gününde epiBL uygulamasız ve 50 mM NaCl çözeltisi ile sulanan tohumlar ile epiBL uygulamalı ve steril distile suyla sulanan tohumlar takip etmiştir. Kültürün 7. gününde epiBL uygulamasız ve 100 mM NaCl çözeltisi ile sulanan petri kaplarında sadece bir tohumda çimlenme gözlenmiş ancak gelişim devam etmemiştir. Diğer uygulamalarda ise çimlenme gözlenmemiştir. Tuz uygulamasının kök gelişimini olumsuz etkilediği (NaCl çözeltisi ile sulanan bitkilerin köklerinin daha kısa kaldığı) de açık olarak gözlenmiştir. Kontrol tohumları çimlenmesinde epiBL uygulamalı olanlarda kotiledon yapraklar epiBL uygulamasızlara göre daha erken görülmüştür. Kültürün 15. gününde epiBL uygulamalı ve 50 mM NaCl çözeltisi ile sulanan tohumların sadece bir tanesinde çimlenmenin başladığı gözlenmiştir (Şekil 3.1.). Filtre



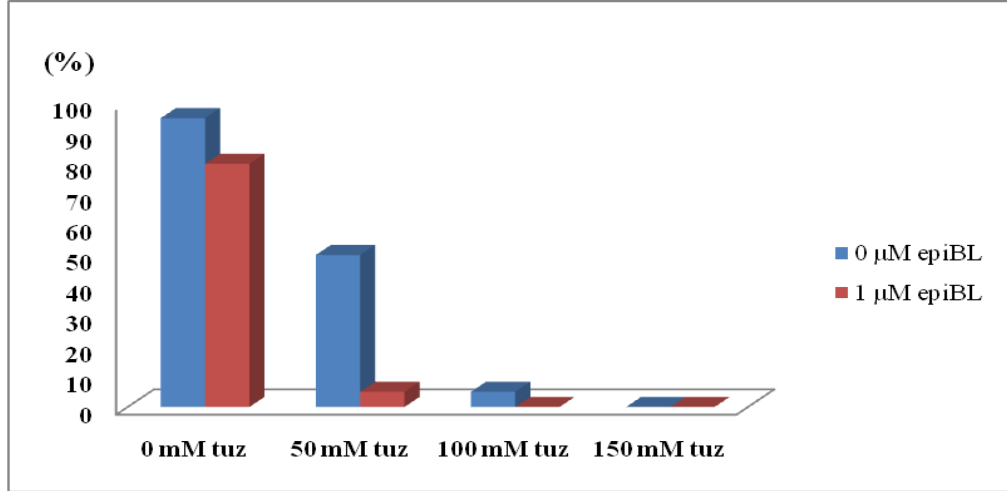
kağıtlarını suladığımız çözeltilerin EC değeri arttıkça bitki gelişiminin azaldığı gözlenmiştir. 50 mM NaCl dozunda EC değeri 5.26 mS/cm çıkmıştır ve kontrole göre bitki gelişiminde gerileme belirlenmiştir. 100 mM ve 150 mM tuz dozlarında ise daha yüksek EC değeri tespit edilmiş (10.74 mS/cm ve 15.30 mS/cm) ve bu yüksek EC değerlerinde çimlenme gözlenmemiştir.



**Şekil 3.1. Tohumların kurutma kağıdı üzerinde kültüre alınmasından 17 gün sonraki çimlenme durumları (Ölçü çizgisi: 4 cm)**

17 günlük sürenin sonunda tohumların çimlenme yüzdeleri belirlenmiştir. En yüksek çimlenme yüzdesi epiBL uygulamasız kontrol tohumlarında %95 olarak bulunmuştur. Bunu epiBL uygulamalı kontrol tohumları izlemiştir (%80). Çimlenme

yüzdesinin tuz stresinden etkilendiği; 100 mM ve 150 mM tuz dozlarının çimlenmeyi inhibe ettiği açık olarak görülmektedir. Ancak tuz stresine karşı 1  $\mu$ M epiBL uygulamasının herhangi bir olumlu etkisi gözlenmemiştir (Şekil 3.2.).



Şekil 3.2. Tuz stresine karşı epiBL uygulamasız ve uygulamalı tohumların kurutma kağıdı üzerindeki çimlenme yüzdeleri

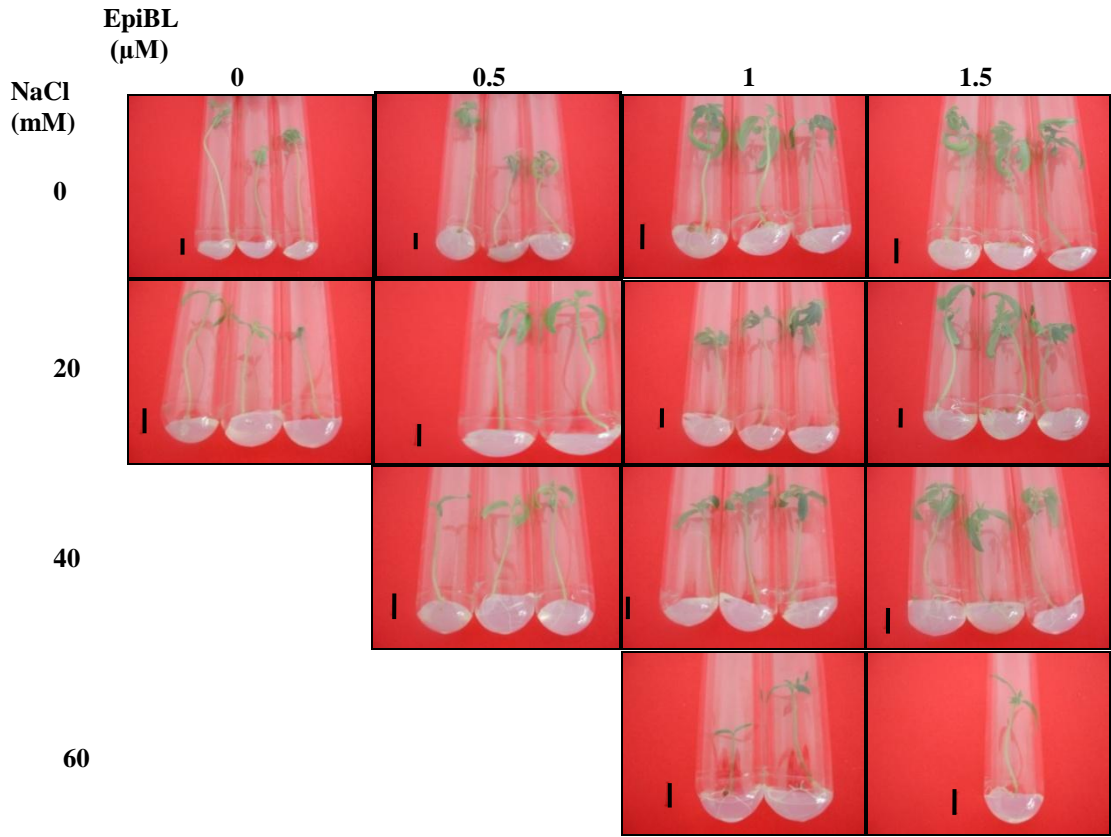
### 3.1.2. Tohumlara kısa süreli (10 saniye) epiBL uygulama

#### 3.1.2.1 EpiBL uygulamalı (0-0.5-1-1.5 $\mu$ M) tohumları 60 mM'a kadar NaCl içeren semi-solid $\frac{1}{2}$ MS ortamında çimlendirme çalışmalarına ait bulgular

Filtre kağıdı üzerindeki çimlendirme çalışmasında 150 mM NaCl dozunda çimlenme olmaması ve 100 mM NaCl dozunda da çok düşük çimlenme görülmesi nedeni ile tuz dozları düşürülmüş (0-20-40-60 mM NaCl) ve yeni epiBL dozları çalışmaya ilave edilmiştir (0.5  $\mu$ M ve 1.5  $\mu$ M'lık epiBL). Kısa süreli epiBL uygulaması yapıldıktan sonra tohumlar farklı dozlarda NaCl içeren  $\frac{1}{2}$  MS ortamında kültüre alınmıştır. Besin ortamları hazırlanırken EC değerleri ölçülmüştür ve sonuçlar aşağıdadır.

- i. 0 mM NaCl ilaveli  $\frac{1}{2}$  MS ortamı (kontrol) = 2.98 mS/cm
- ii. 20 mM NaCl ilaveli  $\frac{1}{2}$  MS ortamı = 4.81 mS/cm
- iii. 40 mM NaCl ilaveli  $\frac{1}{2}$  MS ortamı = 7.02 mS/cm
- iv. 60 mM NaCl ilaveli  $\frac{1}{2}$  MS ortamı = 8.75 mS/cm

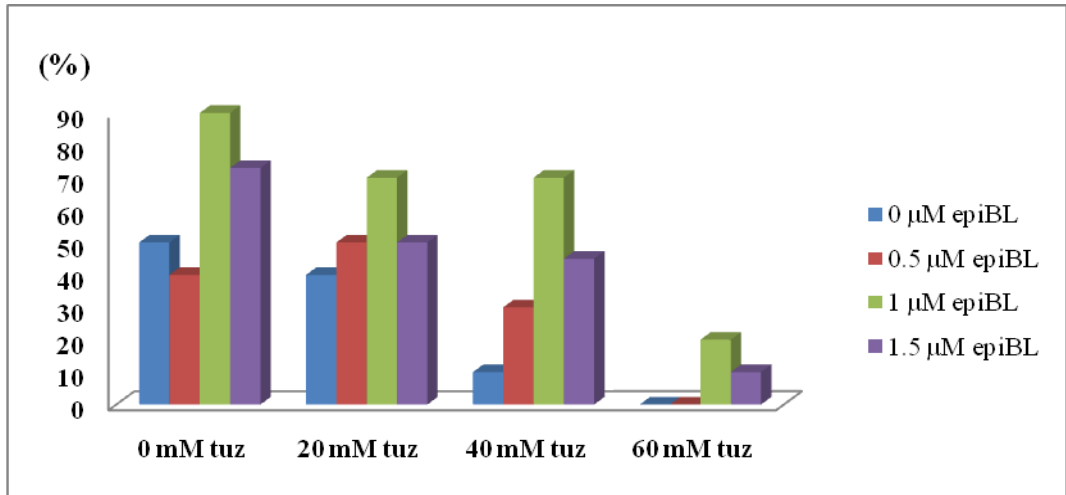
Kültüre alınan tohumların 17 günlük kültür süresinin sonunda çimlenme yüzdeleri alınmış ve gelişen bitkiciklere ait gelişimsel ve morfolojik parametreler kaydedilmiştir. Çimlenme ilk olarak kültürün 3. gününde epiBL uygulamasız ve uygulamalı tohumların tuz içermeyen ortamındaki kültürlerinde ayrıca, 20 mM ve 40 mM tuz dozlarında 1.5  $\mu$ M epiBL uygulamalı tohumlarda gözlenmiştir. Kültürden 17 gün sonra özellikle epiBL uygulamasız ve tuz içermeyen ortamlarda hipokotilin oldukça uzadığı gözlenmiştir (Şekil 3.3.).



Şekil 3.3. Tohumların 0-60 mM tuz içeren ½ MS ortamında kültüre alınmasından 17 gün sonra gelişen bitkilerden örnekler (Ölçü çizgisi: 1 cm)

Çimlenme durumlarına baktığımızda, sadece 60 mM NaCl dozunda, epiBL uygulamasız ve 0.5  $\mu$ M epiBL uygulamalı tohumlarda çimlenme gözlenmemiş, geri kalan tüm tuz konsantrasyonlarında ve epiBL uygulamalarında çimlenme gözlenmiştir. Tuz dozlarının artışı, tohum çimlenmesi ve bitkicik gelişimini olumsuz etkilemiştir. Buna karşılık, farklı dozlarda epiBL uygulamasının genel olarak çimlenme üzerine artan tuz dozlarının olumsuz etkisine karşı iyileştirici etkide bulunduğu belirlenmiştir. En yüksek çimlenme yüzdesi, 1  $\mu$ M epiBL uygulamalı

tohumların tuz içermeyen kültürlerinde belirlenmiştir (%90). En düşük çimlenme yüzdesi, epiBL uygulamasız 40 mM tuz dozunda ve 1.5  $\mu$ M epiBL uygulamalı 60 mM tuz dozundaki kültürlerde gözlenmiştir (%10). Tuz stresine karşı epiBL uygulamasının etkisine baktığımızda, tuzsuz kontrol ortamında 0.5  $\mu$ M epiBL uygulaması epiBL uygulamasızlara göre çimlenme yüzdesini düşürmüştür ancak daha yüksek dozlardaki epiBL uygulaması çimlenme yüzdesini arttırmıştır ve artış istatistiksel olarak önemlidir. 20 mM NaCl içeren besin ortamındaki çimlenme yüzdesi tüm epiBL uygulamalarında artış göstermiş, bunlar arasında 1  $\mu$ M epiBL uygulamasının etkisi istatistiksel olarak önemli olmuştur. 40 mM tuz dozunda, epiBL uygulamasız tohumların düşük olan çimlenme yüzdesi, epiBL uygulaması sonucunda artış göstermiştir ve en iyi artışı 1  $\mu$ M epiBL uygulaması vermiştir. EpiBL uygulamaları ile gözlenen artış istatistiksel olarak önemlidir. En yüksek tuz dozunda ise epiBL uygulamasız ve 0.5  $\mu$ M epiBL uygulamalı tohumlarda çimlenme görülmemiş, 1  $\mu$ M ve 1.5  $\mu$ M epiBL uygulamalarında düşük yüzde de çimlenme gözlenmiştir ve çimlenme yüzdesi üzerine 1  $\mu$ M ve 1.5  $\mu$ M epiBL uygulamaları istatistiksel olarak önemlidir. Genel olarak değerlendirme tohum çimlenme yüzdesine bakıldığında tuz stresine karşı en iyi sonucu 1  $\mu$ M epiBL uygulaması vermiştir (Şekil 3.4.).



Şekil 3.4. Tuz stresine (0 ile 60 mM) karşı epiBL uygulamasız ve uygulamalı tohumların  $\frac{1}{2}$  MS ortamındaki çimlenme yüzdeleri

En yüksek ortalama bitki boyu, epiBL uygulamasız tohumların kontrol (tuz içermeyen) ortamından gelişen bitkilerde tespit edilmiştir (8.64 cm). EpiBL

uygulamasız ve uygulamalı tohumlardan gelişen bitkilerde tuz stresinin artışına bağlı olarak bitki boyunda azalmalar gözlenmiştir. Tuz stresine karşı epiBL uygulamasının etkisine baktığımızda, kontrol besin ortamında bitki boyu epiBL uygulaması sonucunda azalmış ve azalış istatistiksel olarak önemli olmuştur. 20 mM ve 40 mM tuz dozunda epiBL uygulamaları epiBL uygulamasız kontrol bitkilerine göre bitki boyunu arttırmıştır. Ancak 40 mM tuz stresine karşı tüm epiBL uygulamalarının bitki boyunu arttırması istatistiksel olarak önemli olmuştur. 60 mM tuz dozunda epiBL uygulamasız ve 0.5  $\mu$ M epiBL uygulamasında çimlenme olmamıştır. Ancak 1 ve 1.5  $\mu$ M epiBL uygulamalarının uygulamasızlara göre bitki boyunu arttırması istatistiksel olarak önemli olmuştur (Çizelge 3.1.).

**Çizelge 3.1. Tuz stresine (0-60 mM) karşı epiBL uygulamasız ve uygulamalı tohumlardan gelişen bitkilerin boyu (cm)**

EpiBL Dozları ( $\mu$ M)	Tuz Dozları (mM)			
	0	20	40	60
0	8.64 $\pm$ 0.61 <sup>a</sup>	3.92 $\pm$ 0.92	1.00 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>	0.00 $\pm$ 0.00
0.5	7.15 $\pm$ 0.65 <sup>b</sup>	5.90 $\pm$ 0.54	5.16 $\pm$ 0.72 <sup>a</sup>	0.00 $\pm$ 0.00
1	6.24 $\pm$ 0.23 <sup>b</sup>	4.98 $\pm$ 0.39	4.55 $\pm$ 0.96 <sup>a</sup>	2.80 $\pm$ 0.57*
1.5	6.31 $\pm$ 0.42 <sup>b</sup>	5.94 $\pm$ 0.33	5.17 $\pm$ 1.17 <sup>a</sup>	4.50 $\pm$ 0.11*

Değerler, ortalama $\pm$ standart hatadır. Aynı sütundaki değerler bakımından, harflendirmeler Duncan testi sonucunda, \* Tamhane testi sonucunda P<0.05'de kontrole göre epiBL dozları arasındaki istatistiksel farklılığı göstermektedir.

Ortalama sürgün yaş ağırlığı en yüksek tuz içermeyen ortamda, 1 ve 1.5  $\mu$ M epiBL uygulamalı tohumlardan gelişen bitkilerde tespit edilmiştir (0.13 g). Hem epiBL uygulamasız hem de epiBL uygulamalı tohumlardan gelişen bitkilerin yaş ağırlığı tuz stresinin etkisi ile azalma sergilemiştir. Tuz dozlarına göre epiBL'nin etkisine değerlendirdiğimizde, tuzsuz şartlarda epiBL uygulaması bitki yaş ağırlığını arttırmıştır ancak istatistiksel olarak önemli fark oluşturmamıştır. 20 mM tuz dozunda epiBL uygulamasızlara göre epiBL uygulamalı tohumlardan gelişen bitkilerin yaş ağırlığı artmış ve 1.5  $\mu$ M epiBL uygulaması istatistiksel olarak önemli fark oluşturmuştur. 40 mM NaCl dozunda epiBL uygulamasızlara göre tüm epiBL uygulamaları; 60 mM tuz dozunda da 1  $\mu$ M ve 1.5  $\mu$ M epiBL uygulaması istatistiksel olarak önemli fark oluşturmuştur (Çizelge 3.2.).

**Çizelge 3.2. Tuz stresine (0-60 mM) karşı epiBL uygulamasız ve uygulamalı tohumlardan gelişen bitkilerin yaş ağırlığı (g)**

EpiBL Dozları ( $\mu$ M)	Tuz Dozları (mM)			
	0	20	40	60
0	0.09 $\pm$ 0.01	0.04 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	0.009 $\pm$ 0.0005 <sup>b</sup>	0.00 $\pm$ 0.00
0.5	0.10 $\pm$ 0.02	0.06 $\pm$ 0.01 <sup>ab</sup>	0.07 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.00 $\pm$ 0.00
1	0.13 $\pm$ 0.01	0.07 $\pm$ 0.01 <sup>ab</sup>	0.06 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	0.04 $\pm$ 0.005*
1.5	0.13 $\pm$ 0.01	0.11 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.10 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	0.07 $\pm$ 0.01*

Değerler, ortalama $\pm$ standart hatadır. Aynı sütundaki değerler bakımından, harflendirmeler Duncan testi sonucunda, \* Tamhane testi sonucunda P<0.05'de kontrole göre epiBL dozları arasındaki istatistiksel farklılığı göstermektedir.

Ortalama bitki kuru ağırlığa en yüksek, tuzsuz ortamda 1.5  $\mu$ M epiBL uygulamalı tohumlardan gelişen bitkilerde bulunmuştur (10.46 mg). EpiBL uygulamasız ve epiBL uygulamalı tohumlardan gelişen bitkilerin kuru ağırlığı tuz stresinin artışına bağlı olarak azalış göstermiştir. Genel olarak bakıldığında tüm tuz dozlarında epiBL uygulamasızlara göre epiBL uygulamalı bitkilerin kuru ağırlığı artış göstermiştir. Bu tuz dozları arasında 20 mM tuz dozunda sadece 1.5  $\mu$ M epiBL uygulamasının pozitif etkisi istatistiksel olarak önemli fark oluşturmuştur. 60 mM tuz stresi altında ise 1 ve 1.5  $\mu$ M epiBL uygulamasının etkisi istatistiksel önemli olmuştur (Çizelge 3.3.).

**Çizelge 3.3. Tuz stresine (0-60 mM) karşı epiBL uygulamasız ve uygulamalı tohumlardan gelişen bitkilerin kuru ağırlığı (mg)**

EpiBL Dozları ( $\mu$ M)	Tuz Dozları (mM)			
	0	20	40	60
0	8.00 $\pm$ 0.75	3.70 $\pm$ 1.21 <sup>b</sup>	2.93 $\pm$ 0.14	0.00 $\pm$ 0.00
0.5	9.17 $\pm$ 1.27	6.62 $\pm$ 1.02 <sup>ab</sup>	5.13 $\pm$ 0.89	0.00 $\pm$ 0.00
1	10.12 $\pm$ 0.92	6.66 $\pm$ 1.29 <sup>ab</sup>	5.60 $\pm$ 0.87	3.26 $\pm$ 0.81*
1.5	10.46 $\pm$ 1.51	9.80 $\pm$ 1.28 <sup>a</sup>	7.95 $\pm$ 2.06	3.20 $\pm$ 0.00*

Değerler, ortalama $\pm$ standart hatadır. Aynı sütundaki değerler bakımından, harflendirmeler Duncan testi sonucunda, \* Tamhane testi sonucunda P<0.05'de kontrole göre epiBL dozları arasındaki istatistiksel farklılığı göstermektedir.

Gelişen bitkilerin ortalama yaprak sayısı en yüksek 1.5  $\mu$ M epiBL uygulamalı tohumların tuz içermeyen kontrol besin ortamından gelişen bitkilerde tespit edilmiştir (2.12 adet/bitki). Ortalama yaprak sayısı da diğer parametrelerde olduğu gibi artan

tuz stresinden olumsuz etkilenmiştir. Tuz dozlarına göre epiBL'nin etkisini değerlendirdiğimizde, tuzsuz ve 20 mM NaCl'lü ortamda epiBL uygulamalarının bitki yaprak sayısı üzerine etkisi gözlenmemiştir. 40 mM tuz stresi altında, epiBL uygulamasız tohumlardan gelişen bitkilerde gerçek yapraklar oluşmamıştır oysa epiBL uygulamaları yaprak sayısını arttırmıştır ve artış istatistiksel olarak önemli olmuştur. 60 mM tuz dozunda 1 µM ve 1.5 µM epiBL uygulamasının yaprak sayısını arttırması istatistiksel olarak önemli olmuştur (Çizelge 3.4.).

**Çizelge 3.4. Tuz stresine (0-60 mM) karşı epiBL uygulamasız ve uygulamalı tohumlardan gelişen bitkilerin yaprak sayısı (adet)**

EpiBL Dozları (µM)	Tuz Dozları (mM)			
	0	20	40	60
0	2.00±0.00	2.00±0.00	0.00±0.00 <sup>b</sup>	0.00±0.00
0.5	2.00±0.00	1.66±0.33	2.00±0.00 <sup>a</sup>	0.00±0.00
1	2.00±0.00	2.00±0.00	2.00±0.00 <sup>a</sup>	1.33±0.66*
1.5	2.12±0.64	2.00±0.20	2.00±0.00 <sup>a</sup>	2.00±0.00*

Değerler, ortalama±standart hatadır. Aynı sütundaki değerler bakımından, harflendirmeler Duncan testi sonucunda, \* Tamhane testi sonucunda P<0.05'de kontrole göre epiBL dozları arasındaki istatistiksel farklılığı göstermektedir.

Ortalama kök boyu en yüksek 1 µM epiBL uygulamalı tohumların 60 mM tuz içeren ortamdaki kültürlerden gelişen bitkilerde belirlenmiştir (7.83 cm). EpiBL uygulamasız tohumlardan gelişen bitkilerde kök boyu artan tuz dozlarına göre dalgalı bir seyir göstermiştir. EpiBL uygulamalılarda ise tuz dozlarının artışı kök boyunu genel olarak arttırmıştır. Tuz stresine karşı epiBL'nin etkisini değerlendirdiğimizde, 0 mM tuz dozunda epiBL uygulaması epiBL uygulamasızlara göre kök boyunu azaltmıştır. 20 mM tuz dozunda, epiBL uygulaması kök boyunu arttırmış ve sadece 2 µM epiBL uygulaması istatistiksel olarak önemli fark oluşturmuştur. 40 mM tuz dozunda epiBL uygulamasızlara göre sadece 1 µM epiBL uygulaması kök boyunu arttırmış ancak istatistiksel önemli fark oluşturmamıştır. En yüksek tuz dozunda ise 1 µM ve 1.5 µM epiBL uygulaması kök boyunu arttırmıştır ve bu artış istatistiksel olarak önemlidir (Çizelge 3.5.).

**Çizelge 3.5. Tuz stresine (0-60 mM) karşı epiBL uygulamasız ve uygulamalı tohumlardan gelişen bitkilerin kök boyu (cm)**

EpiBL Dozları ( $\mu\text{M}$ )	Tuz Dozları (mM)			
	0	20	40	60
0	5.02 $\pm$ 0.15	4.42 $\pm$ 0.36 <sup>b</sup>	5.00 $\pm$ 0.57	0.00 $\pm$ 0.00
0.5	4.62 $\pm$ 0.07	5.25 $\pm$ 0.25 <sup>b</sup>	4.90 $\pm$ 0.10	0.00 $\pm$ 0.00
1	4.91 $\pm$ 0.19	5.31 $\pm$ 0.17 <sup>b</sup>	5.78 $\pm$ 0.64	7.83 $\pm$ 0.44*
1.5	4.82 $\pm$ 0.18	6.92 $\pm$ 0.66 <sup>a</sup>	4.80 $\pm$ 0.37	5.46 $\pm$ 0.14*

Değerler, ortalama $\pm$ standart hatadır. Aynı sütundaki değerler bakımından, harflendirmeler Duncan testi sonucunda, \* Tamhane testi sonucunda  $P<0.05$ 'de kontrole göre epiBL dozları arasındaki istatistiksel farklılığı göstermektedir.

Gelişen bitkilerin ortalama kök yaş ağırlığı en yüksek 1.5  $\mu\text{M}$  epiBL uygulamalı tohumların 20 mM tuz içeren ortamdaki kültüründen gelişen bitkilerde bulunmuştur (0.022 g). Ortalama kök yaş ağırlığı, epiBL uygulamasızlarda ve 0.5  $\mu\text{M}$  epiBL uygulamalılarda tuz dozlarının artışı ile ters orantılı şekilde gittikçe azalmıştır. 1  $\mu\text{M}$  epiBL uygulamasında artan tuz dozlarında kök yaş ağırlığı değişmemiştir. 1.5  $\mu\text{M}$  epiBL uygulamasında 20 mM tuz dozu kök yaş ağırlığını arttırmış olmasına karşın daha yüksek tuz dozlarında azalma olmuştur. Tuz stresine toleransı sağlamak amacı ile kullandığımız epiBL'nin etkisini değerlendirdiğimizde, 0 mM tuz dozunda epiBL uygulaması kök yaş ağırlığını azaltmıştır. 20 mM ve 40 mM tuz konsantrasyonlarında epiBL uygulamaları kök yaş ağırlığını arttırmış ve bu artışlar istatistiksel olarak önemli olmuştur. 60 mM tuz dozunda da 1  $\mu\text{M}$  ve 1.5  $\mu\text{M}$  epiBL uygulaması kök yaş ağırlığını arttırmıştır ve artış istatistiksel olarak önemlidir (Çizelge 3.6.).

**Çizelge 3.6. Tuz stresine (0-60 mM) karşı epiBL uygulamasız ve uygulamalı tohumlardan gelişen bitkilerin kök yaş ağırlığı (g)**

EpiBL Dozları ( $\mu\text{M}$ )	Tuz Dozları (mM)			
	0	20	40	60
0	0.02 $\pm$ 0.010	0.007 $\pm$ 0.001 <sup>b</sup>	0.002 $\pm$ 0.0001	0.00 $\pm$ 0.00
0.5	0.01 $\pm$ 0.003	0.009 $\pm$ 0.0008 <sup>a</sup>	0.007 $\pm$ 0.001*	0.00 $\pm$ 0.00
1	0.01 $\pm$ 0.002	0.012 $\pm$ 0.001 <sup>a</sup>	0.01 $\pm$ 0.002*	0.01 $\pm$ 0.004*
1.5	0.01 $\pm$ 0.003	0.022 $\pm$ 0.003 <sup>a</sup>	0.01 $\pm$ 0.006*	0.008 $\pm$ 0.00*

Değerler, ortalama $\pm$ standart hatadır. Aynı sütundaki değerler bakımından, harflendirmeler Duncan testi sonucunda, \* Tamhane testi sonucunda  $P<0.05$ 'de kontrole göre epiBL dozları arasındaki istatistiksel farklılığı göstermektedir.



Ortalama kök kuru ağırlığı en yüksek, epiBL uygulamasız tohumların tuz içermeyen besin ortamındaki kültüründen gelişen bitkilerde belirlenmiştir (1.90 mg). EpiBL uygulamasız ve epiBL uygulamalı tohumlardan gelişen bitkilerin kök kuru ağırlığı tuz stresinin artışı ile ters orantılı olarak azalma göstermiştir. Her bir tuz dozunda epiBL'nin etkisine baktığımızda, 0 mM tuz dozunda epiBL uygulaması kök kuru ağırlığını azaltmıştır. 20 mM tuz dozunda 0.5  $\mu$ M ve 1.5  $\mu$ M epiBL uygulaması kök kuru ağırlığını arttırmış sadece 2  $\mu$ M epiBL uygulaması istatistiksel önemli fark oluşturmuştur. 40 mM tuz dozunda tüm epiBL uygulamaları kök kuru ağırlığını arttırmıştır ancak 1  $\mu$ M epiBL uygulamasının olumlu etkisi istatistiksel olarak farklılık oluşturmuştur. En yüksek tuz dozunda kullanılan 1  $\mu$ M ve 1.5  $\mu$ M epiBL uygulaması istatistiksel olarak önemli fark oluşturmuştur (Çizelge 3.7.).

**Çizelge 3.7. Tuz stresine (0-60 mM) karşı epiBL uygulamasız ve uygulamalı tohumlardan gelişen bitkilerin kök kuru ağırlığı (mg)**

EpiBL Dozları ( $\mu$ M)	Tuz Dozları (mM)			
	0	20	40	60
0	1.90±0.31	0.93±0.03 <sup>b</sup>	0.36±0.27 <sup>b</sup>	0.00±0.00
0.5	1.57±0.30	0.96±0.32 <sup>b</sup>	0.83±0.08 <sup>ab</sup>	0.00±0.00
1	1.81±0.19	0.93±0.17 <sup>b</sup>	1.31±0.16 <sup>a</sup>	1.00±0.41*
1.5	1.80±0.18	1.70±0.16 <sup>a</sup>	0.86±0.26 <sup>ab</sup>	0.80±0.11*

Değerler, ortalama±standart hatadır. Aynı sütundaki değerler bakımından, harflendirmeler Duncan testi sonucunda, \* Tamhane testi sonucunda  $P<0.05$ 'de kontrole göre epiBL dozları arasındaki istatistiksel farklılığı göstermektedir.

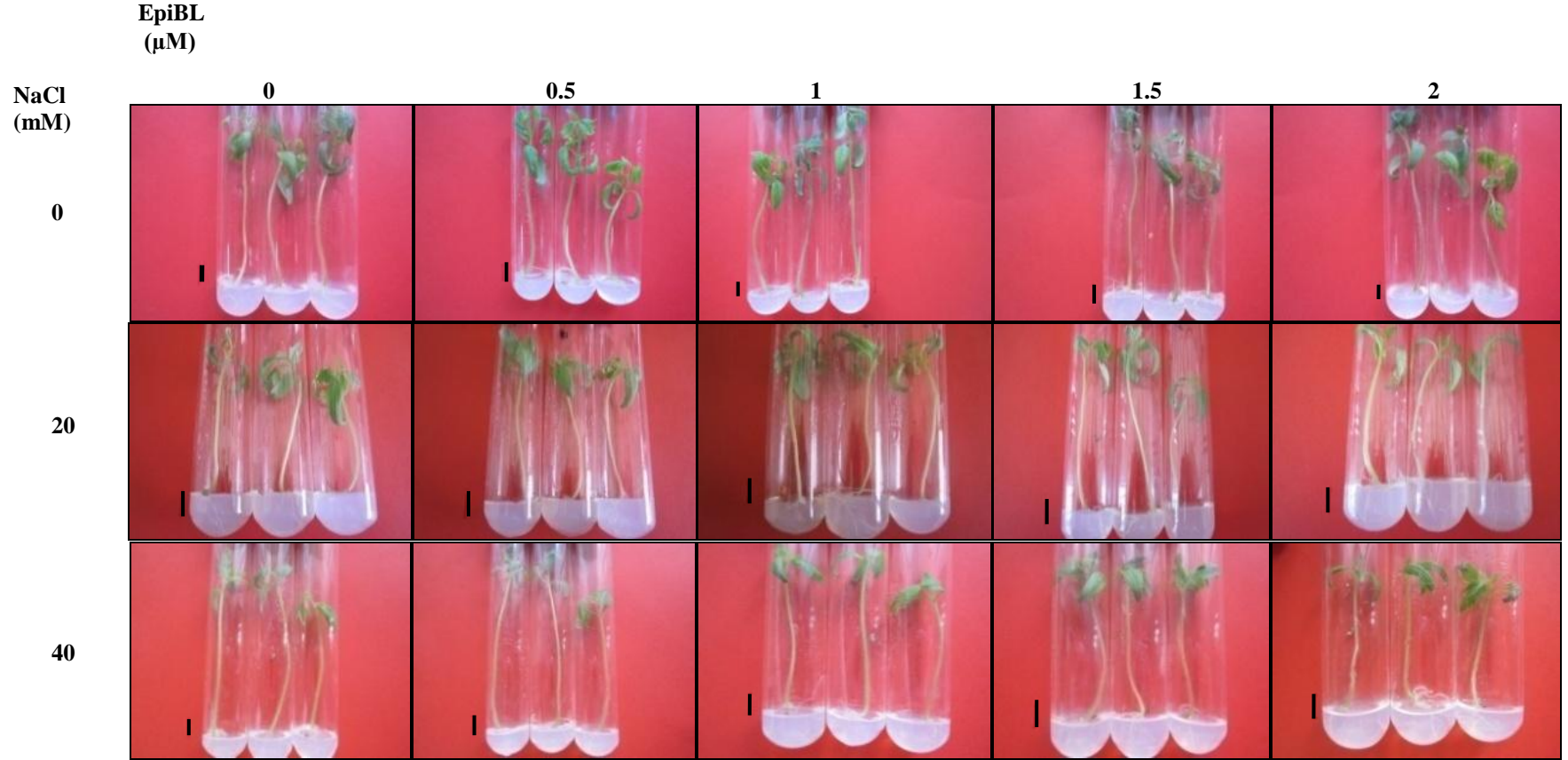
Besin ortamına ilave edilen NaCl ile ortaya çıkarılan tuz stresine karşı tohumlara epiBL uygulaması yapılmış, çimlenme ve bitkicik gelişimi üzerine olumlu sonuçlar alınmıştır.

### 3.1.2.2. EpiBL uygulamalı (0-0.5-1-1.5-2 $\mu$ M) tohumları 100 mM'a kadar NaCl içeren ½ MS ortamında çimlendirme çalışmalarına ait bulgular

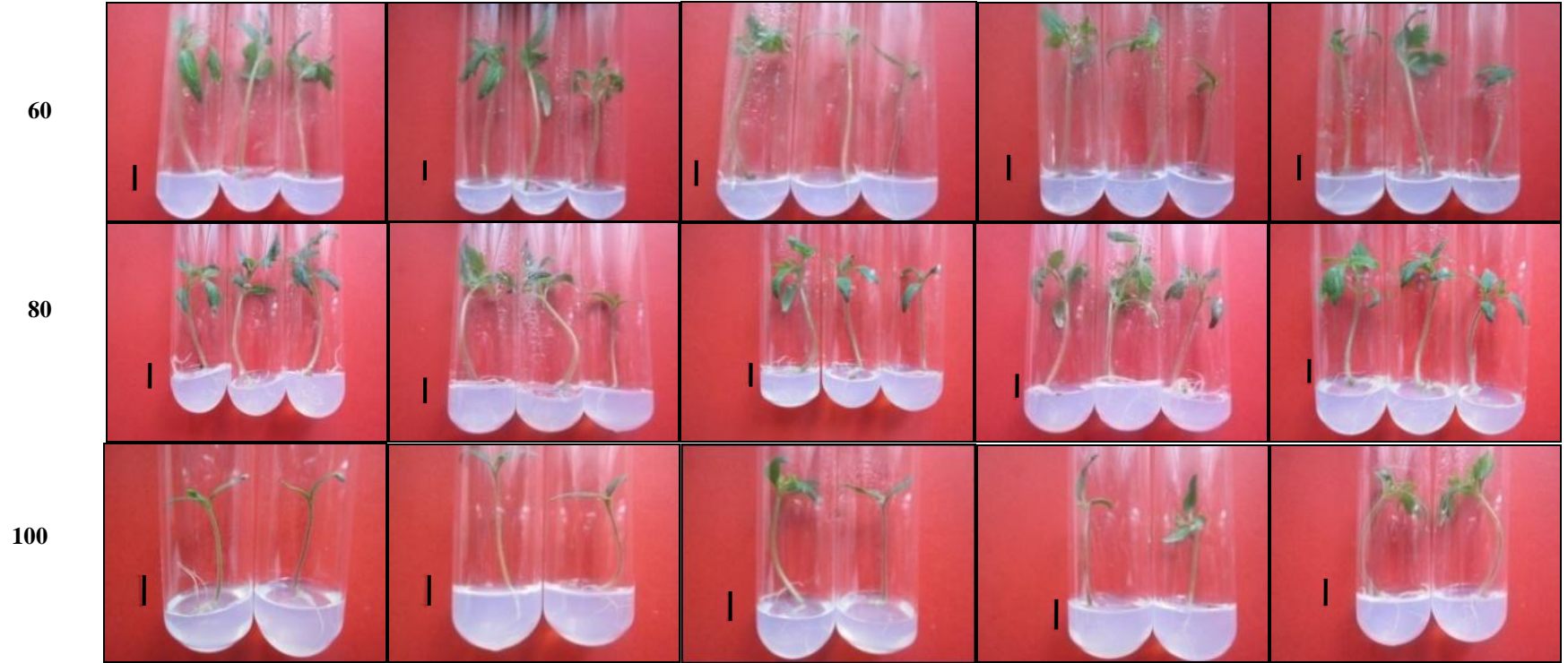
Tuz dozları (0 ile 100 mM) ve epiBL dozları (0 ile 2  $\mu$ M)'nin genişletildiği son çalışmada steril tohumlar, epiBL çözeltisinde kısa süre bekletilmiş ve ardından artan dozlarda tuz içeren ½ MS ortamında kültüre alınmışlardır. Besin ortamlarının EC değerleri aşağıdadır.

- i.** 0 mM NaCl (kontrol) ilaveli ½ MS ortamı = 3.05 mS/cm
- ii.** 20 mM NaCl ilaveli ½ MS ortamı = 5.24 mS/cm
- iii.** 40 mM NaCl ilaveli ½ MS ortamı = 6.99 mS/cm
- iv.** 60 mM NaCl ilaveli ½ MS ortamı = 9.13 mS/cm
- v.** 80 mM NaCl ilaveli ½ MS ortamı = 11.30 mS/cm
- vi.** 100 mM NaCl ilaveli ½ MS ortamı = 13.18 mS/cm

Çimlenme ilk olarak kültürün 2. gününde epiBL uygulamasız ve uygulamalı tohumların tuz içermeyen ortamdaki kültürlerinde gözlenmiştir. Kültürün 5. gününde 20 mM tuz içeren ortamda epiBL uygulamasız ve 0.5 µM ile 1.5 µM epiBL uygulamalı tohumlarda çimlenme görülmüştür. Tüm tuz dozlarında çimlenme gerçekleşmiş fakat, tuz dozlarının artışı ile çimlenme için geçen sürede artış ve çimlenen tohum sayısında azalma gözlenmiştir (Şekil 3.5.). Bitki gelişimi ve EC değerlerini karşılaştırdığımızda, 20 mM düşük tuz dozunda ve 5.24 mS/cm EC değerinde bitki gelişimi iyi olmuştur ve bu durum çimlenme yüzdesi ile desteklenmiştir. 40 ve 60 mM tuz dozlarında ise EC değeri sırası ile 6.99 mS/cm ve 9.13 mS/cm ölçülmüş ve bitki gelişiminin olumsuz etkilendiği gözlenmiştir. Yüksek olan 80 ve 100 mM tuz dozlarında EC değerleri 11.30 mS/cm ve 13.18 mS/cm olarak yüksek çıkmıştır ve bu dozlarda çimlenme ve bitki gelişimi bariz şekilde düşmüştür. Yokaş vd. (2008), domatesin tuzluluğa orta derecede tolerant olduğunu ve doymuş toprak ekstraktının elektriksel iletkenliğinin (EC), 1.3 dS/m ile 6 dS/m arasındaki değerlerinde sağlıklı şekilde yetişebilen bir bitki olduğunu belirtmişlerdir. Dölarşlan ve Gül (2012), 8-16 dS/m EC değerinde topraktaki tuz oranını aşırı olduğunu ve EC değerinin >16 dS/m olduğunda ise çok aşırı olduğunu ifade etmektedirler. Bu aşırı tuz oranlarında sadece tuza tolerant bitkiler gelişimlerini sürdürebilmektedirler.

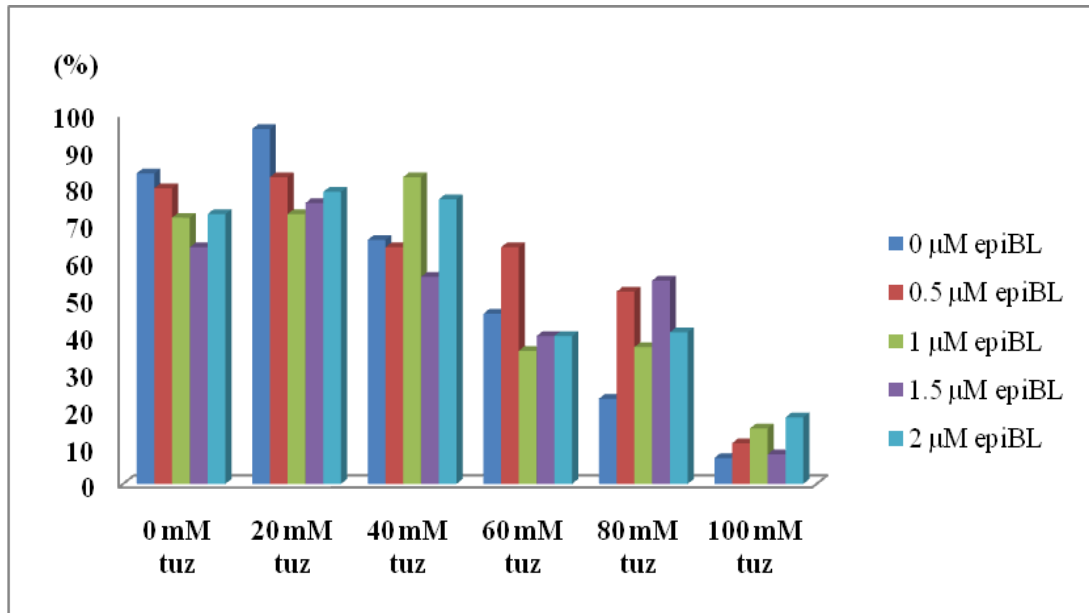


Şekil 3.5. Tohumların 0, 20 ve 40 mM tuz içeren  $\frac{1}{2}$  MS ortamında kültüre alınmasından 17 gün sonra gelişen bitkilerden örnekler (Ölçü çizgisi: 1 cm)



Şekil 3.5.'in devamı. Tohumların 60, 80 ve 100 mM tuz içeren 1/2 MS ortamında kültüre alınmasından 17 gün sonra gelişen bitkilerden örnekler (Ölçü çizgisi: 1 cm)

Kültüre alınan tohumların çimlenme yüzdesi en yüksek 20 mM tuz dozunda epiBL uygulamasız tohumların kültüründe elde edilmiştir (%96). En düşük çimlenme yüzdesi ise en yüksek tuz dozu olan 100 mM'da epiBL uygulamasız tohumlarda belirlenmiştir (%7). Tuz stresine karşı tohumlara epiBL uygulamasının etkisini değerlendirdiğimizde, çimlenme yüzdesi tuzsuz ortamda epiBL kullanımı ile azalış sergilemiştir. 20 mM tuz ilaveli ortamda da benzer sonuçlar alınmıştır. 40 mM tuz dozunda ise 1 ve 2  $\mu$ M epiBL uygulaması tohum çimlenmesini arttırmıştır ve gözlenen artışlar istatistiksel olarak önemli fark oluşturmuştur. 60 mM tuz stresinde ise 0.5  $\mu$ M epiBL uygulaması çimlenmeyi arttırmıştır ve artış istatistiksel olarak önemlidir. Yüksek tuz dozlarında (80-100 mM NaCl) ise tüm epiBL uygulamaları ile tohum çimlenme yüzdesi artış göstermiştir. 80 mM tuz dozunda tüm epiBL uygulamaları ve 100 mM tuz dozunda 1 ve 2  $\mu$ M epiBL uygulamaları çimlenme yüzdesi üzerine istatistiksel olarak önemli fark oluşturmuştur (Şekil 3.6.).



Şekil 3.6. Tuz stresine (0 ile 100 mM) karşı epiBL uygulamasız ve uygulamalı tohumların çimlenme yüzdeleri

Yaptığımız in vitro tohum kültürü çalışmalarında, genel olarak düşük (20 mM) NaCl tuz dozu, tohum çimlenmesini indüklemiştir ancak, tuz stresinin artmasına bağlı olarak çimlenme yüzdesinde azalma gözlenmiştir. EpiBL uygulamasız tohumlarda kontrol grubunun çimlenme yüzdesi %84 iken 20 mM tuz dozundan 100 mM tuz dozuna kadar sırası ile %96, %66, %46, %23 ve %7 olarak belirlenmiştir. Doğan vd., (2008),

22 *L. esculentum* çeşidi ve *L. pennellii*, *L. peruvianum*, *L. hirsutum* yabancı türleri ile yaptıkları çalışmalarında 0, 50, 75, 100, 125 ve 150 mM NaCl tuzu kullanmışlardır ve tuz stresinin tohum çimlenmesini olumsuz etkilediğini belirtmişlerdir. Araştırmacıların kullandıkları tuz tipi ve dozları bizim çalışmalarımızdakilerle benzerdir ve artan tuz stresinin tohum çimlenmesini azaltması çalışmamızla uyumludur. Araştırmacılar, tuz toleransı yüksek yabancı *L. peruvianum* türünde tohum çimlenme yüzdesini kontrolde %95, 150 mM tuz dozunda ise %65 belirlemişlerdir. *L. hirsutum*'da çimlenme yüzdesi, kontrolden 150 mM tuz dozuna kadar %98 ile %69; *L. pennellii* türünde ise %93 ile %64 arasında değişmiştir. *L. esculentum* TR-61697 genotipinde (Muğla-Milas menşeli) kontrolden en yüksek tuz dozuna kadar çimlenme yüzdesinin %98'den %58'e düştüğünü belirlemişlerdir. Çalışmamızda 100 mM ve 150 mM yüksek tuz dozları tohum çimlenmesini inhibe ederken, Doğan vd., (2008), çimlenme yüzdesinin %58 ile %65 arasında değiştiğini ifade etmişlerdir. Turhan ve Şeniz (2010), 33 domates çeşidinde 0, 8 ve 16 dS/m NaCl dozlarını kullanmışlardır ve bizim çalışmalarımızla paralel olarak tuz dozunun artışına bağlı olarak çimlenmenin azaldığını tespit etmişlerdir. Araştırmacılar Bodrum-Güvercinlik'ten alınan 61675 genotipli *L. esculentum* çeşidinde tuzsuz şartlarda %95, 8 dS/m tuzda %63 ve 12 dS/m %47 çimlenme yüzdesi belirlemişlerdir. Amini ve Ehsanpour (2006), Isfahani, Shirazy, Khozestani ve Khorasani domates çeşitlerinde MS ortamındaki tohum çimlenmesinin yüksek olduğunu, 40 mM tuzda çimlenmenin düştüğünü ve 80 mM, 120 mM ve 160 mM tuz dozlarından çimlenme yüzdesinin olumsuz etkilendiğini belirtmişlerdir. Çeşitler arasında Shirazy'nin çimlenme bakımından en toleran çeşit olduğunu ve diğer çeşitlerde 120 mM ve 160 mM tuz dozlarında çimlenme olmadığını ifade etmişlerdir. Literatürlerden ve tez çalışmalarımızdan elde edilen sonuçlar, tohum çimlenmesinin tuz dozlarına, kullanılan domates türü, çeşidi ve genotipine göre farklılık gösterdiğini ortaya çıkarmıştır.

Domateste NaCl tuzu yanısıra Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Çolak vd., 2008) ve Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Keser vd., 2009) tipi tuzlar kullanılarak yapılan çalışmalarda da NaCl stresine benzer şekilde artan tuz stresinin tohum çimlenme yüzdesini azalttığı tespit edilmiştir. Kullanılan tuz tipi ve konsantrasyonları farklılık gösterse de artan stres şartları altında çimlenmenin engellendiği ve çimlenme yüzdesinin azaldığı açıktır. Bundan dolayı

son yıllarda yapılan çalışmalarda, tuz stresinin etkisinin belirlenmesinin yanında tuz stresine karşı tohum çimlenmesini ve bitki gelişimini arttıracak ve bitki tolerans mekanizmalarını devreye sokacak farklı kimyasal maddelerin kullanımı ön plana çıkmaktadır. Bitkilerde abiyotik stres faktörlerine ve özellikle tuz stresine karşı bitki toleransını geliştirmek için BR'ler sıklıkla kullanılmaktadır. Anuradha ve Rao (2001), çalışmalarında tuz stresi olarak 150 mM NaCl dozunu seçmişler ve stres toleransını sağlamak üzere çeltik tohumlarını 3 µM epiBL ve 3 µM homoBL ile muamele etmişlerdir. Araştırmacılar, çeltik tohumlarında kontrol uygulamasında (0 mM NaCl ve epiBL uygulamasız tohumlarda) 24 saat sonraki çimlenme yüzdesinin %66, 36 saat sonraki çimlenme yüzdesinin %95 olduğunu tespit etmişlerdir. NaCl stresi altında çimlenme yüzdesi 24 saat sonra gözlenmezken, 36 saat sonra %4 olmuştur. EpiBL uygulaması ile çimlenme yüzdeleri 24 ve 36 saat sonra sırası ile %40 ve %78'e, homoBL uygulaması ile %46 ve %88'e çıktığı tespit edilmiştir. Tuz stresi altındaki çeltik tohumlarında tohum çimlenmesi BR uygulamaları ile artmış ve strese karşı toleransı sağladığı ifade edilmiştir. Çavuşoğlu ve Kabar (2007), 0.25, 0.30, 0.35 M tuz stresine karşı epiBL (3 µM) ve diğer bitki büyüme düzenleyicilerinin turp tohumlarının çimlenmesi üzerine etkisini araştırmışlardır. Araştırmacılar, 0.25 ve 0.30 M tuz stresi altında epiBL uygulamalarının tohum çimlenmesini arttırdığını epiBL'nin istatistiksel olarak çimlenme üzerine olumlu etki sergilediğini belirlemişlerdir. Araştırmacılar epiBL'yi tek kullanmalarının yanı sıra 0.35 M tuz stresine karşı bazı büyüme düzenleyicileri ile kombinasyonlarını da denemişler ve epiBL (3 µM)+GA<sub>3</sub> (900 µM), epiBL (3 µM)+Kin (100 µM) ve epiBL (3 µM)+kadaverin (bir poliamin çeşidi, 10 µM) kombinasyonlarının kontrole göre çimlenme yüzdesini arttırdığını ve artışların istatistiksel olarak önemli farklılık oluşturduğunu belirlemişlerdir.

Çalışmamızda bitki boyu, tuzsuz ortamda (kontrol) epiBL uygulaması ile artış göstermiştir. Kullanılan epiBL dozlarından 1 ve 1.5 µM dozları, istatistiki açıdan önemli farklılık oluşturmuştur. 20 mM tuz dozunda, kontrol grubuna benzer şekilde epiBL uygulaması bitki boyunu arttırmış; bunlardan 1 ve 1.5 µM dozlarının kullanımı istatistiki olarak önemli olmuştur. 40 mM tuz dozunda ise, 0.5 µM epiBL uygulamasının bitki boyunu arttırması istatistiksel olarak önemli fark oluşturmuştur. 60 mM tuz stresinde, 0.5 µM epiBL dozu bitki boyunu arttırmış ancak, istatistiki

önemli fark oluşturmamıştır. 80 mM tuz dozunda epiBL uygulaması, bitki boyunu azaltmıştır. Oysa, 100 mM'lık en yüksek tuz dozunda epiBL uygulaması bitki boyunu arttırmış ve bunlar arasından 2 µM epiBL dozu istatistiki olarak önemli fark oluşturmuştur (Çizelge 3.8.).

**Çizelge 3.8. Tuz stresine (0-100 mM) karşı epiBL uygulamasız ve uygulamalı tohumlardan gelişen bitkilerin boyu (cm)**

EpiBL Dozları (µM)	Tuz Dozları (mM)					
	0	20	40	60	80	100
0	9.14±0.59 <sup>c</sup>	8.38±0.29 <sup>b</sup>	7.33±0.67 <sup>b</sup>	6.13±0.65	6.50±0.47	2.90±0.10 <sup>b</sup>
0.5	10.77±0.50 <sup>bc</sup>	8.75±0.24 <sup>b</sup>	9.42±0.75 <sup>a</sup>	6.42±0.56	5.33±0.39	3.63±0.17 <sup>b</sup>
1	11.69±0.78 <sup>ab</sup>	9.21±0.40 <sup>a</sup>	7.20±0.36 <sup>b</sup>	5.16±0.64	5.36±0.51	3.85±0.87 <sup>b</sup>
1.5	13.28±0.52 <sup>a</sup>	9.14±0.29 <sup>a</sup>	7.82±0.49 <sup>b</sup>	4.88±0.55	5.41±0.41	3.75±0.25 <sup>b</sup>
2	10.43±0.60 <sup>bc</sup>	8.61±0.33 <sup>b</sup>	6.29±0.35 <sup>b</sup>	5.41±0.69	5.51±0.40	5.90±0.33 <sup>a</sup>

Değerler, ortalama±standart hatadır. Aynı sütundaki değerler bakımından, harflendirmeler P<0.05'de kontrole göre epiBL dozları arasındaki istatistiksel farklılığı göstermektedir.

İn vitro tohum kültürü çalışmalarında çimlenmeyi takiben gelişim gösteren bitkilerin boyu tuz stresinden olumsuz etkilenmiştir. Bitki boyu kontrol ortamında (tuzsuz ortamda) ortalama 9.14 cm iken 100 mM tuz dozunda ort. 2.90 cm olmuştur. Çolak vd., (2008) ve Keser vd., (2009) bizim çalışmamıza benzer şekilde çimlenen tohumlardan gelişen domates bitkilerinin hipokotil uzunluğunun artan tuz dozları altında azaldığını belirlemişlerdir. Smolik vd. (2011), üç *L. esculentum* çeşidi (Malinowy Ozarowski, Pokusa, Awizo F<sub>1</sub>) ve yabancı *L. chmielewski* türünü kullandıkları çalışmalarında 14 günlük tüm çeşitlere ait fidelerde artan tuz dozlarında (0-50-75-100-125 mM) bitki boyunun azaldığını ve bu parametre bakımından Awizo F<sub>1</sub> çeşidinin en tolerant çeşit olduğunu belirlemişlerdir. Araştırmacılar, kullanılan genotiplerin sürgün boyu üzerine önemli etkisi olduğunu ifade etmişlerdir. Anuradha ve Rao (2001), çimlenen çeltik tohumlarından gelişen bitkilerin boyunun tuz stresi (150 mM) ile azaldığını ancak epiBL (3 µM) ve homoBL (3 µM) kullanımı ile bitki boyunu arttırdığını, böylelikle BR'lerin tuz stresine karşı çimlenme ve bitki gelişimini iyileştirdiğini ifade etmişlerdir. Tez çalışmamızda ise 20 mM tuz dozunda 1 ve 1.5 µM epiBL; 40 mM tuz dozunda 0.5 µM epiBL ve 100 mM tuz dozunda 2 µM epiBL uygulamasının bitki boyunu arttırması istatistiki önemli olduğu



belirlenmiştir. Araştırmacıların tuz stresine karşı kullandıkları epiBL uygulamalarının bitki boyu parametresi üzerine belirledikleri olumlu etkiler, bizim çalışmalarımızla uyumluluk göstermiştir.

EpiBL uygulamasız tohumlardan gelişen bitkilerin yaş ağırlığı tuz stresinden olumsuz etkilenmiştir. EpiBL uygulamasızlarda tuzsuz ortamda 0.24 g olan bitki yaş ağırlığı 100 mM tuz dozunda 0.02 g'a inmiştir. Bitki yaş ağırlığı tuzsuz ortamda, genel olarak epiBL kullanımı ile artmış; bunlardan 1.5 ve 2 µM epiBL dozları istatistiksel olarak önemli farklılık oluşturmuştur. 40 mM tuz dozunda ise, 0.5 ve 1.5 µM epiBL dozlarının yaş ağırlığı artırıcı etkisi istatistiksel olarak önemlidir. Diğer tuz dozlarında epiBL uygulamasızlara göre bitki yaş ağırlığı üzerine epiBL istatistiksel önemli farklılık oluşturmamıştır (Çizelge 3.9.). Anuradha ve Rao (2001), Anuradha ve Rao (2003) ve Özdemir vd., (2004) çeltik üzerine yaptığı çalışmalarda, bitki yaş ağırlığının tuz stresi ile olumsuz etkilendiğini ve kullanılan BR'lerin bu olumsuz etkiyi ortadan kaldırdığını gözlemişlerdir ve elde ettikleri bu sonuçlar çalışmamızla uyumludur. Çavuşoğlu ve Kabar (2007), turp tohumlarından gelişen fidelerin yaş ağırlığı üzerine 0.25 ve 0.30 M tuz stresine karşı epiBL'nin olumlu etkisini belirlemişlerdir. Ayrıca, araştırmacılar 0.35 M tuz stresine karşı EpiBL+Kin kombinasyonunun da olumlu etkisini gözlemişlerdir.

**Çizelge 3.9. Tuz stresine (0-100 mM) karşı epiBL uygulamsız ve uygulamalı tohumlardan gelişen bitkilerin yaş ağırlığı (g)**

EpiBL Dozları (µM)	Tuz Dozları (mM)					
	0	20	40	60	80	100
0	0.24±0.01 <sup>c</sup>	0.16±0.01	0.09±0.01 <sup>b</sup>	0.09±0.01	0.08±0.01	0.02±0.00
0.5	0.23±0.01 <sup>bc</sup>	0.16±0.01	0.12±0.01 <sup>a</sup>	0.10±0.01	0.06±0.009	0.03±0.003
1	0.26±0.02 <sup>bc</sup>	0.17±0.01	0.10±0.008 <sup>ab</sup>	0.07±0.01	0.06±0.009	0.03±0.01
1.5	0.30±0.01 <sup>a</sup>	0.17±0.01	0.12±0.01 <sup>a</sup>	0.06±0.01	0.07±0.009	0.04±0.00
2	0.26±0.01 <sup>ab</sup>	0.16±0.01	0.09±0.008 <sup>b</sup>	0.07±0.01	0.06±0.009	0.07±0.016

Değerler, ortalama±standart hatadır. Aynı sütundaki değerler bakımından, harflendirmeler P<0.05'de kontrole göre epiBL dozları arasındaki istatistiksel farklılığı göstermektedir.

EpiBL uygulamasız bitkilerin kuru ağırlığı tuz stresinden olumsuz etkilenmiştir. Bitki, kuru ağırlığı en yüksek tuz dozuna kadar (0, 20, 40, 60, 80 ve 100 mM NaCl) sırası ile 12.51, 10.43, 5.54, 6.84, 5.54 ve 2.30 mg olarak tespit edilmiştir. Çalışmamızda kontrolden 100 mM tuz dozuna kadar bitki kuru ağırlığında %82'lik azalma belirlenmiştir. Amini ve Ehsanpour (2006), tohum kültüründen gelişen Isfahani çeşidine ait bitkilerin kuru ağırlığını 0 mM NaCl'de 0.21 g, 40 mM NaCl'de 0.12 g, 80 mM NaCl'de 0.12 g, 120 mM ve 160 mM NaCl'de 0.01 g belirlemişlerdir. Shirazy çeşidinde ise aynı tuz dozlarında bitki kuru ağırlığını 0.21 g, 0.20 g, 0.16 g, 0.03 g ve 0.04 g bulmuşlardır. Araştırmacılar, bitki kuru ağırlığı bakımından Isfahani çeşidine %95 ve Shirazy çeşidinde %81 azalma tespit etmişlerdir. Dolayısı ile tuz stresi bizim çalışmamızdakine benzer olarak bitki kuru ağırlığını olumsuz etkilemiştir. Tuz stresine karşı epiBL'nin etkisini değerlendirdiğimizde, bitki kuru ağırlığı tuzsuz şartlarda epiBL uygulaması ile artış sergilerken, kullanılan dozlardan 1.5 ve 2 µM epiBL dozları istatistiksel olarak önemli fark oluşturmuştur. Bu sonuç yaş ağırlık sonuçları ile paralellik göstermiştir. 20 mM tuz stresinde ise 2 µM epiBL dozu kullanımının etkisi istatistiksel olarak önemlidir. 100 mM tuz stresi şartlarında ise epiBL uygulaması ile kuru ağırlık artış sergilemiştir ve 2 µM epiBL dozu önemli farklılık oluşturmuştur (Çizelge 3.10.). Çalışmamızda bitki kuru ağırlığı tuz stresi ile azalmış ve epiBL uygulamaları ile kuru ağırlıkta artış gözlenmiştir. Anuradha ve Rao (2001), Anuradha ve Rao (2003) ve Özdemir vd. (2004) çeltikte yaptıkları çalışmalar ile elde ettikleri sonuçlar yaptığımız çalışmamızdaki sonuçlarla paralellik göstermektedir.

**Çizelge 3.10. Tuz stresine (0-100 mM) karşı epiBL uygulamasız ve uygulamalı tohumlardan gelişen bitkilerin kuru ağırlığı (mg)**

EpiBL Dozları (µM)	Tuz Dozları (mM)					
	0	20	40	60	80	100
0	12.51±1.40 <sup>c</sup>	10.43±0.71 <sup>b</sup>	5.54±1.54	6.84±2.19	5.54±1.07	2.30±0.47 <sup>b</sup>
0.5	16.34±1.55 <sup>bc</sup>	10.27±1.14 <sup>b</sup>	6.30±1.43	5.54±1.05	4.13±0.78	4.82±1.25 <sup>ab</sup>
1	16.14±2.18 <sup>bc</sup>	9.72±0.92 <sup>b</sup>	4.88±0.60	3.27±0.61	4.72±1.12	4.40±1.49 <sup>ab</sup>
1.5	19.45±1.52 <sup>ab</sup>	10.31±0.66 <sup>b</sup>	6.72±1.16	2.92±0.51	5.42±1.21	3.85±0.25 <sup>ab</sup>
2	21.67±1.86 <sup>a</sup>	13.01±1.58 <sup>a</sup>	4.25±0.49	2.26±0.28	4.94±1.21	7.76±1.37 <sup>a</sup>

Değerler, ortalama±standart hatadır. Aynı sütundaki değerler bakımından, harflendirmeler P<0.05'de kontrole göre epiBL dozları arasındaki istatistiksel farklılığı göstermektedir.

Bitki yaprak sayısı epiBL uygulamasız tohumlardan gelişen bitkilerde tuz stresinden olumsuz etkilenmiştir. EpiBL uygulamasının etkisine baktığımızda, bitkilerin yaprak sayısı, 20, 40 ve 80 mM tuz dozlarında uygulama ile genel olarak artış göstermesine karşın istatistiki farklılık oluşturmamıştır. Sadece 100 mM tuz dozunda, 1 µM ve 2 µM epiBL uygulaması bitki yaprak sayısı üzerine istatistiksel olarak önemli fark oluşturmuştur (Çizelge 3.11.).

**Çizelge 3.11. Tuz stresine (0-100 mM) karşı epiBL uygulamasız ve uygulamalı tohumlardan gelişen bitkilerin yaprak sayısı (adet)**

EpiBL Dozları (µM)	Tuz Dozları (mM)					
	0	20	40	60	80	100
0	2.95±0.05	2.23±0.11	1.75±0.13	1.87±0.12	1.66±0.33	1.00±0.00 <sup>b</sup>
0.5	2.75±0.09	2.52±0.11	1.66±0.14	1.92±0.07	1.72±0.14	1.00±0.00 <sup>b</sup>
1	2.50±0.15	2.23±0.10	1.83±0.09	1.28±0.18	1.75±0.16	2.00±0.57 <sup>a</sup>
1.5	2.68±0.11	2.52±0.14	1.64±0.13	1.50±0.22	1.85±0.09	1.50±0.28 <sup>ab</sup>
2	2.72±0.10	2.52±0.14	1.77±0.10	1.83±0.16	1.70±0.15	2.00±0.00 <sup>a</sup>

Değerler, ortalama±standart hatadır. Aynı sütundaki değerler bakımından, harflendirmeler P<0.05'de kontrole göre epiBL dozları arasındaki istatistiksel farklılığı göstermektedir.

Tuz stresi altında bitkilerin kök gelişimi üzerine epiBL uygulamasının etkisi değerlendirildiğinde, tuzsuz ortamda, epiBL uygulaması genel olarak kök boyunu arttırmıştır ve 1.5 µM epiBL dozunun etkisi istatistiksel olarak önemli olmuştur. 20 mM tuz dozunda da 1 µM'dan itibaren tüm epiBL uygulamaları kök boyunu arttırmasına rağmen sadece 2 µM epiBL dozunun kök boyunu arttırması istatistiksel olarak anlamlıdır. 40 mM tuz dozunda, tüm epiBL uygulamaları, 60 mM tuz dozunda 0.5 µM epiBL uygulaması ve 100 mM tuz dozunda da tüm epiBL uygulamaları kök boyunu arttırmış ancak bu artış istatistiksel olarak önemli farklılık oluşturmamıştır (Çizelge 3.12.).

**Çizelge 3.12. Tuz stresine (0-100 mM) karşı epiBL uygulamasız ve uygulamalı tohumlardan gelişen bitkilerin kök boyu (cm)**

EpiBL Dozları (µM)	Tuz Dozları (mM)					
	0	20	40	60	80	100
0	5.15±0.20 <sup>b</sup>	4.82±0.09 <sup>b</sup>	4.65±0.18	4.74±0.28	5.04±0.33	2.85±0.83
0.5	5.02±0.23 <sup>b</sup>	4.73±0.14 <sup>b</sup>	5.20±0.33	4.78±0.30	4.52±0.13	3.80±0.55
1	5.82±0.51 <sup>ab</sup>	5.32±0.35 <sup>ab</sup>	4.98±0.14	4.45±0.37	4.10±0.11	4.02±0.13
1.5	6.27±0.40 <sup>a</sup>	4.95±0.17 <sup>ab</sup>	5.22±0.12	4.67±0.17	4.90±0.32	3.45±0.02
2	5.42±0.29 <sup>ab</sup>	5.50±0.12 <sup>a</sup>	4.80±0.21	4.35±0.35	4.33±0.20	4.20±0.39

Değerler, ortalama±standart hatadır. Aynı sütundaki değerler bakımından, harflendirmeler P<0.05'de kontrole göre epiBL dozları arasındaki istatistiksel farklılığı göstermektedir.

İn vitro tohum kültürü çalışmalarında bitki boyuna benzer şekilde kök boyu da tuz stresinden olumsuz etkilenmiştir. Çolak vd. (2008) ve Keser vd. (2009), bizim çalışmamıza uyumlu olarak gelişim gösteren domates bitkilerinin kök uzunluğunun tuz stresi altında azaldığını belirlemişlerdir. Keser vd. (2009), domates H-2274 çeşidinde kontrolde 3.44 cm olan kök boyu en yüksek tuz dozunda 1.85 cm'e düşmüştür. Smolik vd. (2011), yabani domates çeşidinde kontrole göre 100 mM'a kadar kök boyunun azaldığı ancak en yüksek tuz dozunda (125 mM) kontrole göre çok hafif arttığını gözlemişlerdir. *L. esculentum*'da yüksek tuz dozları kök boyunu arttırmıştır, ancak Awizo F<sub>1</sub> çeşidinde tuz uygulaması kök boyunu kontrole göre azaltmıştır. Araştırmacılar kök boyu üzerine genotipin, tuzluluğun ve genotip x tuzluluğun istatistiksel olarak önemli olduğunu ifade etmişlerdir. Oysa, Özdemir vd. (2004), tuz stresi altındaki çeltik fidelerinde 24-epiBL'nin etkisini araştırmışlar ve tuz stresine karşı tohuma uygulanan epiBL'nin kök boyu üzerine olumlu etkisini gözlememişlerdir. Çalışmamızda, tuzsuz şartlarda 1.5 µM ve 20 mM tuz dozunda 2 µM epiBL uygulamasının kök boyu üzerine olumlu etkileri belirlenmiştir.

Kök yaş ağırlığı, tuzsuz şartlarda epiBL uygulaması ile azalış sergilemiştir. Buna karşılık 20 mM tuz dozunda epiBL kullanımının olumlu etkisi görülmüştür ve 1 µM, 1.5 µM ve 2 µM epiBL dozlarının kök yaş ağırlığını arttırması istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. 40 mM tuz dozunda ise 0.5 µM epiBL uygulamasının kök yaş ağırlığını arttırması istatistiksel olarak önemli fark oluşturmuştur (Çizelge 3.13.).

**Çizelge 3.13. Tuz stresine (0-100 mM) karşı epiBL uygulamasız ve uygulamalı tohumlardan gelişen bitkilerin kök yaş ağırlığı (g)**

EpiBL Dozları (µM)	Tuz Dozları (mM)					
	0	20	40	60	80	100
0	0.122±0.049	0.010±0.000 <sup>b</sup>	0.017±0.001 <sup>b</sup>	0.017±0.002	0.014±0.002	0.020±0.010
0.5	0.038±0.004	0.013±0.001 <sup>ab</sup>	0.026±0.003 <sup>a</sup>	0.015±0.001	0.015±0.002	0.010±0.000
1	0.074±0.010	0.021±0.002 <sup>a</sup>	0.016±0.001 <sup>b</sup>	0.013±0.001	0.013±0.001	0.010±0.000
1.5	0.075±0.010	0.016±0.001 <sup>a</sup>	0.017±0.001 <sup>b</sup>	0.013±0.001	0.016±0.001	0.010±0.000
2	0.097±0.037	0.023±0.001 <sup>a</sup>	0.020±0.001 <sup>b</sup>	0.012±0.001	0.011±0.001	0.012±0.002

Değerler, ortalama±standart hatadır. Aynı sütundaki değerler bakımından, harflendirmeler P<0.05'de kontrole göre epiBL dozları arasındaki istatistiksel farklılığı göstermektedir.

EpiBL uygulamasız bitkilerin kök kuru ağırlığı tuz stresinin artışı ile azalma göstermektedir. Amini ve Ehsanpour (2006), Isfahani ve Shirazy çeşitlerinde bizim çalışmamızdaki sonuçlara benzer şekilde tuz stresinin bitki kök kuru ağırlığını olumsuz etkilediğini bulmuşlardır. Araştırmacılar, her iki çeşitte, 120 ve 160 mM tuz stresinde kök gelişiminin inhibe edildiğini bulmuşlardır. Çalışmamızda, kök kuru ağırlığı üzerine tuz stresine karşı kullandığımız epiBL'nin etkisini değerlendirdiğimizde, kök kuru ağırlığı tuzsuz şartlarda epiBL kullanımı ile artış sergilemiştir ve bunlardan 1.5 ve 2 µM epiBL dozları istatistiksel önemli farklılık oluşturmuştur. 20 mM tuz dozunda da benzer sonuçlar alınmış olup kök kuru ağırlığı üzerine 1.5 ve 2 µM epiBL uygulaması istatistiksel önemli olmuştur. Diğer tuz dozlarında epiBL'nin olumlu etkisi gözlenmemiştir (Çizelge 3.14).

**Çizelge 3.14. Tuz stresine (0-100 mM) karşı epiBL uygulamasız ve uygulamalı tohumlardan gelişen bitkilerin kök kuru ağırlığı (mg)**

EpiBL Dozları (µM)	Tuz Dozları (mM)					
	0	20	40	60	80	100
0	3.68±0.49 <sup>b</sup>	1.22±0.09 <sup>b</sup>	1.20±0.27	1.14±0.29	1.25±0.30	1.66±0.29
0.5	4.45±0.67 <sup>ab</sup>	1.16±0.03 <sup>b</sup>	1.55±0.40	1.08±0.17	0.83±0.19	1.38±0.35
1	5.10±0.92 <sup>ab</sup>	1.30±0.13 <sup>b</sup>	1.12±0.13	0.80±0.21	0.90±0.19	0.76±0.31
1.5	6.93±1.23 <sup>a</sup>	1.95±0.15 <sup>a</sup>	1.02±0.12	0.52±0.11	1.12±0.18	0.90±0.30
2	6.87±1.11 <sup>a</sup>	1.93±0.17 <sup>a</sup>	0.95±0.07	0.50±0.11	0.88±0.20	1.60±0.57

Değerler, ortalama±standart hatadır. Aynı sütundaki değerler bakımından, harflendirmeler P<0.05'de kontrole göre epiBL dozları arasındaki istatistiksel farklılığı göstermektedir.

Genel olarak değerlendirdiğimizde, tohum çimlenmesini takiben gerekleŖen sürgün geliŖimi ile ilgili parametrelerde kontrol, dŖk, orta ve en yüksek tuz dozlarına karŖı özellikle 1  $\mu\text{M}$ , 1.5  $\mu\text{M}$  ve 2  $\mu\text{M}$  epiBL uygulamalarının olumlu etkisi gzlenmiŖtir.

Tuz stresine karŖı epiBL'nin etkilerini belirlemeye yönelik yaptığımız in vitro tohum kültürü alıŖmasında, tohum çimlenmesi ve bitkilerin geliŖimsel özelliklerinin yanında pigment içerikleri de belirlenmiŖtir. EpiBL uygulamasız bitkilerde klorofil a içeriği 7.24  $\mu\text{g/ml}$  iken 20, 40 ve 60 mM tuz dozlarında klorofil a içeriği artmıŖ, yüksek tuz dozlarında ise azalmıŖtır. alıŖmamızla benzer Ŗekilde KuŖvuran vd. (2008), iklim odasında vermikulitte yetiŖtirdikleri farklı kavun genotiplerinde genelde tuz stresinin klorofil içeriğini azalttığını ancak, bazı eŖit genotiplerinde (Ananas ve Ŗemame) içeriğin arttığını gzlemiŖlerdir. Bu durum, tuzlu koŖullarda büyüyen bitkilerin yapraklarının kk, renginin de koyu yeŖil olması ile aıklanmıŖtır. Dlek (2009), farklı karpuz genotiplerine ait tohumları perlitte imlendirmiŖ ve akabinde su kültüründe geliŖimlerini sađlamıŖtır. AraŖtırıcı, yaprakların klorofil içeriklerinin tuz stresinden önemli düzeyde etkilendiğini ve genel olarak farklı genotiplerde tuz stresinin 150 mM'a yükselmesiyle birlikte, symptom derecesi yüksek olan genotiplerde genel olarak klorofilin yüksek olduğu, büyümedeki gerilemeyle birlikte klorofilin konsantre hale geldiğini gzlemiŖlerdir. Bu durum, fotosentetik alanların klmesi, KuŖvuran vd. (2008)'nin de belirttiği gibi tuzlu koŖullarda büyüyen bitkilerin kk yapraklı ve koyu yeŖil renkte olmasıyla iliŖkilendirilmiŖtir. Heidari vd. (2014), serada toprakta yetiŖtirdikleri ayeği bitkisinde klorofil içeriğinin kontrole göre tuz stresi ile arttığını ve bunun tuz stresi altındaki bitkilerin yapraklarındaki kloroplast sayısının artması ile ilgili olabileceğini belirtmiŖlerdir. Baran ve Doğan (2014), soya tohumlarını perlitte yetiŖtirmiŖler ve 30 günlük bitkiciklerde kontrole göre 100 mM'a kadar klorofil a içeriğinin arttığını, 150 mM'a kadar azaldığını belirlemiŖlerdir. Farklı türlerde farklı kültürlerle elde edilen bitkilerin pigment analizleri sonucunda, genellikle artan tuz stresine karŖı klorofil a içeriğinin azaldığı gzlenmiŖtir. Amini ve Ehsanpour (2006), Isfahani ve Shirazy eŖitlerinde tohumları MS ortamı içeren petri kaplarında kültüre almıŖlar ve 21 gün sonra geliŖen bitkilerde kontrolden 160 mM'a NaCl stresine kadar klorofil a içeriğinin gittikçe azaldığını belirlemiŖlerdir. Aly vd. (2012) *Trifolium alexandrinum* L. trnn tohumlarını yarı güçlü MS ( $\frac{1}{2}$  MS) ortamında kültüre

almışlar ve 3 haftalık fidelerin klorofil a içeriğinin benzer şekilde tuz stresinin artışı ile azalma gösterdiğini ifade etmişlerdir. Araştırmacılar, fotosentetik etkinlikte önemli rolü olan klorofil içeriğindeki azalmanın klorofil sentezinin azalması ya da degradasyonunun artmasına bağlamışlardır. Yokaş vd. (2008), domates Target NF1 çeşidinde sera denemelerinden elde ettikleri bitkiciklerde klorofil a içeriğini araştırmışlar ve aynı şekilde artan tuz stresine karşı klorofil içeriğinin önemli şekilde düşüş sergilediğini gözlemişlerdir. Akça ve Samsunlu (2012), saksı denemeleri ile tohumdan bitki elde etmişler ve cevizde tuz stresinin klorofil a içeriğini olumsuz etkilediğini ifade etmişlerdir. Araştırmacılar, literatürleri değerlendirdiklerinde tuz stresi altında klorofil a içeriğinin azalmasını iyon birikiminden kaynaklanabileceğini veya stoma açılma ve kapanmasındaki düzensizlikten olabileceğini belirtmişlerdir. Ayrıca, klorofil içeriğindeki azalma, yaprakların hızlı gelişmesi ile de ilişkilendirilmiştir. Genel olarak literatürlere bakıldığında stres şartlarında klorofili parçalayan klorofilaz enzimi aktivitesindeki artışa bağlı olarak klorofil içeriğinin azaldığı belirtilmektedir (Yıldıztekin, 2012). Tez çalışmamızda, tuz stresine karşı epiBL'nin etkisini değerlendirdiğimizde, tuzsuz şartlarda epiBL uygulaması genel olarak klorofil a içeriğini arttırmıştır ve bunlardan 1.5 ve 2  $\mu$ M epiBL dozları istatistiksel olarak önemli farklılık oluşturmuştur. 20, 40 ve 60 mM tuz dozlarında ise, epiBL uygulamasının önemli etkisi olmamıştır. tuz dozunda epiBL uygulamasının olumlu etkisi görülmemiştir. 80 mM tuz dozunda tüm epiBL uygulaması olumlu etki sergilemiştir ve istatistiki olarak farklılık önemli olmuştur. 100 mM tuz dozunda epiBL uygulaması klorofil a içeriğini arttırmış; bunlardan sadece 2  $\mu$ M epiBL dozu istatistiksel olarak farklılık önemli olmuştur (Çizelge 3.15.).

**Çizelge 3.15. Tuz stresine (0-100 mM) karşı epiBL uygulamasız ve uygulamalı tohumlardan gelişen bitkilerin klorofil a içeriği (µg/ml)**

EpiBL Dozları (µM)	Tuz Dozları (mM)					
	0	20	40	60	80	100
0	7.24±0.76 <sup>cd</sup>	8.37±0.99 <sup>ab</sup>	8.25±0.65	8.87±0.27	7.14±0.33 <sup>b</sup>	5.53±0.13 <sup>b</sup>
0.5	5.81±0.63 <sup>d</sup>	8.52±0.92 <sup>ab</sup>	8.10±0.21	7.84±0.77	9.12±0.80 <sup>a</sup>	7.06±0.27 <sup>ab</sup>
1	8.52±0.41 <sup>bc</sup>	9.12±0.89 <sup>ab</sup>	7.92±0.36	7.53±0.20	9.15±0.57 <sup>a</sup>	6.66±1.15 <sup>ab</sup>
1.5	11.41±0.43 <sup>a</sup>	10.50±0.04 <sup>a</sup>	8.31±1.20	7.31±0.17	9.74±0.33 <sup>a</sup>	6.39±0.64 <sup>b</sup>
2	9.85±0.88 <sup>ab</sup>	6.98±0.78 <sup>b</sup>	7.54±0.65	9.77±1.83	8.82±0.17 <sup>a</sup>	8.65±0.46 <sup>a</sup>

Değerler, ortalama±standart hatadır. Aynı sütundaki değerler bakımından, harflendirmeler P<0.05'de kontrole göre epiBL dozları arasındaki istatistiksel farklılığı göstermektedir.

EpiBL uygulamasız bitkilerin klorofil b içeriği, kontrole göre tuz stresi ile artış göstermiştir (Çizelge 3.16.). Amini ve Ehsanpour (2006), kullandıkları Isfahani ve Shirazy çeşitlerinde klorofil b içeriğini tuz stresinin düşürdüğünü belirtmişlerdir. Araştırmacıların sonuçları bizim sonuçlarımızla uyumlu değildir.

**Çizelge 3.16. Tuz stresine (0-100 mM) karşı epiBL uygulamasız ve uygulamalı tohumlardan gelişen bitkilerin klorofil b içeriği (µg/ml)**

EpiBL Dozları (µM)	Tuz Dozları (mM)					
	0	20	40	60	80	100
0	1.44±0.42 <sup>b</sup>	2.94±0.41 <sup>ab</sup>	2.72±0.21	3.04±0.24 <sup>a</sup>	2.73±0.15	3.19±0.48
0.5	1.02±0.39 <sup>b</sup>	2.68±0.24 <sup>ab</sup>	2.78±0.08	2.55±0.31 <sup>ab</sup>	2.89±0.25	3.21±0.34
1	1.15±0.29 <sup>b</sup>	3.02±0.32 <sup>ab</sup>	2.86±0.05	1.74±0.27 <sup>b</sup>	2.69±0.14	2.21±0.38
1.5	2.67±0.01 <sup>a</sup>	3.44±0.05 <sup>a</sup>	3.09±0.28	2.49±0.16 <sup>ab</sup>	3.02±0.08	2.42±0.25
2	1.66±0.49 <sup>ab</sup>	2.24±0.34 <sup>b</sup>	2.84±0.08	3.06±0.63 <sup>a</sup>	3.50±0.44	3.16±0.09

Değerler, ortalama±standart hatadır. Aynı sütundaki değerler bakımından, harflendirmeler P<0.05'de kontrole göre epiBL dozları arasındaki istatistiksel farklılığı göstermektedir.

Çalışmamızda, klorofil b içeriği tuz dozlarına ve epiBL uygulamalarına bağlı olarak çok fazla değişiklik göstermemiştir. Tuzsuz ortamda klorofil b içeriği, 1.5 ve 2 µM epiBL dozları tarafından artış sergilemiştir. Sadece 1.5 µM epiBL dozu istatistiksel olarak farklılık önemli olmuştur. Diğer tuz dozlarında da epiBL uygulaması klorofil b içeriği üzerine istatistiksel önemli fark oluşturmamıştır (Çizelge 3.16.).



EpiBL uygulamasız bitkilerin toplam klorofil içeriği de tuz stresinde artış göstermiştir. Amini ve Ehsanpour (2006), kullandıkları iki domates çeşidinin tohum kültürlerinden gelişen bitkilerinde, artan tuz stresi şartlarında toplam klorofil içeriğinin azaldığını ifade etmişlerdir. Bizim sonuçlarımızla araştırmacıların sonuçları uyumlu değildir ancak, çalışmamızda klorofil a içeriğinde de açıkladığımız gibi toplam klorofil içeriğinin artışı kültürden gelen bitkilerin vejetatif aksamının iyi olmasından kaynaklanmıştır. Tuz stresine karşı epiBL uygulamalarının toplam klorofil içeriği üzerine etkisi değerlendirildiğinde tuzsuz ortamda epiBL uygulaması toplam klorofil içeriğini arttırmıştır, 1.5 µM epiBL dozu istatistiksel olarak önemli farklılık oluşturmuştur. 20, 40, 60 ve 100 mM tuz dozlarında ise epiBL uygulamalarının toplam klorofil içeriği üzerinde istatistiksel olarak önemli fark oluşturmamıştır. 80 mM tuz dozunda ise tüm epiBL dozları toplam klorofil içeriğini arttırmış ve istatistiksel olarak önemli farklılık oluşturmuştur (Çizelge 3.17.).

**Çizelge 3.17. Tuz stresine (0-100 mM) karşı epiBL uygulamasız ve uygulamalı tohumlardan gelişen bitkilerin toplam klorofil içeriği (µg/ml)**

EpiBL Dozları (µM)	Tuz Dozları (mM)					
	0	20	40	60	80	100
0	8.63±1.18 <sup>bc</sup>	10.77±1.54 <sup>ab</sup>	10.98±0.87	11.89±0.51 <sup>a</sup>	9.33±0.04 <sup>b</sup>	8.78±0.33 <sup>ab</sup>
0.5	6.96±1.03 <sup>c</sup>	10.91±0.94 <sup>ab</sup>	10.89±0.22	10.49±1.09 <sup>ab</sup>	11.99±1.05 <sup>a</sup>	10.34±0.63 <sup>ab</sup>
1	9.54±0.42 <sup>bc</sup>	12.14±1.21 <sup>ab</sup>	10.79±0.39	7.39±1.23 <sup>b</sup>	11.68±0.68 <sup>a</sup>	8.78±1.50 <sup>ab</sup>
1.5	14.03±0.42 <sup>a</sup>	13.96±0.10 <sup>a</sup>	11.40±1.48	9.75±0.01 <sup>ab</sup>	12.54±0.38 <sup>a</sup>	8.56±0.84 <sup>b</sup>
2	11.63±1.17 <sup>ab</sup>	9.24±1.12 <sup>b</sup>	10.38±0.73	12.36±2.39 <sup>a</sup>	12.25±0.61 <sup>a</sup>	11.66±0.53 <sup>a</sup>

Değerler, ortalama±standart hatadır. Aynı sütundaki değerler bakımından, harflendirmeler P<0.05'de kontrole göre epiBL dozları arasındaki istatistiksel farklılığı göstermektedir

Karotenoid içeriği, tuzsuz ortamda 1 µM, 1.5 µM ve 2 µM epiBL uygulaması ile artmış ve bu artış istatistiksel olarak önemlidir. 20 mM tuz dozunda 1.5 µM epiBL; 60 mM tuz dozunda 2 µM epiBL dozu karotenoid içeriğini arttırmasına karşın istatistiksel olarak farklılık oluşturmamıştır. 80 mM tuz stresinde epiBL kullanımı karotenoid pigment içeriği üzerine istatistiksel olarak önemli etki göstermemiştir. 100 mM tuz dozunda ise kullanılan tüm epiBL konsantrasyonları istatistiksel olarak önemli farklılık göstererek iyileştirici etkisini sergilemiştir (Çizelge 3.18.).

**Çizelge 3.18. Tuz stresine (0-100 mM) karşı epiBL uygulamasız ve uygulamalı tohumlardan gelişen bitkilerin karotenoid içeriği (µg/ml)**

EpiBL Dozları (µM)	Tuz Dozları (mM)					
	0	20	40	60	80	100
0	1.50±0.14 <sup>b</sup>	1.74±0.22 <sup>ab</sup>	1.74±0.15	1.81±0.01 <sup>ab</sup>	1.78±0.09	0.77±0.23 <sup>b</sup>
0.5	1.48±0.03 <sup>b</sup>	1.70±0.12 <sup>ab</sup>	1.64±0.08	1.66±0.12 <sup>ab</sup>	1.96±0.17	1.44±0.01 <sup>a</sup>
1	2.11±0.15 <sup>a</sup>	1.19±0.23 <sup>ab</sup>	1.51±0.09	1.28±0.19 <sup>b</sup>	1.94±0.12	1.40±0.20 <sup>a</sup>
1.5	2.44±0.04 <sup>a</sup>	2.15±0.02 <sup>a</sup>	1.60±0.25	1.46±0.11 <sup>ab</sup>	2.02±0.04	1.31±0.13 <sup>a</sup>
2	2.17±0.19 <sup>a</sup>	1.45±0.16 <sup>b</sup>	1.32±0.19	1.90±0.29 <sup>a</sup>	1.72±0.07	1.83±0.13 <sup>a</sup>

Değerler, ortalama±standart hatadır. Aynı sütundaki değerler bakımından, harflendirmeler P<0.05'de kontrole göre epiBL dozları arasındaki istatistiksel farklılığı göstermektedir.

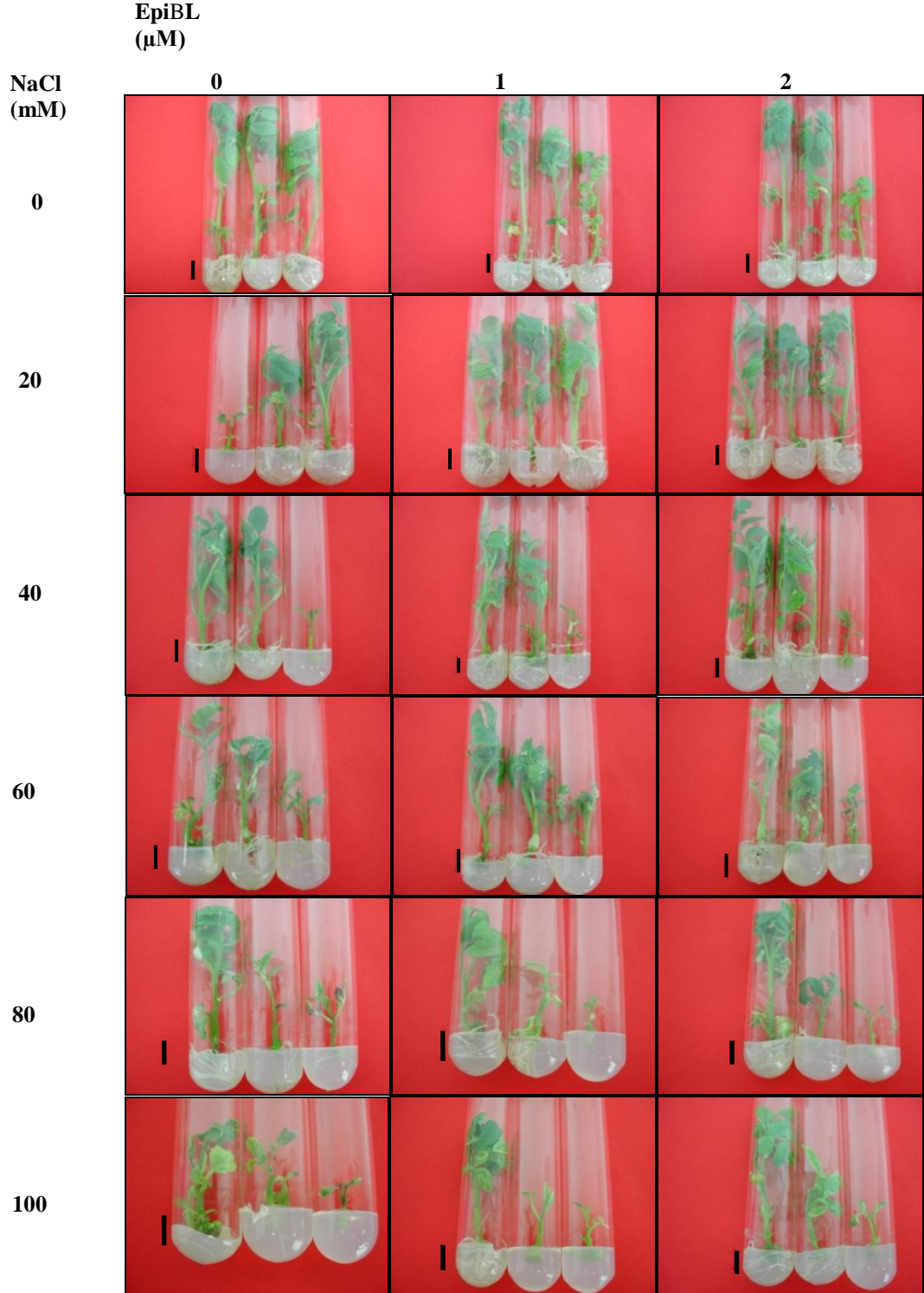
Tohum kültüründen gelişen bitkilerin pigment içeriklerine baktığımızda tuzsuz ortamda genel olarak 1.5 µM epiBL uygulamasının olumlu etkisi gözlenmiştir. Yüksek tuz dozlarında ise, klorofil b içeriği haricinde diğer tüm pigment içerikleri üzerine yapılan epiBL uygulamalarının hepsinin olumlu etkisi belirlenmiştir. Anuradha ve Rao (2003), çeltikte tuz stresi altında BL uygulamalarının pigment içeriğini iyileştirdiğini ifade etmişlerdir.

### 3.2. İn Vitro Sürgün Ucu Kültürü Çalışmalarına Ait Bulgular

10 günlük steril fidelerin sürgün uçları 2 mg/l Kin+0.4 mg/l NAA ilaveli ortamda kültüre alınmış ve sürgünlerin gelişimleri sağlandıktan sonra artan tuz dozlarını içeren MS ortamında kültüre alınmışlardır. Farklı tuz dozlarını içeren MS ortamlarının aşağıdaki EC değerleri ölçülmüştür.

- i. 0 mM NaCl (kontrol) ilaveli MS ortamı = 5.65 mS/cm
- ii. 20 mM NaCl ilaveli MS ortamı = 7.69 mS/cm
- iii. 40 mM NaCl ilaveli MS ortamı = 9.34 mS/cm
- iv. 60 mM NaCl ilaveli MS ortamı = 11.56 mS/cm
- v. 80 mM NaCl ilaveli MS ortamı = 14.23 mS/cm
- vi. 100 mM NaCl ilaveli MS ortamı = 15.40 mS/cm

1 aylık kültür sürecinden sonra bitki gelişiminin (bitki boyu, yaprak oluşumu ve kök gelişimi) tuz stresinden olumsuz etkilendiği gözlenmiştir (Şekil 3.7.).



Şekil 3.7. Kültüre alınan sürgün uçlarından 30 gün sonra gelişen bitkilerden örnekler (Ölçü çizgisi: 1 cm)

Artan tuz dozlarını içeren MS ortamında ölçülen EC değerleri yükselmiş ve tohum kültüründe kullanılan ½ MS ortamındakine göre EC değerlerinde artış gözlenmiştir. Kontrolde 5.65 mS/cm olan EC değeri 20 mM tuz dozunda 7.69 mS/cm'e çıkmıştır ve bitki gelişiminde açık bir gerileme gözlenmemiştir. 40 ve 60 mM tuz dozlarında 9.34 ve 11.56 mS/cm olan EC değerleri ile gelişimin gerilediği açıktır ve yüksek tuz dozlarında 14.23 ve 15.40 mS/cm olan yüksek EC değerlerinde bitki gelişiminin oldukça etkilendiği belirlenmiştir.

Tabandan yaprak uçlarına kadar ölçülen bitki boyu 0 ve 20 mM tuz dozlarında yüksek iken, artan tuz dozlarına bağlı olarak azalış göstermiş ve en yüksek tuz dozunda en düşük değerini almıştır. En yüksek bitki boyu 20 mM NaCl dozunda 2 µM epiBL uygulamalı bitkilerde 11.09 cm; en düşük ise 100 mM tuz dozunda epiBL uygulamazlarda (0 µM epiBL dozunda, sadece %70 aseton uygulaması yapılanlar) 3.33 cm olarak ölçülmüştür. Tez çalışmamızın sonuçlarına benzer şekilde Mercado vd. (2000), domates Pera ve Hellfrucht früshtamm (HF) çeşitlerinde apikal gövde ekplantlarını 0, 43, 86, 129 ve 172 mM NaCl çeren MS ortamında kültüre almışlardır ve artan tuz stresi ile sürgün boyunun olumsuz etkilendiğini bulmuşlardır. Shibli vd. (2007), in vitro mikrosürgün kültürlerinden gelişen sürgünlerin boyunun tuz stresinden olumsuz etkilendiğini bulmuşlardır. Roma çeşidinde 0, 50, 100, 150, 200 mM tuz dozlarında sürgün boyunu sırası ile 10.4 cm, 6.9 cm, 5.4 cm, 3.9 cm ve 2.7 cm; Patio çeşidinde sürgün boyunun 5.8 cm, 3.7 cm, 3.3 cm, 2.8 cm ve 2.4 cm olarak belirlemişlerdir. Ayrıca, Cano vd. (1998)'e göre Shibli vd. (2007), sürgün ucu kültürlerinin yüksek genetik stabilitesinden dolayı tuz toleransını test etmede hücre kültürlerine göre daha iyi ve avantajlı sistem olduklarını ifade etmişlerdir. Abu-Khadejeh vd. (2011), domates JO112 ve JO992 çeşitlerinde in vitro mikrosürgünleri kullanmışlar ve 0, 50, 100, 150 ve 200 mM dozlarda eşit hacimde NaCl:CaCl<sub>2</sub> tuzları içeren ortamda kültüre almışlardır. Kültürde 4 hafta sonunda JO112 çeşidinde kontrolde sürgün boyu 9.16 cm iken, en yüksek tuz dozunda (200 mM) sürgün boyunun 3.24 cm'e düştüğünü belirlemişlerdir. JO992 çeşidinde kontrolde sürgün boyu 10.32 cm iken, en yüksek tuz dozunda 3.54 cm ölçmüşlerdir. Çalışmamız ile araştırmacıların çalışmasının sonuçları tuz stresinin gelişimi olumsuz etkilemesi hususunda benzerdir ancak, bizim çalışmamızda en yüksek tuz dozu (100 mM) bitki boyunu 3.33 cm'e düşürürken araştırmacıların çalışmasında 100 mM tuz dozunda

sürgün boyu JO112 çeşidinde 5.86 cm ve JO992 çeşidinde 8.54 cm bulunmuştur. Araştırmacıların sonuçlarını değerlendirdiğimizde, tuz stresinin bitki gelişimini geriletmediği ve bitki boyunu azalttığı açıktır. Ancak, kullanılan farklı genotiplerde farklı tuz çeşitlerine göre bitki boyundaki farklılıklar bize tuz stresine yanıtta kullanılan domates çeşidinin ve tuz tipinin önemini yansıtmaktadır. Tez çalışmamızda tuz stresinin olumsuz etkisini ortadan kaldırmada kullandığımız epiBL'nin etkisine baktığımızda; sadece en yüksek tuz dozunda (100 mM) 2 µM epiBL uygulaması, ortalama bitki boyunu arttırmıştır ve artış istatistiksel olarak önemli olmuştur (Çizelge 3.19.).

**Çizelge 3.19. Tuz stresine karşı epiBL uygulamasız ve uygulamalı sürgün uçlarından gelişen 30 günlük bitkilerin boyu (cm)**

EpiBL Dozları (µM)	Tuz Dozları (mM)					
	0	20	40	60	80	100
0	10.90±0.43	10.25±0.68	7.57±0.60	7.40±0.34	6.15±0.45 <sup>a</sup>	3.33±0.23 <sup>b</sup>
1	10.13±0.42	10.98±0.44	7.82±0.74	7.35±0.36	3.44±0.31 <sup>b</sup>	3.89±0.35 <sup>ab</sup>
2	9.94±0.40	11.09±0.51	7.45±0.55	7.19±0.43	4.74±0.42 <sup>ab</sup>	4.29±0.32 <sup>a</sup>

Değerler, ortalama±standart hatadır. Aynı sütundaki değerler bakımından, harflendirmeler P<0.05'de kontrole göre epiBL dozları arasındaki istatistiksel farklılığı göstermektedir.

Bitki yaş ağırlığı 0, 20 ve 40 mM tuz dozlarında yüksek iken, 60 mM tuz dozundan itibaren azalmaya başlamıştır. 100 mM tuz dozunda ise bitki yaş ağırlığında keskin azalış gözlenmiştir. Bitki yaş ağırlığı en yüksek 20 mM tuz dozunda 2 µM epiBL uygulamalı bitkilerde 1.10 g olarak tespit edilmiştir. En düşük yaş ağırlık 100 mM tuz dozunda epiBL uygulamasız bitkilerde gözlenmiştir (0.18 g). Bitki yaş ağırlığı tuzsuz şartlara göre, 20 mM tuz dozunda yükselmiş, tuzluluğun artışına bağlı olarak yaş ağırlıkta genelde bir azalma gözlenmiştir. Shibli vd. (2007), bizim çalışmamıza benzer şekilde kullandıkları Roma ve Patio çeşitlerinin mikrosürgün kültürlerinden gelişen bitkilerin yaş ağırlığının artan tuz dozları ile azaldığını belirlemişlerdir. Roma çeşidinde, 0 mM'dan 200 mM'a kadar artan tuz dozlarına göre bitki yaş ağırlığının 1.1 g'dan 0.6 g'a düştüğünü belirlemişlerdir. Araştırmacılar, Patio çeşidinde yaş ağırlığın tuz stresinden etkilenmediğini kontrolde 1.14 g olan yaş ağırlığı 200 mM tuz stresinde 1.2 g bulmuşlardır. Abu-Khadejeh vd. (2011), kültürde 4 hafta sonunda JO112 çeşidinde kontrolde sürgün yaş ağırlığını 2.67 g ve artan tuz stresinde ise

sırası ile 1.97 g, 1.36 g, 0.64 ve 0.54 g; JO992 çeşidinde kontrolden en yüksek tuz dozuna kadar sürgün yaş ağırlığını 2.68 g, 2.10 g, 1.43 g, 0.75 g ve 0.58 g bulmuşlardır. Araştırmacıların bulguları bizim bulgularımızla paraleldir ancak, sürgün boyunda olduğu gibi çeşit farklılığına bağlı olarak bizim kullandığımız çeşitte yaş ağırlık daha düşük seyretmiştir. Tuz stresine karşı epiBL'nin etkisi değerlendirildiğinde, 20 mM ve 100 mM tuz dozlarında kontrole (epiBL uygulamasız) göre, her iki epiBL uygulamasında da yaş ağırlığı arttırmış ancak, 2 µM epiBL uygulaması istatistiksel olarak önemli farklılık oluşturmuştur (Çizelge 3.20.).

**Çizelge 3.20. Tuz stresine karşı epiBL uygulamasız ve uygulamalı sürgün uçlarından gelişen 30 günlük bitkilerin yaş ağırlığı (g)**

EpiBL Dozları (µM)	Tuz Dozları (mM)					
	0	20	40	60	80	100
0	0.75±0.03	0.81±0.06 <sup>b</sup>	0.74±0.08	0.52±0.04	0.41±0.04 <sup>a</sup>	0.18±0.03 <sup>b</sup>
1	0.73±0.03	0.98±0.06 <sup>ab</sup>	0.84±0.08	0.52±0.04	0.21±0.03 <sup>b</sup>	0.25±0.04 <sup>ab</sup>
2	0.70±0.03	1.10±0.04 <sup>a</sup>	0.66±0.07	0.55±0.04	0.36±0.05 <sup>ab</sup>	0.39±0.05 <sup>a</sup>

Değerler, ortalama±standart hatadır. Aynı sütundaki değerler bakımından, harflendirmeler P<0.05'de kontrole göre epiBL dozları arasındaki istatistiksel farklılığı göstermektedir.

Bitki kuru ağırlığı, tuzsuz ve düşük tuz içeren ortamlarda yüksek iken; 40 mM tuz dozundan itibaren azalış göstermiştir. Bitki kuru ağırlığı en yüksek, 20 mM tuz dozunda 1 µM epiBL uygulamalı bitkilerde 149.33 mg belirlenirken; en yüksek tuz dozunda epiBL uygulamasızlarda 20.00 mg gözlenmiştir. Çalışmamızda bitki kuru ağırlığı epiBL uygulamasızlarda artan tuz dozlarına göre sırası ile 96.11 mg, 91.36 mg, 72.78 mg, 53.24 mg, 54.10 mg ve 20.00 mg bulunmuştur. Shibli vd. (2007), in vitro mikrosürgün kültürlerinden gelişen bitkilerin kuru ağırlığını Roma çeşidinde, kontrolde 69 mg, en yüksek tuz dozunda 47 mg olduğunu; Patio çeşidinde ise kontrolde 104 mg olan kuru ağırlığın en yüksek tuz dozunda 93 mg'a düştüğünü tespit etmişlerdir. Roma çeşidine göre Patio çeşidinde kuru ağırlık daha yüksek olmuş ve kuru ağırlık parametresi bakımından kullanılan Patio çeşidinin tuz stresine daha fazla tolerans gösterdiği belirlenmiştir. Çalışmamızla benzer şekilde, Abu-Khadejeh vd. (2011), JO112 çeşidinde kontrolde sürgün kuru ağırlığını 94.40 mg ve artan tuz stresinde ise sırası ile 110.80 mg, 67.20 mg, 51.00 mg ve 32.00 mg; JO992

çeşidinde kontrolden en yüksek tuz dozuna kadar sürgün kuru ağırlığını 94.80 mg, 99.80 mg, 104.00 mg, 89.60 mg ve 61.40 mg bulmuşlardır. Çalışmamızda, tuz stresine karşı epiBL'nin etkisine bakıldığında; sadece 20 mM tuz dozunda her iki konsantrasyondaki epiBL uygulamasının kuru ağırlığı arttırması istatistiksel olarak önemli farklılık oluşturmuştur (Çizelge 3.21.).

**Çizelge 3.21. Tuz stresine karşı epiBL uygulamasız ve uygulamalı sürgün uçlarından gelişen 30 günlük bitkilerin kuru ağırlığı (mg)**

EpiBL Dozları (µM)	Tuz Dozları (mM)					
	0	20	40	60	80	100
0	96.11±8.28	91.36±9.78 <sup>b</sup>	72.78±14.75	53.24±5.57	54.10±17.06	20.00±4.45
1	114.65±5.13	149.33±7.70 <sup>a</sup>	76.44±10.38	55.50±10.09	20.72±5.88	24.64±11.38
2	87.63±8.86	135.28±8.80 <sup>a</sup>	66.34±13.88	57.25±7.22	42.48±16.55	48.92±14.83

Değerler, ortalama±standart hatadır. Aynı sütundaki değerler bakımından, harflendirmeler P<0.05'de kontrole göre epiBL dozları arasındaki istatistiksel farklılığı göstermektedir.

Genel olarak bitkilerin kök boyunun 0, 20, 40, 60 ve 80 mM tuz dozlarında birbirine yakın olduğu gözlenmiştir. Ancak, 100 mM tuz dozunda hafif bir azalmanın olduğu da belirlenmiştir. En yüksek kök boyu, 20 mM tuz dozunda 2 µM epiBL uygulamalı bitkilerde gözlenirken (8.71 cm); en düşük kök boyu 100 mM tuz dozunda epiBL uygulamasız bitkilerde belirlenmiştir (5.35 cm). Tez çalışmamızın sonuçlarına benzer şekilde Cano vd. (1998), *L. esculentum* ve *L. pennellii* türlerinde in vitro sürgün eksplantlarından gelişen bitkilerin köklenmesi üzerine tuz stresinin olumsuz etkilerini belirlemişlerdir. Mercado vd. (2000), domates Pera ve HF çeşitlerinde apikal gövde ekplantlarından gelişen sürgünlerin artan tuz stresi altında kök gelişimlerinin olumsuz etkilendiğini bulmuşlardır. Buna karşılık Shibli vd. (2007), Roma ve Patio çeşitlerinde kök boyunun artan tuz stresinden olumsuz etkilenmediğini tespit etmişlerdir. Abu-Khadejeh vd. (2011), kültürde 4 haftanın sonunda JO112 çeşidinde kontrolde sürgün kök boyunu 8.72 cm ve artan tuz stresinde ise sırası ile 8.82 cm, 5.88 cm, 3.14 cm ve 0.22 cm; JO992 çeşidinde kontrolden en yüksek tuz dozuna kadar sürgün kök boyunu 9.98 cm, 10.12 cm, 8.94 cm, 2.30 cm ve 0.12 cm belirlemişlerdir. Araştırmacıların sonuçları bizim elde ettiğimiz sonuçlarla uyumludur. Araştırmacılar, 100 mM tuz dozundan sonra kök boyunun çok azaldığını ve en yüksek tuz dozunda (200 mM) vurucu bir düşüş

belirlemişlerdir. Tez çalışmamızda tuz stresine karşı epiBL'nin etkisini değerlendirdiğimizde, 20, 40 ve 100 mM tuz dozlarında epiBL uygulaması kök boyunu arttırsa da tuz stresine karşı epiBL uygulamasının etkisinin istatistiksel olarak önemli fark oluşturmadığı belirlenmiştir (Çizelge 3.22.).

**Çizelge 3.22. Tuz stresine karşı epiBL uygulamasız ve uygulamalı sürgün uçlarından gelişen 30 günlük bitkilerin kök boyu (cm)**

EpiBL Dozları ( $\mu$ M)	Tuz Dozları (mM)					
	0	20	40	60	80	100
0	8.13 $\pm$ 0.19 <sup>a</sup>	7.88 $\pm$ 0.28	7.03 $\pm$ 0.36	6.16 $\pm$ 0.26	7.43 $\pm$ 0.45	5.35 $\pm$ 0.61
1	7.41 $\pm$ 0.19 <sup>b</sup>	8.02 $\pm$ 0.35	7.15 $\pm$ 0.35	5.97 $\pm$ 0.27	6.26 $\pm$ 0.56	6.71 $\pm$ 0.67
2	8.00 $\pm$ 0.22 <sup>ab</sup>	8.71 $\pm$ 0.25	7.10 $\pm$ 0.53	6.12 $\pm$ 0.29	7.24 $\pm$ 0.53	5.94 $\pm$ 0.59

Değerler, ortalama $\pm$ standart hatadır. Aynı sütundaki değerler bakımından, harflendirmeler P<0.05'de kontrole göre epiBL dozları arasındaki istatistiksel farklılığı göstermektedir.

Kök yaş ağırlığı, 0 ve 20 mM tuz dozlarında yüksek iken; 40 mM tuz dozunda azalış başlamış ve 60 mM tuz dozundan itibaren azalma belirgin olarak gözlenmiştir. En yüksek kök yaş ağırlığı, 0 mM tuz dozunda epiBL uygulamasız bitkilerde 0.34 g bulunmuştur. En düşük kök yaş ağırlığı 100 mM NaCl dozunda yine epiBL uygulamasız bitkilerde 0.03 g tespit edilmiştir. 60 mM tuz dozunda 2  $\mu$ M epiBL uygulaması, 80 mM tuz dozunda ise 1  $\mu$ M epiBL uygulaması, en yüksek tuz dozunda (100 mM) ise her iki konsantrasyondaki epiBL uygulaması yaş ağırlığı arttırmıştır. Ancak bu artış istatistiksel olarak farklılık oluşturmamıştır (Çizelge 3.23.).

**Çizelge 3.23. Tuz stresine karşı epiBL uygulamasız ve uygulamalı sürgün uçlarından gelişen 30 günlük bitkilerin kök yaş ağırlığı (g)**

EpiBL Dozları ( $\mu$ M)	Tuz Dozları (mM)					
	0	20	40	60	80	100
0	0.34 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.34 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.21 $\pm$ 0.02	0.08 $\pm$ 0.008	0.08 $\pm$ 0.008	0.03 $\pm$ 0.008
1	0.28 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	0.27 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	0.18 $\pm$ 0.01	0.08 $\pm$ 0.009	0.09 $\pm$ 0.025	0.05 $\pm$ 0.011
2	0.29 $\pm$ 0.01 <sup>ab</sup>	0.33 $\pm$ 0.01 <sup>ab</sup>	0.15 $\pm$ 0.02	0.10 $\pm$ 0.007	0.08 $\pm$ 0.013	0.04 $\pm$ 0.006

Değerler, ortalama $\pm$ standart hatadır. Aynı sütundaki değerler bakımından, harflendirmeler P<0.05'de kontrole göre epiBL dozları arasındaki istatistiksel farklılığı göstermektedir.



Kök kuru ağırlığı tuzsuz ortamda yüksek iken artan tuz konsantrasyonlarına göre kademe kademe ciddi bir azalış sergilemiştir. En yüksek kök kuru ağırlığı tuzsuz ortamda 1 µM epiBL uygulamalı bitkilerde 32.78 mg belirlenmiştir. En düşük kök kuru ağırlığı ise 100 mM NaCl içeren ortamda gelişen epiBL uygulamamasız bitkilerde 2.53 mg tespit edilmiştir. EpiBL uygulamamasız bitkilerde, kök kuru ağırlığı, artan tuz dozlarına göre 31.10, 14.07, 11.07, 8.30, 12.43, 2.53 mg olarak belirlenmiştir. Shibli vd. (2007), 0, 50, 100, 150, 200 mM NaCl stresinde kök kuru ağırlığını Roma çeşidinde 38, 18, 8, 12, 7 mg; Patio çeşidinde ise 28, 26, 11, 8, 4 mg olarak belirlemişlerdir. Araştırmacılar, bizim çalışmamızın sonuçları ile uyumlu şekilde kök kuru ağırlığının tuz stresinden olumsuz etkilendiğini tespit etmişlerdir. Tez çalışmamızda her bir tuz dozunun oluşturduğu strese karşı kullanılan epiBL'nin etkisine baktığımızda; NaCl içermeyen ortamda epiBL uygulamamasız kontrol bitkilerine göre, 1 µM epiBL uygulaması, 20 mM tuz dozunda her iki epiBL uygulaması, 40 mM tuz dozunda 2 µM epiBL uygulaması, 60 mM ve 100 mM tuz dozunda ise her iki konsantrasyodaki epiBL uygulaması kök kuru ağırlığını arttırmıştır. Ancak bunlardan sadece 100 mM tuz dozunda 2 µM epiBL uygulaması istatistiksel olarak önemli farklılık oluşturmuştur (Çizelge 3.24.).

**Çizelge 3.24. Tuz stresine karşı epiBL uygulamamasız ve uygulamalı sürgün uçlarından gelişen 30 günlük bitkilerin kök kuru ağırlığı (mg)**

EpiBL Dozları (µM)	Tuz Dozları (mM)					
	0	20	40	60	80	100
0	31.10±3.72	14.07±3.18	11.07±3.29 <sup>ab</sup>	8.30±2.17	12.43±0.61 <sup>a</sup>	2.53±0.72 <sup>b</sup>
1	32.78±4.05	24.45±5.98	10.97±3.84 <sup>b</sup>	8.34±2.09	3.33±1.52 <sup>b</sup>	3.35±0.68 <sup>b</sup>
2	27.71±3.09	26.80±4.70	23.76±2.76 <sup>a</sup>	10.57±3.47	4.13±0.95 <sup>b</sup>	7.26±0.67 <sup>a</sup>

Değerler, ortalama±standart hatadır. Aynı sütundaki değerler bakımından, harflendirmeler P<0.05'de kontrole göre epiBL dozları arasındaki istatistiksel farklılığı göstermektedir.

Sürgün ucu kültürlerinde tuz stresine karşı epiBL'nin etkisini morfolojik gözlemler ve gelişimsel parametrelerin yanısıra biyokimyasal parametrelerle belirlemeye yönelik olarak pigment analizleri (klorofil a, klorofil b, toplam klorofil ve karotenoid içerikleri) de yapılmıştır. Çünkü bitkide klorofil içeriği, fotosentetik etkinlikte önemli rol oynamakta ve bitki gelişimini arttırmaktadır. Bitkideki en önemli pigment olan klorofil a, fotosentezin ışıklı evre reaksiyonlarında önemli rol üstlenmektedir. Tuz

stresi altındaki bitkilerde klorofil içeriğindeki değişimler, biyokimyasal yanıtta en önemli parametrelerden biridir (Mohamed vd., 2011). Çalışmamızda en yüksek klorofil a içeriği, tuzsuz ortamda epiBL uygulaması yapılmamış bitkiciklerde 5.40 µg/ml bulunmuştur. En düşük klorofil a içeriği ise, 60 mM NaCl içeren ortamda 2 µM epiBL uygulamalı bitkiciklerde 1.86 µg/ml olarak belirlenmiştir. Klorofil içeriği, tuz stresi altında azalma göstermektedir. El-Meleigy vd (2004), çalışmamızla benzer şekilde 0, 1, 2, 3, 4, 5 ve 6 g/l NaCl stresi altında kullandıkları 6 domates çeşidinde rejenerasyonla oluşan adventif sürgünlerin yapraklarında klorofil a içeriğinin azaldığını tespit etmişlerdir. Mohamed vd. (2011), Pearl ve Beril domates çeşitlerinde kotiledon ve hipokotil eksplantlarından rejenera olan sürgünlerde klorofil a içeriğinin bizim ve El-Meleigy vd. (2004)'nin çalışmalarına benzer şekilde tuz stresinden olumsuz etkilendiğini bulmuşlardır. Çalışmamızda klorofil a içeriği üzerine tuz stresine karşı epiBL uygulamasının etkisine bakıldığında, 20 mM tuz içeren ortamda her iki epiBL uygulaması, 80 mM ve 100 mM NaCl dozlarında ise 1 µM epiBL uygulaması klorofil a içeriğini arttırmıştır. Ancak istatistiksel olarak 100 mM tuz dozunda 1 µM epiBL uygulamasının olumlu etkisi önemli olmuştur (Çizelge 3.25.). Shahid vd. (2011), bezelyede tuz stresine karşı epiBL'nin etkisini araştırmışlar ve 1 mM ve 10 mM NaCl stresine karşı saksı denemesinden elde ettikleri bitkilerin yapraklarında klorofil a içeriğini 5 µM ve 10 µM epiBL uygulamasının artırdığını bulmuşlardır. Sharma vd. (2013), çeltikte epiBL uygulamasını ( $10^{-11}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-7}$  M) tohuma yapmışlar ve 75, 100, 125 mM NaCl'ye karşı etkisini değerlendirmişlerdir. Araştırmacılar, tuz stresinin klorofil a içeriğini azalttığını ancak, tuz stresine karşı epiBL uygulaması ile klorofil a içeriğinin arttığını belirlemişlerdir.

**Çizelge 3.25. Tuz stresine karşı epiBL uygulamasız ve uygulamalı sürgün uçlarından gelişen 30 günlük bitkilerin klorofil a içeriği (µg/ml)**

EpiBL Dozları (µM)	Tuz Dozları (mM)					
	0	20	40	60	80	100
0	5.40±0.48	3.66±0.14	3.22±0.31	3.23±0.39	2.81±0.10	2.63±0.017 <sup>b</sup>
1	3.62±0.85	4.32±0.51	2.05±0.09	2.46±0.12	3.19±0.52	3.04±0.005 <sup>a</sup>
2	3.91±0.08	4.72±0.24	2.18±0.02	1.86±0.47	1.90±0.01	1.93±0.011 <sup>c</sup>

Değerler, ortalama±standart hatadır. Aynı sütundaki değerler bakımından, harflendirmeler P<0.05'de kontrole göre epiBL dozları arasındaki istatistiksel farklılığı göstermektedir.

Çalışmamızdaki bitki örneklerinde en yüksek klorofil b içeriği, 100 mM tuz dozunda 1 µM epiBL uygulaması sonucunda 4.82 µg/ml bulunmuştur. En düşük klorofil b içeriği, 80 mM tuz içeren ortamda 1 µM epiBL uygulamalı bitkiciklerde 0.24 µg/ml belirlenmiştir. Klorofil b içeriği bakımından tuz stresine karşı epiBL uygulamasının etkisine bakıldığında, 20 mM, 40 mM ve 60 mM tuz içeren ortamlarda epiBL uygulaması ile klorofil b içeriği yükselmiştir. En yüksek tuz dozunda sadece 1 µM epiBL uygulaması klorofil b içeriğini arttırmıştır. İstatistiksel olarak değerlendirildiğinde, 40 mM tuz dozunda 2 µM epiBL uygulaması, 60 mM tuz dozunda 1 µM epiBL uygulaması ve 100 mM tuz konsantrasyonunda ise 1 µM epiBL uygulamasının etkisi önemli olmuştur (Çizelge 3.26.). Shahid vd. (2011), NaCl stresi altındaki bezelyede, klorofil a içeriği gibi klorofil b içeriğinin de epiBL uygulaması ile arttığını bulmuşlardır. Ayrıca Sharma vd. (2013), çeltikte tuz stresinin etkisine karşı epiBL uygulamasının klorofil b içeriğini arttırdığını bulmuşlardır.

**Çizelge 3.26. Tuz stresine karşı epiBL uygulamasız ve uygulamalı sürgün uçlarından gelişen 30 günlük bitkilerin klorofil b içeriği (µg/ml)**

EpiBL Dozları (µM)	Tuz Dozları (mM)					
	0	20	40	60	80	100
0	3.99±0.34 <sup>a</sup>	1.17±0.32	1.72±0.226 <sup>b</sup>	1.44±0.005 <sup>b</sup>	3.14±0.985 <sup>a</sup>	3.82±0.06 <sup>b</sup>
1	3.22±0.29 <sup>ab</sup>	1.49±0.01	2.57±0.531 <sup>ab</sup>	2.24±0.005 <sup>a</sup>	0.24±0.026 <sup>b</sup>	4.82±0.01 <sup>a</sup>
2	0.94±0.02 <sup>b</sup>	1.59±0.10	3.71±0.008 <sup>a</sup>	1.45±0.011 <sup>b</sup>	0.80±0.005 <sup>b</sup>	1.13±0.01 <sup>c</sup>

Değerler, ortalama±standart hatadır. Aynı sütundaki değerler bakımından, harflendirmeler P<0.05'de kontrole göre epiBL dozları arasındaki istatistiksel farklılığı göstermektedir.

En yüksek toplam klorofil içeriği, tuzsuz ortamda epiBL uygulaması yapılmamış bitkiciklerde 8.14 µg/ml olarak tespit edilmiştir. En düşük toplam klorofil içeriği ise, 80 mM NaCl içeren ortamda 2 µM epiBL uygulamalı bitkiciklerde 2.73 µg/ml olduğu belirlenmiştir. EpiBL uygulamasız bitkilerde tuz stresine göre toplam klorofil içeriğini düşürmüştür. El-Meleigy vd. (2004) ve Mohamed vd. (2011), bizim çalışmamız sonuçları ile paralel şekilde tuz stresinin toplam klorofil içeriğini azalttığını tespit etmişlerdir. Çalışmamızda tuz stresine karşı epiBL uygulamalarının etkisini değerlendirdiğimizde, tuzsuz şartlarda epiBL uygulaması ile toplam klorofil içeriği azalış sergilemiştir. 20 mM tuzlu ortamda, toplam klorofil içeriğini 2 µM epiBL uygulaması arttırmıştır. 40 mM tuz konsantrasyonunda her iki epiBL dozu

toplam klorofil içeriğini arttırırken, en yüksek tuz dozunda ise, sadece 1 µM epiBL uygulamasında toplam klorofil içeriğini arttırmıştır. Tuz stresine karşı epiBL uygulamasının etkisi istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, 40 mM tuz dozunda ve 100 mM tuz dozunda 1 µM epiBL uygulamasının toplam klorofil içeriğini arttırması istatistiksel olarak önemli olmuştur (Çizelge 3.27.). Sharma vd. (2013), çeltikte epiBL'nin 75, 100, 125 mM NaCl'ye karşı etkisini değerlendirmişler ve klorofil a ve klorofil b içeriğine benzer şekilde tuz stresinin toplam klorofil içeriğini azalttığını ancak, epiBL uygulaması ile toplam klorofil içeriğinin arttığını ifade etmişlerdir.

**Çizelge 3.27. Tuz stresine karşı epiBL uygulamasız ve uygulamalı sürgün uçlarından gelişen 30 günlük bitkilerin toplam klorofil içeriği (µg/ml)**

EpiBL Dozları (µM)	Tuz Dozları (mM)					
	0	20	40	60	80	100
0	8.14±0.81	5.07±0.43 <sup>ab</sup>	5.11±0.10 <sup>b</sup>	4.50±0.58	7.02±0.03 <sup>a</sup>	6.55±0.060 <sup>b</sup>
1	5.55±1.10	5.03±0.03 <sup>b</sup>	5.92±0.25 <sup>a</sup>	3.89±0.65	2.77±0.20 <sup>b</sup>	8.07±0.028 <sup>a</sup>
2	4.77±0.28	6.50±0.37 <sup>a</sup>	5.74±0.10 <sup>ab</sup>	3.13±0.64	2.73±0.01 <sup>b</sup>	3.13±0.008 <sup>c</sup>

Değerler, ortalama±standart hatadır. Aynı sütundaki değerler bakımından, harflendirmeler P<0.05'de kontrole göre epiBL dozları arasındaki istatistiksel farklılığı göstermektedir.

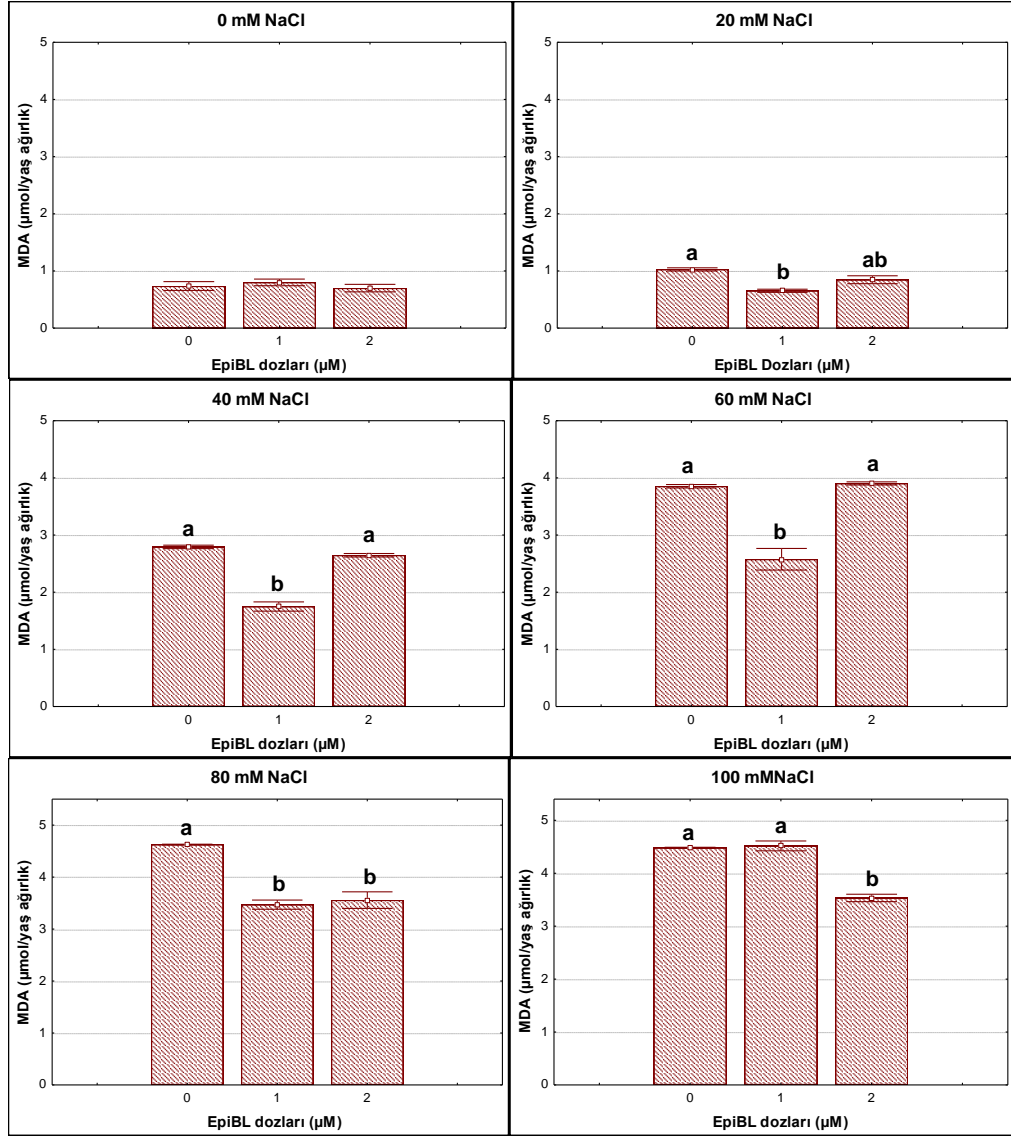
Karotenoid içeriği değerlendirildiğinde; en yüksek içerik, 80 mM tuz içeren ortamdaki 1 µM epiBL uygulamalı bitkiciklerde 2.09 µg/ml olarak belirlenmiştir. En düşük karotenoid içeriği 20 mM tuz dozunda 1 µM epiBL uygulamalı bitkiciklerde 0.32 µg/ml olarak tespit edilmiştir. Tuzsuz ortamda ve 20 mM NaCl ilaveli ortamda 2 µM epiBL uygulaması, 40 mM, 80 mM ve 100 mM tuz dozlarında her iki epiBL uygulaması karotenoid içeriğini arttırmıştır. Ancak bunlardan sadece 80 mM tuz dozunda her iki epiBL uygulamasının olumlu etkisi istatistiksel olarak önemli olmuştur (Çizelge 3.28.).

**Çizelge 3.28. Tuz stresine karşı epiBL uygulamasız ve uygulamalı sürgün uçlarından gelişen 30 günlük bitkilerin toplam karotenoid içeriği (µg/ml)**

EpiBL Dozları (µM)	Tuz Dozları (mM)					
	0	20	40	60	80	100
0	1.07±0.24	0.72±0.15 <sup>ab</sup>	0.63±0.04	0.96±0.13	0.36±0.003 <sup>c</sup>	0.54±0.003
1	0.80±0.29	0.32±0.06 <sup>b</sup>	0.81±0.02	0.68±0.14	2.09±0.083 <sup>a</sup>	0.66±0.005
2	1.92±0.30	0.78±0.06 <sup>a</sup>	0.81±0.08	0.60±0.20	1.35±0.003 <sup>b</sup>	0.93±0.254

Değerler, ortalama±standart hatadır. Aynı sütundaki değerler bakımından, harflendirmeler P<0.05'de kontrole göre epiBL dozları arasındaki istatistiksel farklılığı göstermektedir.

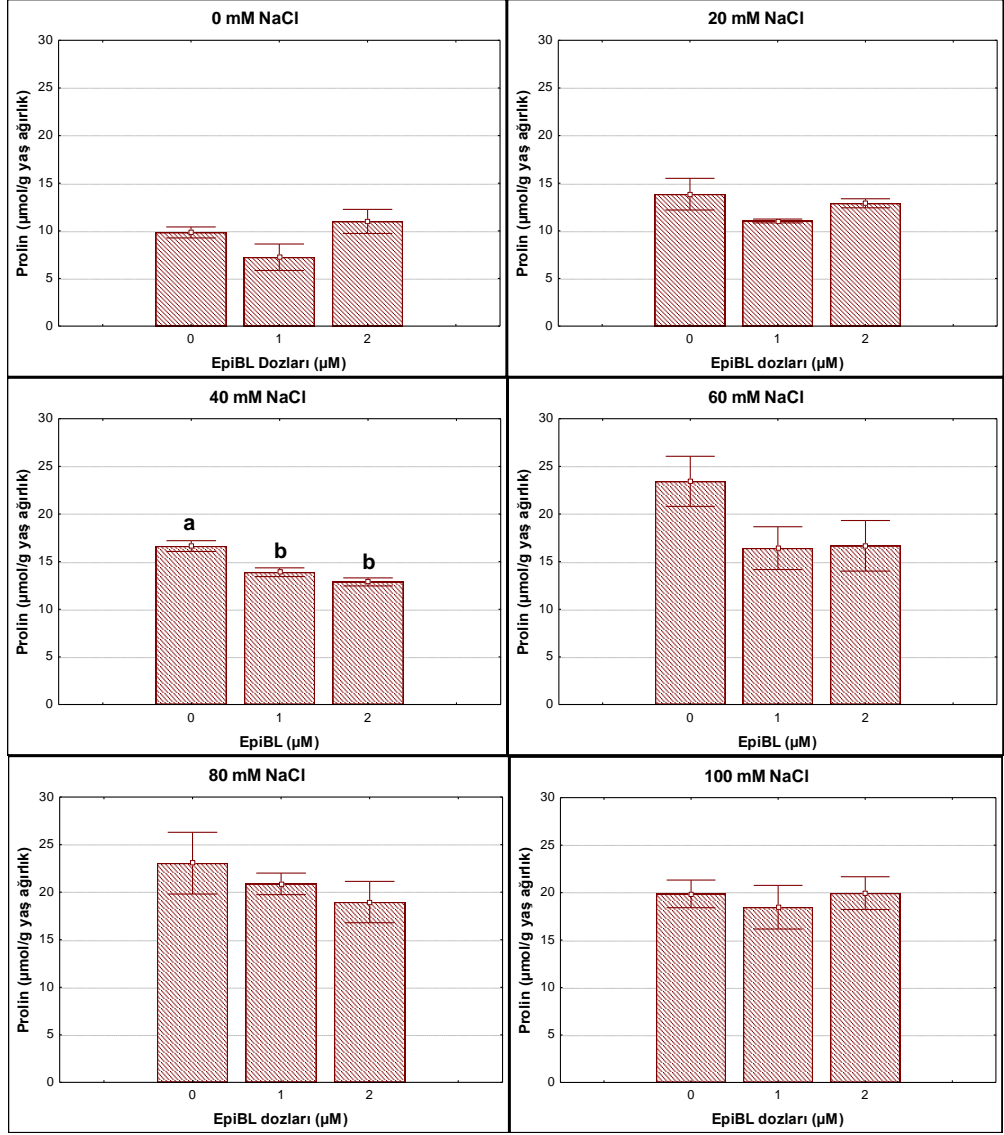
Sürgün ucu kültüründen gelişen bitkilerde yapılan MDA içeriği, hücre zarındaki lipit peroksidasyonunu ortaya çıkaran bir parametredir ve tuz stresi ile MDA içeriği artış sergilemiştir. 20 mM tuz dozunda her iki epiBL uygulaması MDA içeriğini düşürmüştür ve 1 µM epiBL uygulamasındaki düşüş istatistiksel olarak önemlidir. 40 mM ve 60 mM tuz dozlarında ise sadece 1 µM epiBL uygulaması MDA içeriğini azaltmıştır ve azalış istatistiksel olarak önemlidir. 80 mM tuz dozunda her iki epiBL uygulaması; 100 mM tuz dozunda da 2 µM epiBL uygulaması MDA içeriğini azaltmıştır ve istatistiksel olarak önemli fark oluşturmuştur (Şekil 3.8.). Ding vd. (2012), patlıcan bitkilerini Hoagland çözeltilisi ile sulayarak yetiştirmişler ve 5. gerçek yapraklı dönemde bitkilere hem 90 mM NaCl hem de 0.025, 0,05, 0.1 ve 0.2 mg/dm<sup>3</sup> epiBL uygulaması yapmışlardır. Araştırmacılar tuz stresi ile MDA içeriğinin arttığını ancak epiBL'nin MDA içeriğini azalttığını ifade etmişlerdir. Sharma vd. (2013), çeltikte 75, 100, 125 mM NaCl stresine karşı tohumla epiBL uygulamasını yapmışlar, tuz stresinin MDA içeriğini arttırdığını ve tuz stresine karşı epiBL uygulaması ile MDA içeriğinin azaldığını tespit etmişlerdir. Tez çalışmamız ve diğer çalışmalardan elde edilen sonuçlar, tuz stresi altında artan MDA içeriğinin epiBL uygulaması ile azalışa geçmesi biyolojik membranlarda lipit peroksidasyonunun düzenlenerek tuz stresine karşı bitki toleransının geliştirildiğini göstermektedir.



Şekil 3.8. Tuz stresine karşı epiBL uygulamasız ve uygulamalı sürgün uçlarından gelişen 30 günlük bitkilerin MDA içeriği (µmol/yaş ağırlık)

Prolin içeriği de MDA içeriğine benzer şekilde tuz stresine bağlı olarak artış göstermiştir. EpiBL uygulamasız bitkilerde, kontrolden 100 mM NaCl konsantrasyonuna kadar prolin içeriği 9.83'dan 19.86 µmol/g yaş ağırlığa yükselmiştir. Prolin, tuz ve diğer stres şartları altında pek çok bitkide biriktirilmektedir (Szabados ve Savoure, 2009). Prolin birikimi bitki stres toleransında önemli rol oynamaktadır. Stres şartlarında ozmolit, ROT temizleyicisi ve protein yapısının korunmasında moleküler şaperon olarak rol oynamakta, karbon ve azot kaynağı olarak kullanılmaktadır (Verbruggen ve Hermans, 2008). Prolin, fizyolojik pH'da suda yüksek oranda çözülebilen küçük moleküllerdir ve hücrel

yapılara zarar vermeksizin sitosolde yüksek miktarlarda biriktirilmektedir (Trovato vd., 2008). Çalışmamızdakine benzer olarak Abu-Khadejeh vd. (2011), kullandıkları JO112 ve JO992 çeşitlerinin sürgünlerinde tuz dozlarının artışının prolin içeriğini arttırdığını belirlemişlerdir. Hassain vd. (2004), domates kalluslarında 172 mM NaCl'nin prolin içeriğini kontrole göre yaklaşık 3 kat arttırdığını belirlemişlerdir. Mohamed vd. (2007), tuz stresi altındaki prolin birikimini 6 domates çeşidinin hipokotil eksplantlarından gelişen kalluslarda incelemişlerdir ve 0, 25, 50 ve 100 mM tuz stresinde prolin birikiminin arttığını tespit etmişlerdir. Araştırmacılar, prolin içeriğinin en yüksek Pahuja çeşidinde olduğunu ve tuz stresi ile 0.24, 0.34, 1.58, 2.95 ve 7.09 mg/g yaş ağırlık olarak arttığını belirlemişlerdir. Aazami vd. (2010), hipokotil eksplantlarından indüklenen kalluslarda prolin içeriğinin artan tuz stresi şartlarında artış gösterdiğini bulmuşlardır. Mohamed vd. (2011), domates Pearl ve Beril çeşitlerinde kotiledon ve hipokotil eksplantlarında artan tuz dozlarında (0, 25, 50, 75 mM) prolin içeriğini belirlemişler ve Pearl çeşidine göre Beril çeşidinde artan tuz stresi şartlarında prolin içeriğinin daha yüksek olduğunu ve Beril çeşidinde hipokotil eksplantına göre (2.33, 4.52, 5.24, 6.92  $\mu\text{mol/g}$ ) kotiledon eksplantlarında prolin içeriğinin (3.99, 4.67, 5.46, 13.69  $\mu\text{mol/g}$ ) daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Genel olarak değerlendirdiğimizde, tuz stresi altında prolin birikiminin olması doğaldır ancak genotipler ve tuz dozlarına bağlı olarak prolin içeriği farklılık göstermektedir. Buna karşılık çalışmamızda tuz stresine karşı kullanılan epiBL'nin prolin içeriğini düşürdüğü belirlenmiştir. Sadece 40 mM tuz dozunda her iki konsantrasyondaki epiBL uygulamasının prolin içeriğini azaltması istatistiksel olarak önemli farklılık oluşturmuştur (Şekil 3.9.).



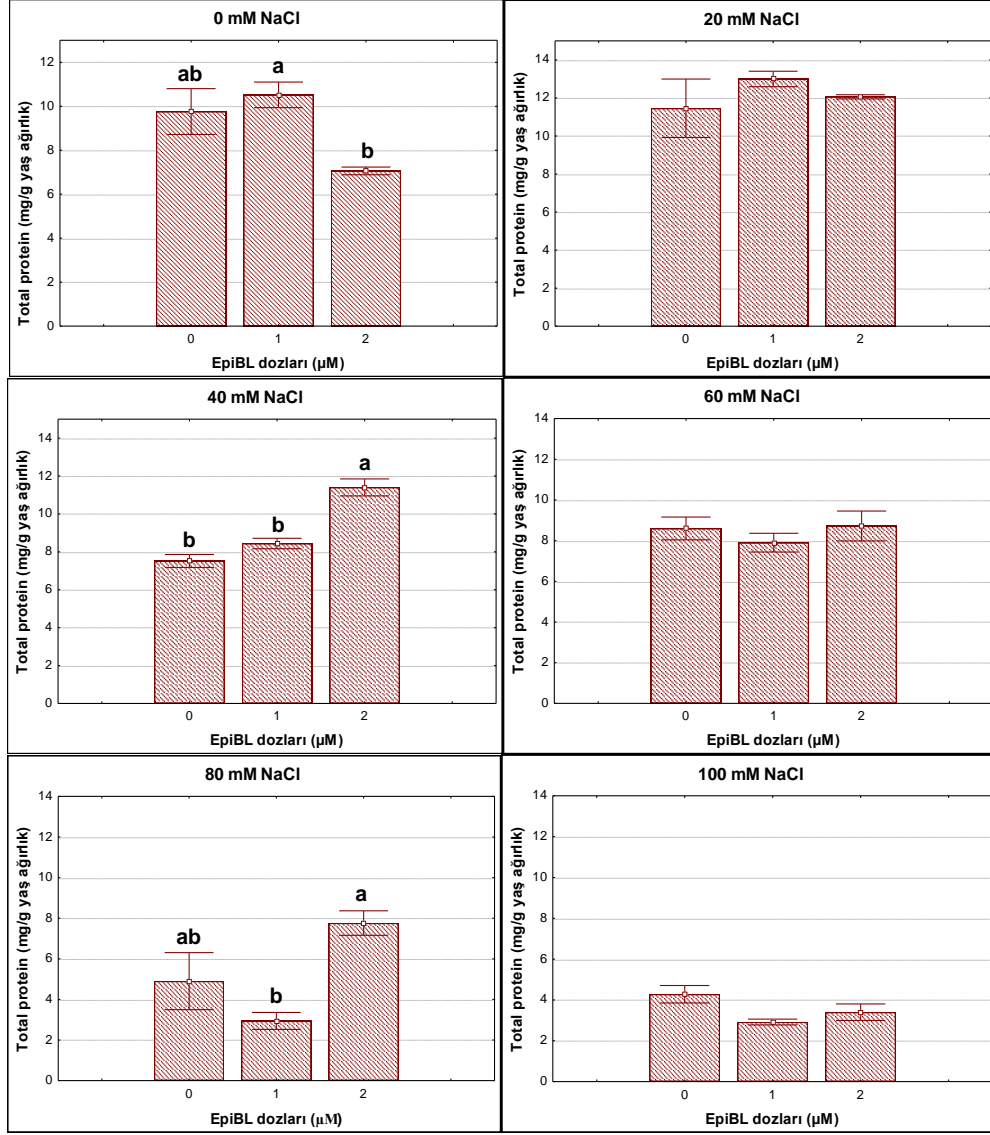
**Şekil 3.9. Tuz stresine karşı epiBL uygulamaz ve uygulamalı sürgün uçlarından gelişen 30 günlük bitkilerin prolin içeriği (µmol/g yaş ağırlık)**

Bizim sonuçlarımıza paralel şekilde Houimli vd. (2010), saksı denemesinde yetiştirdikleri biber bitkilerine 4 g/l NaCl ve 0.5 mg/l 24-epiBL uygulamışlardır ve tuz stresi altında prolin içeriğindeki artışı epiBL uygulamasının düşürdüğünü belirlemişlerdir. Araştırmacılar, çalışmalarında tuz stresinde oluşan serbest radikallerin prolin tarafından temizlendiğini ve tuz stresine karşı epiBL'nin kullanımı ile membran hasarının azaldığını ifade etmişlerdir. Buna karşılık Shahid vd. (2011), bezelyede tuz stresi altında prolin içeriğinin arttığını ve epiBL uygulaması ile prolin içeriğinin daha fazla arttığını bulmuşlardır. Araştırmacılar, tuz stresi altında epiBL'nin kullanımı ile prolin içeriğinin artmasını, protein sentezindeki azalma ile



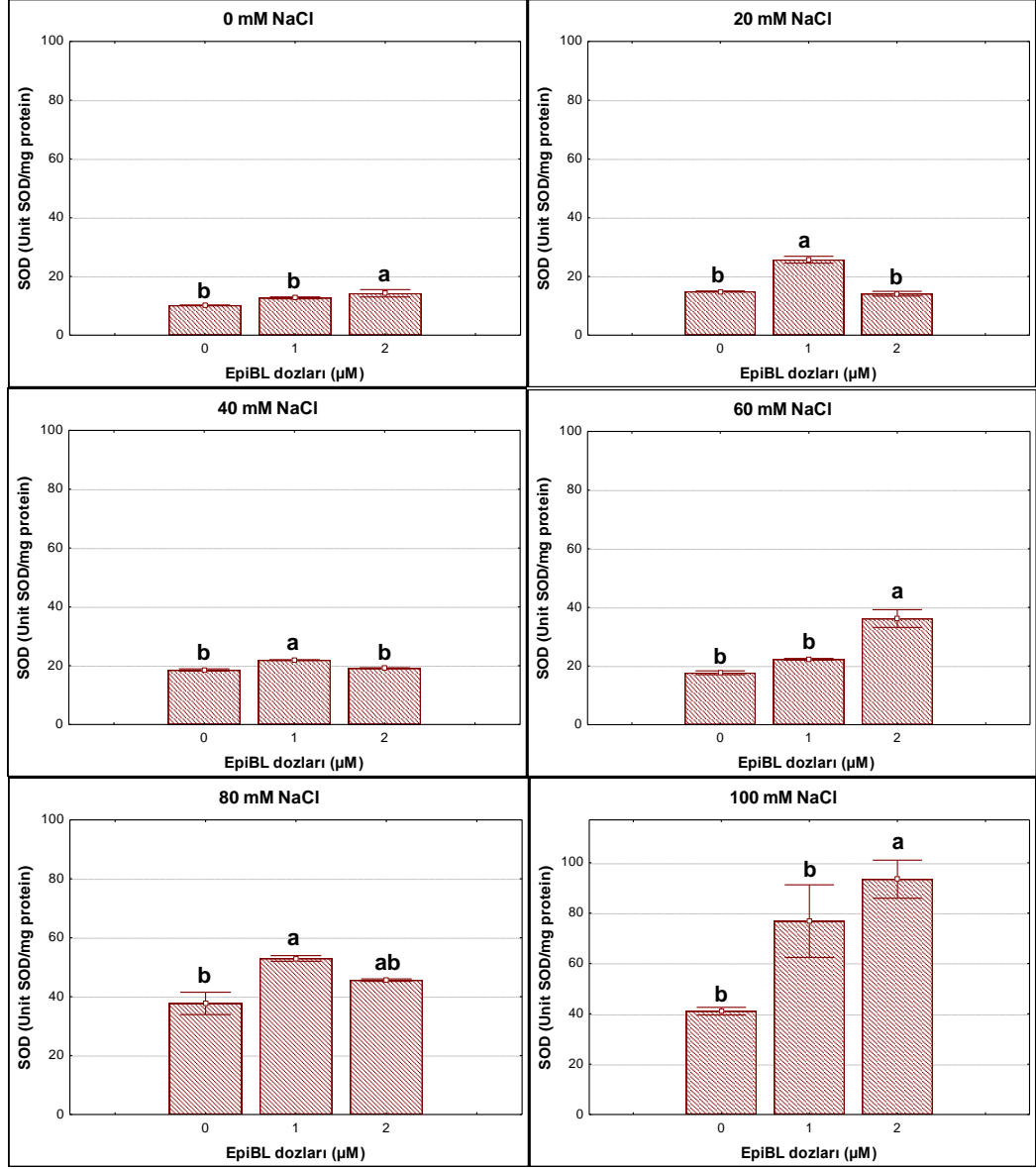
prolin kullanımında düşüş, prolin degradasyonunun azalması ve prolin sentezinin artması ile ilişkilendirmişlerdir. Sharma vd. (2013), çeltikte tuz stresi altında epiBL'nin prolin içeriğini arttırdığını tespit etmişlerdir.

EpiBL uygulamasız bitkilerde düşük tuz dozu çözülebilir protein içeriğini indüklese de genel olarak tuz stresinin artışı içeriği olumsuz etkilemiştir. Shibli vd. (2007), in vitro mikrosürgün kültürlerinden gelişen bitkilerde protein içeriğinin tuz stresinden olumsuz etkilendiğini ifade etmişlerdir. Çalışmamızla benzer şekilde, kullandıkları Roma çeşidinde protein içeriğinin kontrolden 200 mM tuz dozuna kadar 3.1'den 2.4 mg/g'a; Patio çeşidinde ise 7.2'den 1.6 mg/g'a düştüğünü belirlemişlerdir. Abu-Khadejeh vd. (2011), kullandıkları her iki domates çeşidinde (JO112 ve JO992) bizim çalışmamızla paralel olarak tuz stresinin protein içeriğini düşürdüğünü belirlemişlerdir. Amini ve Ehsanpour (2006), Isfahani çeşidinde kontrole göre tuz stresinin çözülebilir protein içeriğini arttırdığını, Shirazy çeşidinde ise azalttığını bulmuşlardır. Bu sonuç bize tuz stresi altında protein içeriğinin çeşitlere bağlı olarak değişebileceğini göstermektedir. Mohamed vd. (2011), Pearl çeşidinde artan tuz stresi altında protein içeriğinin kotiledon (6.10, 4.63, 3.23, 2.70 mg/g) ve hipokotil eksplantlarında (6.23, 4.50, 3.93, 3.33 mg/g) azaldığını belirlemişlerdir. Araştırmacılar benzer şekilde diğer çeşidin (Beril) her iki eksplantlarında (kotiledon eksplantında; 5.7, 4.90, 4.43, 4.03 mg/g ve hipokotil ekplantında 5.63, 5.50, 4.10, 3.67 mg/g) tuz stresinin protein içeriğini azalttığını belirlemişlerdir. Çalışmamızda tuz stresine karşı kullandığımız epiBL'nin etkisini değerlendirildiğinde, sadece 40 mM tuz dozunda 2 µM epiBL uygulamasının total protein içeriğini artırması istatistiksel olarak önemli farklılık oluşturmuştur (Şekil 3.10.). Sharma vd. (2013), çeltikte NaCl stresinin protein içeriğini düşürdüğünü ancak, tuz stresine karşı epiBL uygulamasının protein içeriğini arttırdığını bulmuşlardır.



**Şekil 3.10. Tuz stresine karşı epiBL uygulamasız ve uygulamalı sürgün uçlarından gelişen 30 günlük bitkilerin total protein içeriği (mg/g yaş ağırlık)**

Önemli stres parametrelerinden kabul edilen antioksidan enzimlerden olan SOD enziminin aktivitesine baktığımızda, tuzluluğun artışına bağlı olarak aktivitenin artış gösterdiği bulunmuştur. Tuz stresine karşı epiBL uygulamalarının etkisine baktığımızda, 20 mM, 40 mM ve 80 mM tuz dozlarında 1 µM epiBL uygulaması, 60 mM ve 100 mM tuz dozlarında 2 µM epiBL uygulaması SOD enzim aktivitesini arttırmış ve bu artışlar istatistiksel olarak önemli olmuştur (Şekil 3.11.).

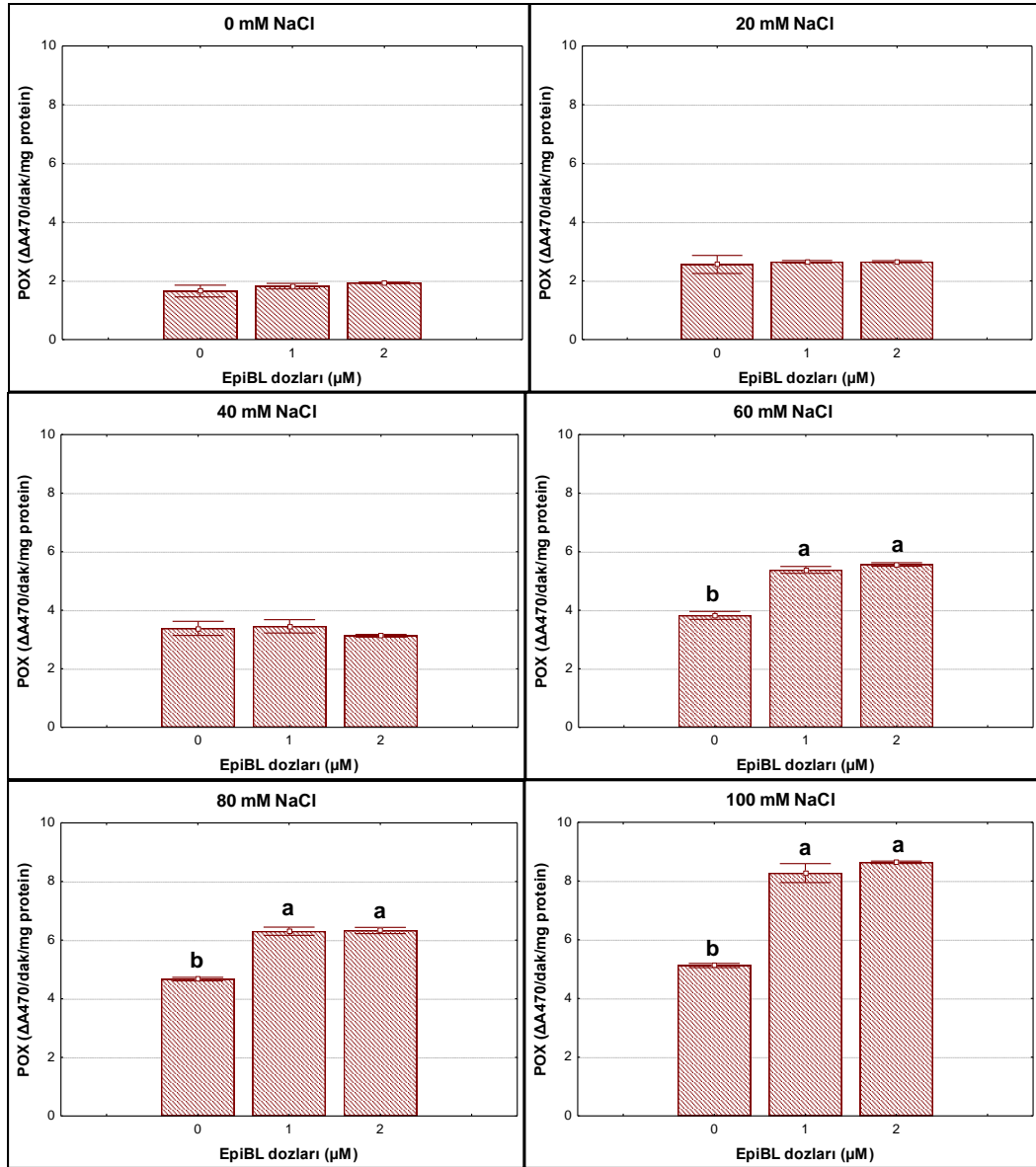


Şekil 3.11. Tuz stresine karşı epiBL uygulamasız ve uygulamalı sürgün uçlarından gelişen 30 günlük bitkilerin SOD enzim aktivitesi (Unit SOD/mg protein)

Çalışmamıza benzer şekilde Shahbaz vd. (2008), saksı denemesi ile buğdayda 150 mM NaCl'ye karşı 0.0125, 0.025, 0.0375 mg/l epiBL'yi spreyleme ile uygulamışlardır ve tuz stresi altında SOD aktivitesinin arttığını ve epiBL'nin tuz stresine karşı enzim aktivitesini daha fazla arttırdığını ifade etmişlerdir. Shahid vd. (2011), bezelyede tuz stresine karşı epiBL uygulaması sonucunda SOD enzim aktivitesinin arttığını bulmuşlardır. Ding vd. (2012), tuz stresi ile SOD enzim aktivitesinin arttığını ve artışın epiBL uygulaması ile daha fazla olduğunu ifade etmişlerdir. Sharma vd. (2013)'e göre, çeltikte özellikle 75 ve 100 mM tuz stresi

altında SOD aktivitesi artmıştır ve tuz stresine karşı epiBL kullanımı SOD aktivitesini de fazla arttırarak çeltikte tuz toleransını sağlamıştır.

SOD enzimine benzer şekilde POX enziminin aktivitesi, tuz stresinin etkisi ile artmıştır. Bitkinin tuz toleransını arttırmak amacı ile kullandığımız epiBL'nin etkisine baktığımızda, 0 mM, 20 mM ve 40 mM tuz dozlarında epiBL'nin etkisi görülmezken; 60 mM, 80 mM ve 100 mM tuz dozlarında her iki epiBL uygulaması enzim aktivitesini arttırmış ve artış istatistiksel olarak önemli olmuştur (Şekil 3.12.).



Şekil 3.12. Tuz stresine karşı epiBL uygulamasız ve uygulamalı sürgün uçlarından gelişen 30 günlük 30 günlük bitkilerin POX enzim aktivitesi (ΔA470/dak/mg protein)

Çalışmamıza benzer şekilde buğdayda (Shahbaz vd., 2008), bezelyede (Shahid vd., 2011) ve patlıcanda (Ding vd., 2012), tuz stresi altında POX enzim aktivitesinin arttığı ve epiBL'nin bu enzimin aktivitesini daha fazla arttırdığı belirlenmiştir.

Yapılan tüm biyokimyasal analizlerin sonucuna baktığımızda tuz stresine karşı kullandığımız epiBL uygulamasının olumlu etkisi gözlenmiştir. İn vitro sürgün ucu kültürleri ile tuz stresinin ortaya koyduğu tahrip edici etkinin kırılması ve bitki toleransının geliştirilmesinde epiBL'nin rol oynayabileceği belirlenmiştir.

### **3.3. İn Vitro Kallus Kültürü Çalışmalarına Ait Bulgular**

#### **3.3.1. EpiBL'nin kallusa uygulandığı in vitro kültür çalışmasına ait bulgular**

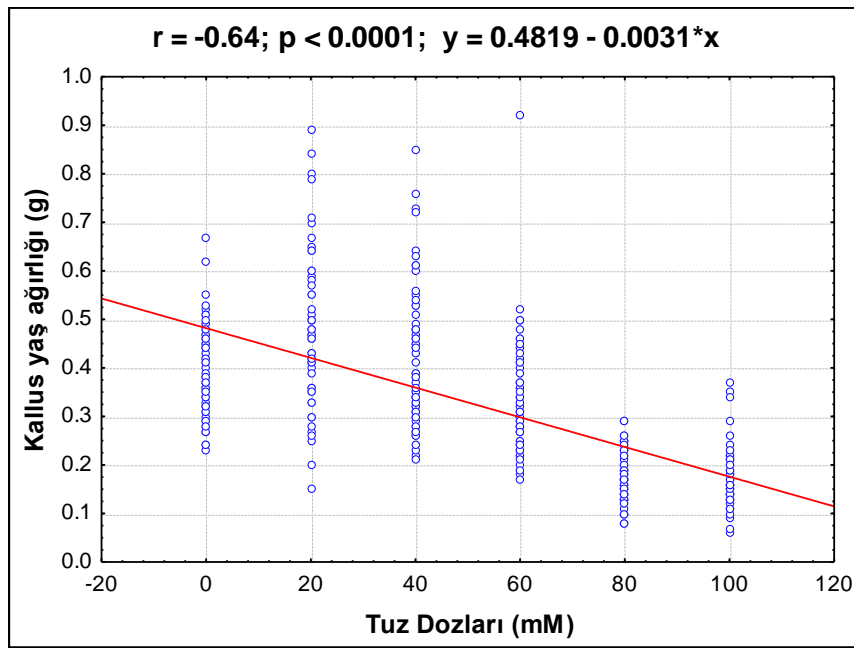
Kallus kültürlerinde epiBL uygulamasının yapıldığı kallusların kaynağını, kotiledon ve hipokotil eksplantları oluşturmuştur. İn vitro kallus kültürlerinde, kotiledon ve hipokotil eksplantları için 1 mg/l BAP+1 mg/l 2,4-D ilaveli MS ortamı kullanılmıştır. Kültüre alınan eksplantlardan 1 ay sonra kalluslar elde edilmiş ve kallus kitleleri (80 mg) aynı içerikli ve artan tuz dozlarını içeren MS ortamında kültüre alınmışlardır. MS ortamının ölçülen EC değerleri aşağıdaki gibidir;

- i.** 0 mM NaCl (kontrol) ve BAP+2,4-D ilaveli MS ortamı =5.98 mS/cm
- ii.** 20 mM NaCl ve BAP+2,4-D ilaveli MS ortamı = 7.62 mS/cm
- iii.** 40 mM NaCl ve BAP+2,4-D ilaveli MS ortamı = 8.86 mS/cm
- iv.** 60 mM NaCl ve BAP+2,4-D ilaveli MS ortamı = 11.23 mS/cm
- v.** 80 mM NaCl ve BAP+2,4-D ilaveli MS ortamı = 13.30 mS/cm
- vi.** 100 mM NaCl ve BAP+2,4-D ilaveli MS ortamı = 14.85 mS/cm

Artan tuz dozlarını içeren 1 mg/l BAP+1 mg/l 2,4-D ilaveli MS ortamında ölçülen EC değerleri yükselmiştir. Kontrolde 5.98 mS/cm olan EC değeri 20 mM tuz dozunda 7.62 mS/cm'e çıkmıştır ve kallus gelişiminin indüklendiği gözlenmiştir. 40 ve 60 mM tuz dozlarında 8.86 ve 11.23 mS/cm olan EC değerleri ile kallus gelişimi

gerilemiş ve yüksek tuz dozlarında 13.30 ve 14.85 mS/cm olan yüksek EC değerlerinden kallus gelişiminin oldukça fazla etkilendiği belirlenmiştir.

Kotiledon eksplantlarından gelişen kallusların yaş ağırlığı tuzsuz ortamda düşük iken, 20 ve 40 mM tuz dozlarında kallus yaş ağırlığı genel olarak yükselmesine karşın yüksek tuz dozlarında (80 ve 100 mM NaCl) bariz bir azalış göstermiştir. EpiBL uygulamasız kalluslarda, tuz dozları ile kallus yaş ağırlığı arasında istatistiksel olarak anlamlı ( $p < 0.05$ ) ve kuvvetli negatif bir korelasyon ( $r = -0.64$ ) bulunmuştur (Şekil 3.13.).



Şekil 3.13. Kotiledon eksplantlarından gelişen epiBL uygulamasız kallusların artan tuz dozlarına göre yaş ağırlığı (g)

Kotiledon eksplantından gelişen kallusların en yüksek kallus yaş ağırlığı, 1  $\mu$ M epiBL uygulamasından sonra 20 mM tuz içeren ortamda gelişenlerde tespit edilmiştir (0.60 g). En düşük kallus yaş ağırlığı ise 80 mM tuz dozunda hem epiBL uygulamasız hem de 1  $\mu$ M epiBL uygulamasızlarda ve 100 mM tuz dozunda epiBL uygulamasızlarda belirlenmiştir (0.17 g). Tuz stresine karşı epiBL'nin etkisine baktığımızda; tuzsuz şartlarda her iki dozdaki epiBL uygulamasızlara göre kallus yaş ağırlığını azaltmıştır. 20 mM tuz dozunda epiBL uygulamaları, yaş ağırlığı arttırmıştır ve 1  $\mu$ M epiBL uygulamasının etkisi istatistiksel önemli farklılık

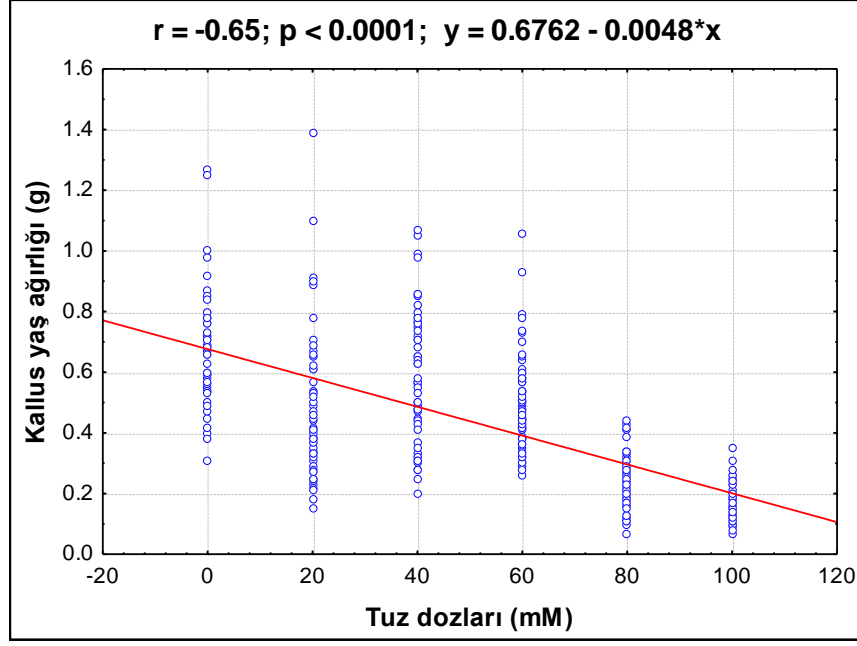
oluşturmuştur. 40 mM tuzlu ortamda da epiBL uygulaması epiBL uygulamasız kalluslara göre yaş ağırlığı arttırmıştır. Bu tuz dozunda epiBL uygulamaları sonucu gözlenen yaş ağırlıktaki artışlar istatistiksel olarak önemlidir ve 2 µM epiBL uygulaması yaş ağırlığı daha fazla arttırmıştır. 60 mM NaCl konsantrasyonunda ise epiBL uygulamaları yaş ağırlığı arttırmıştır ve epiBL uygulamaları kallus yaş ağırlığı üzerine istatistiksel önemli farklılık oluşturmuştur. 80 mM tuz dozunda ise kontrole göre (bu dozdaki 0 µM epiBL uygulaması) 1 µM epiBL uygulaması kallus yaş ağırlığını değiştirmezken, 2 µM epiBL uygulaması yaş ağırlığı arttırmıştır ve bu artış istatistiksel olarak önemlidir. 100 mM tuz dozunda ise epiBL uygulamaları kallus yaş ağırlığını çok az arttırmış ancak istatistiksel farklılık oluşturmamıştır (Çizelge 3.29.).

**Çizelge 3.29. Kotiledon eksplantlarından gelişen epiBL uygulamasız ve uygulamalı 30 günlük kallusların yaş ağırlığı (g)**

EpiBL Dozları (µM)	Tuz Dozları (mM)					
	0	20	40	60	80	100
0	0.40±0.01 <sup>a</sup>	0.48±0.02 <sup>b</sup>	0.41±0.02 <sup>c</sup>	0.34±0.01 <sup>b</sup>	0.17±0.006 <sup>b</sup>	0.17±0.008 <sup>ab</sup>
1	0.38±0.02 <sup>a</sup>	0.60±0.03 <sup>a</sup>	0.49±0.02 <sup>b</sup>	0.48±0.01 <sup>a</sup>	0.17±0.007 <sup>b</sup>	0.18±0.007 <sup>a</sup>
2	0.31±0.01 <sup>b</sup>	0.52±0.02 <sup>ab</sup>	0.57±0.02 <sup>a</sup>	0.46±0.02 <sup>a</sup>	0.20±0.008 <sup>a</sup>	0.18±0.007 <sup>a</sup>

Değerler, ortalama±standart hatadır. Aynı sütundaki değerler bakımından, harflendirmeler P<0.05'de kontrole göre epiBL dozları arasındaki istatistiksel farklılığı göstermektedir.

Hipokotil eksplantından gelişen kallusların yaş ağırlığı tuzsuz şartlarda yüksek iken düşük ve orta tuz dozlarında dalgalı bir durum sergilemiş ve yüksek tuz dozlarında azalışa geçmiştir. Dolayısı ile epiBL uygulamasız kalluslarda, tuz dozları ile kallus yaş ağırlığı arasında istatistiksel olarak anlamlı (p<0.05) ve kuvvetli negatif bir korelasyon (r=-0.65) bulunmuştur (Şekil 3.14.).



**Şekil 3.14. Hipokotil eksplantlarından gelişen epiBL uygulamasız kallusların artan tuz dozlarına göre yaş ağırlığı (g)**

Hipokotil eksplantından gelişen kallusların en yüksek yaş ağırlığı, tuzsuz ortamda ve 1  $\mu$ M epiBL uygulaması yapılmış kalluslarda bulunmuştur (0.72 g). En düşük kallus yaş ağırlığı ise, 100 mM NaCl içeren ortamda yine 1  $\mu$ M epiBL uygulaması yapılan kalluslarda gözlenmiştir (0.14 g). Radriguez-Rosales vd. (1999), *L. esculentum* Pera çeşidine ait hipokotil eksplantlarının 1 mg/l 2,4-D+0.1 mg/l Kin ilaveli MS ortamındaki kültürlerinde kallus indüksiyonunu sağladıktan sonra NaCl içeren ortamdaki altkültürlerle tuza tolerant kalluslar elde etmişlerdir. Tuza tolerant olmayan kalluslarda kontrol grubuna (30.8 g) göre, 100 mM tuz stresinde kallus yaş ağırlığının (12.8 g) azaldığını buna karşılık 50 mM tuza tolerant kalluslarda (35.5 g), kontrol kalluslarına göre yaş ağırlığın arttığını ve bu tolerant kallusların 100 mM tuz stresinde de (35.0 g) yaş ağırlığın yine arttığını ve bu değişimlerin istatistiksel olarak önemli olduğunu bulmuşlardır. El-Meleigy vd. (2004), 6 domates çeşidinde hipokotil eksplantlarından kallus elde etmişler (2 mg/l Kin+0.4 mg/l NAA ilaveli MS ortamlarında) ve homojen kültürlerde 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 g/l NaCl içeren ortamlardaki alt kültürlerde, kallus yaş ağırlığının genel olarak düşük tuz dozlarında arttığını ancak tuz dozunun artışı ile yaş ağırlığın azaldığını bulmuşlardır. Araştırmacıların sonuçları ile bizim sonuçlarımız benzerdir ve kallusların yaş ağırlıkları birbirine yakın çıkmıştır. Castlrock çeşidinde yaş ağırlık artan tuz stresinde sırası ile 1.24 g,

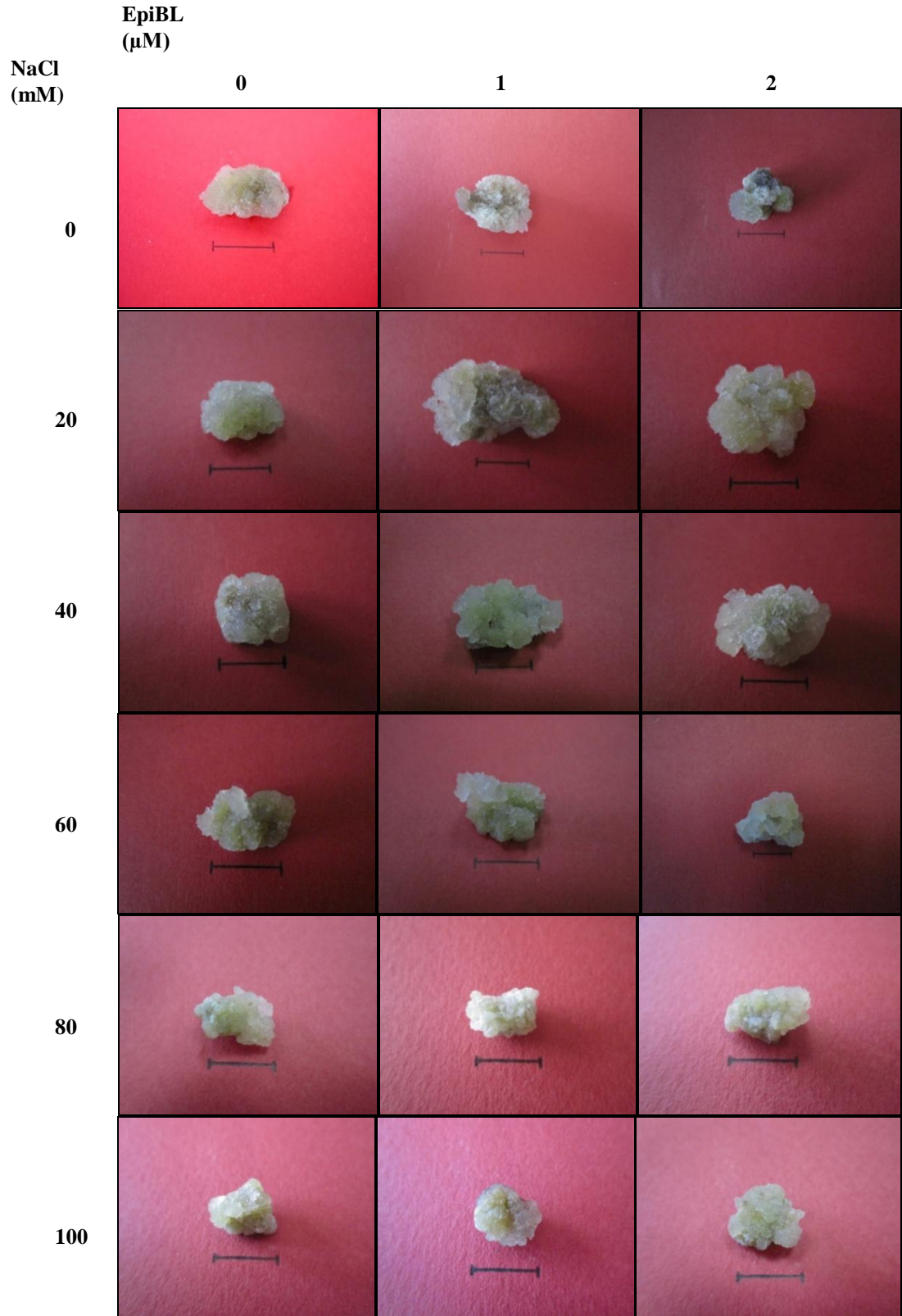


1.75 g, 1.95 g, 1.14 g, 1.11 g, 0.98 g ve 0.91 g belirlenmiştir. Çalışmamızda tuz stresine karşı kullandığımız epiBL'nin etkisine baktığımızda, tuzsuz ortamda epiBL uygulamasız kalluslara göre 1 µM epiBL uygulaması yaş ağırlığı arttırmıştır ancak, istatistiksel olarak farklılık önemli olmamıştır. 20 mM tuz dozunu içeren ortamda gelişen kalluslarda epiBL uygulamaları yaş ağırlığı arttırmıştır ve 1 µM epiBL uygulaması istatistiksel önemli farklılık oluşturmuştur. 60 mM ve 80 mM NaCl konsantrasyonunda epiBL uygulamasızlara nazaran 1 µM epiBL uygulaması kallus yaş ağırlığını çok az arttırmıştır. Ancak, bu dozdaki epiBL uygulaması istatistiksel fark oluşturmamıştır (Çizelge 3.30.), (Şekil 3.15.).

**Çizelge 3.30. Hipokotil eksplantlarından gelişen epiBL uygulamasız ve uygulamalı 30 günlük kallusların yaş ağırlığı (g)**

EpiBL Dozları (µM)	Tuz Dozları (mM)					
	0	20	40	60	80	100
0	0.68±0.03 <sup>ab</sup>	0.47±0.03 <sup>b</sup>	0.58±0.03 <sup>a</sup>	0.49±0.02 <sup>a</sup>	0.24±0.01 <sup>a</sup>	0.16±0.008 <sup>a</sup>
1	0.72±0.04 <sup>a</sup>	0.57±0.04 <sup>a</sup>	0.44±0.02 <sup>b</sup>	0.49±0.02 <sup>a</sup>	0.25±0.01 <sup>a</sup>	0.14±0.007 <sup>b</sup>
2	0.60±0.03 <sup>b</sup>	0.51±0.02 <sup>ab</sup>	0.55±0.02 <sup>a</sup>	0.39±0.02 <sup>b</sup>	0.18±0.007 <sup>b</sup>	0.15±0.007 <sup>ab</sup>

Değerler, ortalama±standart hatadır. Aynı sütundaki değerler bakımından, harflendirmeler P<0.05'de kontrole göre epiBL dozları arasındaki istatistiksel farklılığı göstermektedir.



Şekil 3.15. Kotiledon eksplantından gelişen 80 mg'lık kallus kitlelerine epiBL uygulamasından 30 gün sonraki gelişme durumları (Ölçü çizgisi: 1 cm)

Kullandığımız tuz dozlarına göre kallus yaş ağırlığı üzerine istatistiksel olarak eksplant tipinin, epiBL dozlarının ve eksplant tipi x epiBL dozları interaksyonunun etkisi değerlendirmiştir. 0, 60, 80 ve 100 mM tuz dozlarında kullanılan eksplant tipi kallus yaş ağırlığı üzerine istatistiksel olarak önemli etkisi olmuştur. EpiBL dozları ise 100 mM tuz dozu hariç diğer tüm dozlarında istatistiksel olarak anlamlı farklılık oluşturmuştur. Kallus yaş ağırlığı üzerine eksplant tipi x epiBL dozları interaksyonu 40, 60, 80 ve 100 mM tuz dozlarında istatistiksel olarak önemli farklılık oluşturmuştur (Çizelge 3.31.).

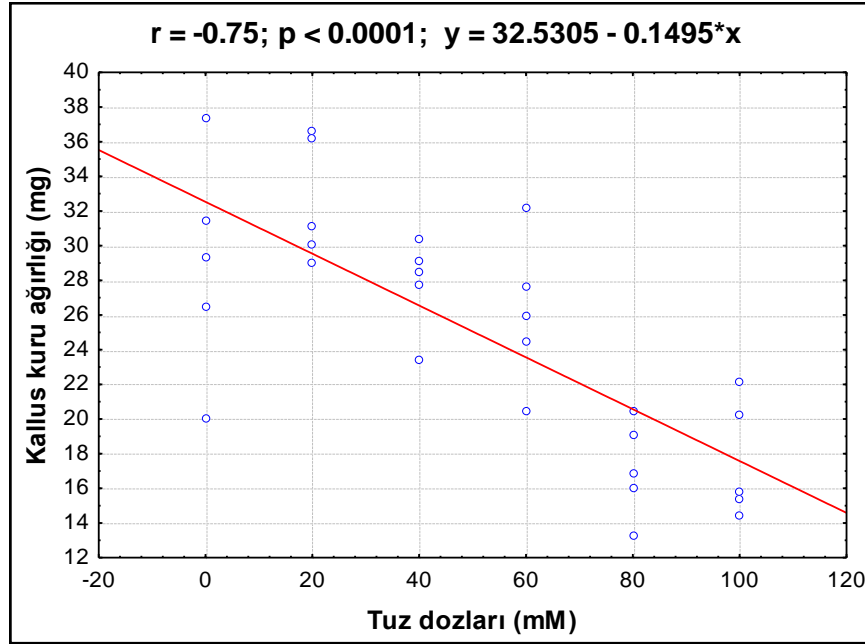
**Çizelge 3.31. Tuz dozlarına göre kallus yaş ağırlığı üzerine eksplant tipi, epiBL dozları ve eksplant tipi x epiBL dozları interaksyonunun etkisi**

Tuz Dozları (mM)	Eksplant Tipi	EpiBL Dozları	Eksplant Tipi x EpiBL Dozları
0	P<0.0001	P<0.0001	ns
20	ns	P=0.0001	ns
40	ns	P<0.0001	P<0.0001
60	P=0.0210	P=0.0001	P<0.0001
80	P<0.0001	P=0.0001	P<0.0001
100	P=0.0079	ns	P=0.0094

ns:nonsignificant (=istatistiksel olarak önemli değildir)

Kotiledon eksplantlarından gelişen kallusların kuru ağırlığı genel olarak 0 ile 60 mM tuz dozları arasında birbirine yakın iken, en yüksek iki tuz dozunda önemli azalış belirlenmiştir. Tuz dozları ile kallus kuru ağırlığı arasında istatistiksel olarak anlamlı ( $p<0.05$ ) ve kuvvetli negatif bir korelasyon ( $r=-0.75$ ) bulunmuştur (Şekil 3.16.). En yüksek kallus kuru ağırlığı 20 mM tuz içeren ortamda 1  $\mu$ M epiBL uygulamalı kalluslarda tespit edilmiştir (35.36 mg). En düşük kallus kuru ağırlığı ise, 80 mM tuz dozunda 1  $\mu$ M epiBL uygulamalı kalluslarda belirlenmiştir (16.46 mg). Dorion vd. (1999), *L. cheesmanii* türünün üç çeşidinde (LCS17, LCS10, LCS5) kotiledon eksplantını kullanmışlar ve protoplast kültüründen elde ettikleri kallusların kuru ağırlığının en yüksek dozdaki (16 g/l NaCl) tuz stresine kadar kuru ağırlığı azalttığını tespit etmişlerdir. Çalışmamızda tuz stresine karşı epiBL'nin etkisini değerlendirdiğimizde, 20, 40 ve 60 mM tuz dozlarında, epiBL uygulamasızlara göre her iki dozdaki epiBL uygulaması kuru ağırlığı arttırmıştır. 80 mM tuz içeren ortamda ise epiBL uygulamasızlara nazaran 2  $\mu$ M epiBL uygulaması kuru ağırlığı

arttırmıştır. Ancak epiBL uygulamaları sonucunda gözlenen bu artışlar istatistik olarak önemli bulunmamıştır (Çizelge 3.32.).



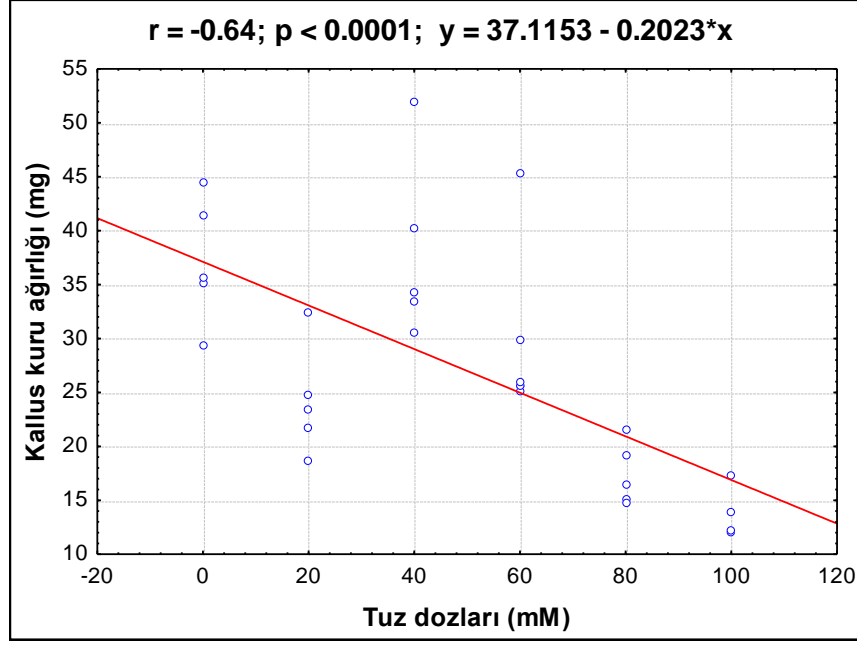
Şekil 3.16. Kotiledon eksplantlarından gelişen epiBL uygulamasız kallusların artan tuz dozlarına göre kuru ağırlığı (mg)

Çizelge 3.32. Kotiledon eksplantlarından gelişen epiBL uygulamasız ve uygulamalı 30 günlük kallusların kuru ağırlığı (mg)

EpiBL Dozları (µM)	Tuz Dozları (mM)					
	0	20	40	60	80	100
0	28.94±2.86	32.60±1.59	27.84±1.19	26.18±1.92	17.16±1.25	17.60±1.52
1	25.74±2.23	35.36±2.55	29.92±1.58	28.62±1.86	16.46±1.08	17.46±1.61
2	26.62±1.91	32.74 ± 2.02	31.26±1.39	30.28±2.42	19.73±0.80	16.60±2.12

Değerler, ortalama±standart hatadır. Aynı sütundaki değerler bakımından, harflendirmeler P<0.05'de kontrole göre epiBL dozları arasındaki istatistiksel farklılığı göstermektedir.

Hipokotil eksplantından gelişen kallusların kuru ağırlığı yaş ağırlığına benzer şekilde tuzsuz şartlarda yüksek iken, düşük ve orta tuz dozlarında dalgalanma sergilemiş ve yüksek tuz dozlarında azalmıştır. Tuz dozları ile kallus kuru ağırlığı arasında istatistiksel olarak anlamlı (p<0.05) ve kuvvetli negatif bir korelasyon (r=-0.64) bulunmuştur (Şekil 3.17.).



Şekil 3.17. Hipokotil eksplantlarından gelişen epiBL uygulamasız kallusların artan tuz dozlarına göre kuru ağırlığı (mg)

Hipokotil eksplantlarından gelişen kalluslarda en yüksek kallus kuru ağırlığı epiBL uygulamasız ve tuzsuz ortamda gelişenlerde belirlenmiştir (37.22 mg). En düşük kallus kuru ağırlığı ise, en yüksek tuz dozunda 1  $\mu$ M epiBL uygulaması yapılmış kalluslarda tespit edilmiştir (12.94 mg). Radriguez-Rosales vd. (1999), *L. esculentum* Pera çeşidine ait hipokotil eksplantlarının 1 mg/l 2,4-D+0.1 mg/l Kin ilaveli MS ortamındaki kültürlerinde kallus elde etmişler ve NaCl içeren ortamdaki altkültürlerle tuza tolerant kalluslar elde etmişlerdir. Tuza tolerant olmayan kalluslarda kontrol grubuna (917.5 mg) göre, 100 mM tuz stresinde kallus kuru ağırlığının (593.5 mg) azaldığını ve azalışın istatistiksel önemli olduğunu bulmuşlardır. Buna karşılık 50 mM tuza tolerant kalluslarda kuru ağırlığında (1213.2 mg), 100 mM tuz stresinde (1138.1 mg) istatistiksel önemli olmayan azalma tespit etmişlerdir. Tuz stresinin etkisi bakımından araştırmacıların sonuçları bizim sonuçlarımızla uyumludur. Ancak kallus yaş ve kuru ağırlıkların bizim kullandığımız çeşide göre Pera çeşidinde daha yüksek olduğu görülmektedir. El-Meleigy vd. (2004), 6 domates çeşidinde hipokotil eksplantlarından elde edilen kallusların kuru ağırlığının genel olarak düşük tuz dozlarında arttığını ancak tuz stresinin artışı ile kuru ağırlığın azaldığını bulmuşlardır. Araştırmacıların sonuçları ile bizim sonuçlarımız benzerdir ve tuz stresi kallus kuru ağırlığını olumsuz etkilemektedir. Çalışmamızda tuz stresine karşı

epiBL'nin etkisini değerlendirdiğimizde; 20 mM tuz içeren ortamda, epiBL uygulamasızlara göre 1 µM ve 2 µM epiBL uygulaması kallus kuru ağırlığını arttırmıştır. 60 mM ve 80 mM tuz dozlarında, 1 µM epiBL uygulaması kallus kuru ağırlığını çok az arttırmış ve istatistiki önemlilik oluşturmamışlardır (Çizelge 3.33.).

**Çizelge 3.33. Hipokotil eksplantlarından gelişen epiBL uygulamasız ve uygulamalı 30 günlük kallusların kuru ağırlığı (mg)**

EpiBL Dozları (µM)	Tuz Dozları (mM)					
	0	20	40	60	80	100
0	37.22±2.63	24.22±2.32	38.14±3.81	29.58±3.24	17.40±1.29	13.93±1.24
1	30.18±1.88	29.62±5.82	28.34±3.85	30.94±0.78	19.32±1.85	12.94±1.55
2	28.94±3.48	30.88±2.43	34.40±2.67	29.48±2.89	17.00±1.20	13.04±0.78

Değerler, ortalama±standart hatadır. Aynı sütundaki değerler bakımından, harflendirmeler P<0.05'de kontrole göre epiBL dozları arasındaki istatistiksel farklılığı göstermektedir.

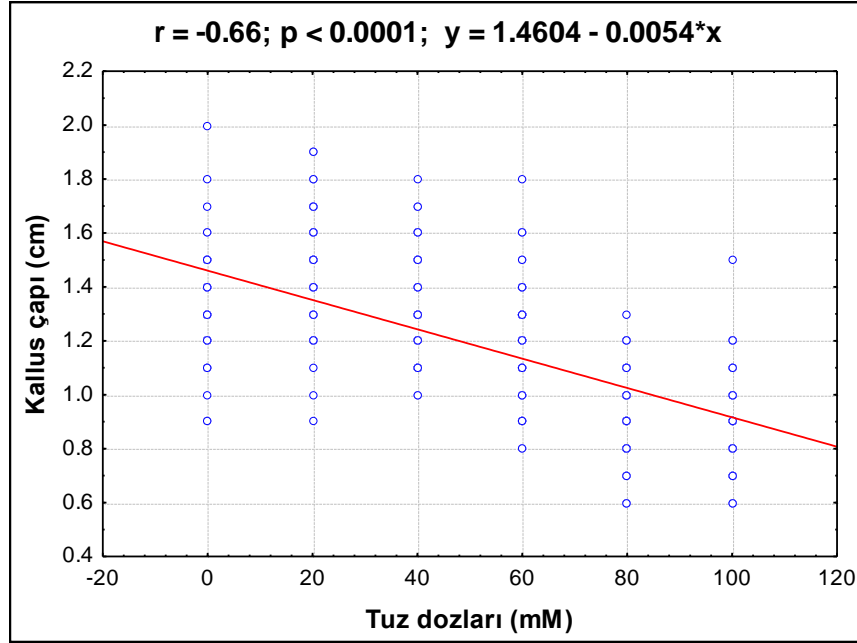
Kullandığımız tuz dozlarına göre kallus kuru ağırlığı üzerine istatistiksel olarak eksplant tipinin, epiBL dozlarının ve eksplant tipi x epiBL dozları interaksiyonunun etkisini değerlendirdiğimizde; eksplant tipinin 0 ve 100 mM tuz dozlarında kallus kuru ağırlığı üzerine istatistiksel olarak önemli etkisi bulunmuştur. Buna karşılık kallus kuru ağırlığı üzerine epiBL dozları ve eksplant tipi x epiBL dozları interaksiyonunun etkisi olmamıştır (Çizelge 3.34.).

**Çizelge 3.34. Tuz dozlarına göre kallus kuru ağırlığı üzerine eksplant tipi, epiBL dozları ve eksplant tipi x epiBL dozları interaksiyonunun etkisi**

Tuz Dozları (mM)	Eksplant Tipi	EpiBL Dozları	Eksplant Tipi x EpiBL Dozları
0	P=0.0329	ns	ns
20	ns	ns	ns
40	ns	ns	ns
60	ns	ns	ns
80	ns	ns	ns
100	P=0.0138	ns	ns

Kotiledon eksplantlarından gelişen kallusların çapı, tuz ve epiBL uygulamalarına göre kıyaslandığında 60 mM tuz dozuna kadar 1.5 ile 1.2 cm arasında seyrederken yüksek tuz dozlarında 0.9 ile 1 cm arasında yer almıştır. Tuz dozları ile kallus çapı

arasında istatistiksel olarak anlamlı ( $p < 0.05$ ) ve kuvvetli negatif bir korelasyon ( $r = -0.66$ ) bulunmuştur (Şekil 3.18.).



Şekil 3.18. Kotiledon eksplantlarından gelişen epiBL uygulamasız kallusların artan tuz dozlarına göre çapı (cm)

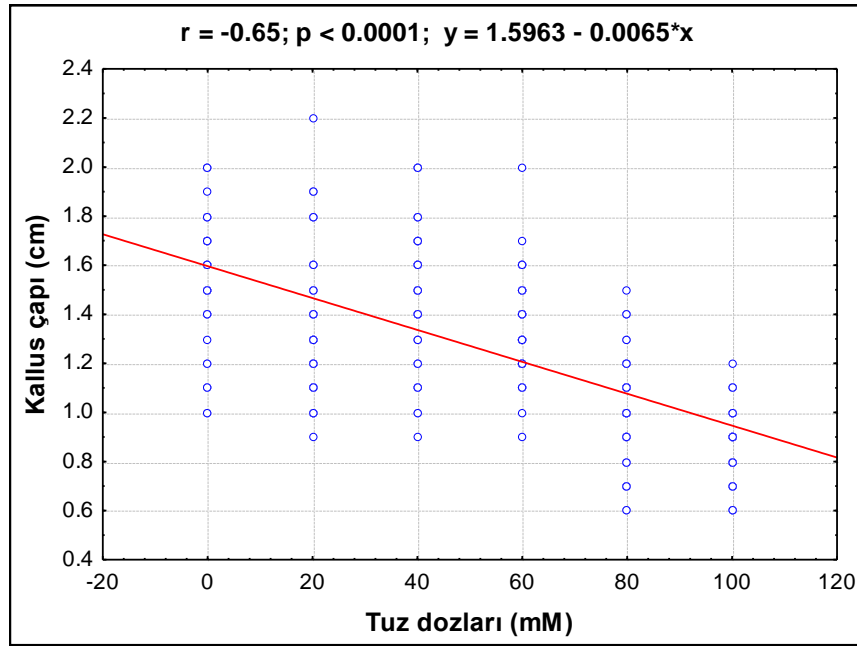
Kallus çapı en yüksek 40 mM tuzlu ortamda ve 2  $\mu$ M epiBL uygulaması yapılanlarda 1.47 cm bulunmuştur. En düşük kallus çapı ise 100 mM NaCl içeren ortamda ve 2  $\mu$ M epiBL uygulamasında 0.87 cm olarak tespit edilmiştir. Tuz stresine karşı epiBL uygulamalarının etkisine bakıldığında, tuzsuz ortamda epiBL uygulaması epiBL uygulamasızlara göre kallus çapını düşürmüştür ve düşüş 2  $\mu$ M epiBL uygulamasında istatistiksel olarak önemli fark oluşturmuştur. 20 mM NaCl içeren ortamda epiBL uygulamasızlar ile epiBL uygulamasızlar arasında kallus çapı çok farklılık göstermemiştir. 40 mM ve 60 mM tuz dozunda ise her iki konsantrasyonda kullanılan epiBL uygulaması kallus çapını arttırmıştır ve epiBL uygulamasının olumlu etkisi istatistiksel olarak önemli farklılık oluşturmuştur. 80 mM tuz konsantrasyonunda, her iki epiBL uygulaması kallus çapını arttırmıştır ve 2  $\mu$ M epiBL uygulaması ile ortalama kallus çapındaki artış istatistiksel olarak önemli farklılık göstermiştir. 100 mM en yüksek tuz dozunda ise, epiBL uygulamaları kallus çapında etki göstermemiştir (Çizelge 3.35.).

**Çizelge 3.35. Kotiledon eksplantlarından gelişen epiBL uygulamasız ve uygulamalı 30 günlük kallusların çapı (cm)**

EpiBL Dozları (µM)	Tuz Dozları (mM)					
	0	20	40	60	80	100
0	1.32±0.025 <sup>a</sup>	1.45±0.026	1.30±0.023 <sup>b</sup>	1.21±0.023 <sup>b</sup>	0.91±0.019 <sup>b</sup>	0.91±0.023
1	1.26±0.024 <sup>ab</sup>	1.44±0.026	1.41±0.023 <sup>a</sup>	1.37±0.019 <sup>a</sup>	0.92±0.019 <sup>b</sup>	0.93±0.016
2	1.19±0.023 <sup>b</sup>	1.46±0.030	1.47±0.026 <sup>a</sup>	1.33±0.023 <sup>a</sup>	1.00±0.022 <sup>a</sup>	0.87±0.025

Değerler, ortalama±standart hatadır. Aynı sütundaki değerler bakımından, harflendirmeler P<0.05'de kontrole göre epiBL dozları arasındaki istatistiksel farklılığı göstermektedir.

Hipokotil eksplantlarından gelişen kallusların çapı, kotiledon eksplantından gelişenlere benzer şekilde 60 mM tuz dozunda kadar birbirine yakın seyrederken 80 ve 100 mM tuz dozunda belirgin bir azalma olmuştur. Tuz dozları ile kallus çapı arasında istatistiksel olarak anlamlı ( $p<0.05$ ) ve kuvvetli negatif bir korelasyon ( $r=-0.65$ ) bulunmuştur (Şekil 3.19.).



**Şekil 3.19. Hipokotil eksplantlarından gelişen epiBL uygulamasız kallusların artan tuz dozlarına göre çapı (cm)**

Chamandoosti (2007), kanola hipokotil segmenlerini çeşitli bitki büyüme düzenleyicilerini içeren ortamda kültüre almışlardır. Araştırmacı, 6 mg/l 2,4-D+2 mg/l



BAP içeren MS ortamında en iyi kallus gelişimi gözlemişlerdir, kallus çapının 68.37 mM NaCl dozunda arttığını, tuz stresinin etkisi ile kallus çapının azaldığını ve 170.94 mM NaCl dozundan itibaren kallus çapının ölçülemeyecek kadar çok azaldığını tespit etmişlerdir. Benderradji vd. (2012), 2 ekmeklik buğday çeşidinde (tuza duyarlı Mahon-Demias (MD) ve tuza tolerant Hidhab (HD1220)), olgun embriyo kültürlerinden elde ettikleri kallusları 0, 5, 10 ve 15 g/l tuz içeren ortamda alt kültüre almışlardır. Her iki çeşitte bizim sonuçlarımıza benzer şekilde tuz stresinin kallus çapını azalttığını ve MD çeşidinde kallus çapının daha yüksek olduğunu belirlemişlerdir. Bizim çalışmamızda en yüksek kallus çapı, tuzsuz ortamda 1 µM epiBL uygulamasında 1.57 cm; en düşük kallus çapı ise, 100 mM tuz dozunda 1 µM epiBL uygulamasında 0.82 cm bulunmuştur. Tuz stresine karşı epiBL uygulamasının etkisine baktığımızda, tuzsuz ortamda epiBL uygulamasızlara göre 1 µM epiBL uygulaması kallus çapını artırırken, 2 µM epiBL uygulaması kallus çapını azaltmıştır azalma istatistiksel olarak önemlidir. 20 mM tuzlu ortamda ise her iki epiBL uygulaması ile kallus çapı artmıştır ancak, 2 µM epiBL uygulaması istatistiksel olarak önemli farklılık oluşturmuştur. 60 mM ve 80 mM tuz dozlarında, epiBL uygulamasızlara göre 1 µM ve 2 µM epiBL uygulamasının etkisi istatistiksel olarak farklılık oluşturmamıştır. 100 mM tuz dozunda epiBL uygulamasızlara göre 1 µM epiBL uygulaması kallus çapını azaltırken, 2 µM epiBL uygulaması ise çok az arttırmıştır. 100 mM tuz dozunda epiBL uygulamasının etkisi istatistiksel olarak önemli değildir (Çizelge 3.36.).

**Çizelge 3.36. Hipokotil eksplantlarından gelişen epiBL uygulamasız ve uygulamalı 30 günlük kallusların çapı (cm)**

EpiBL Dozları (µM)	Tuz Dozları (mM)					
	0	20	40	60	80	100
0	1.54±0.037 <sup>a</sup>	1.34±0.035 <sup>b</sup>	1.49±0.037 <sup>a</sup>	1.34±0.021	1.01±0.022	0.85±0.018
1	1.57±0.035 <sup>a</sup>	1.45±0.045 <sup>ab</sup>	1.32±0.031 <sup>b</sup>	1.36±0.029	1.03±0.020	0.82±0.017
2	1.19±0.023 <sup>b</sup>	1.46±0.030 <sup>a</sup>	1.47±0.026 <sup>a</sup>	1.33±0.023	1.00±0.022	0.87±0.025

Değerler, ortalama±standart hatadır. Aynı sütundaki değerler bakımından, harflendirmeler P<0.05'de kontrole göre epiBL dozları arasındaki istatistiksel farklılığı göstermektedir.

Kullandığımız tuz dozlarına göre kallus çapı üzerine eksplant tipinin, epiBL dozlarının ve eksplant tipi x epiBL dozları interaksiyonunun etkisinin olup olmadığı

değerlendirilmiştir. 0, 80 ve 100 mM tuz dozlarında kullanılan eksplant tipinin; 0, 40 ve 60 mM tuz dozlarında ise epiBL dozlarının ve 20 mM tuz dozu hariç diğer tüm tuz dozlarında eksplant tipi x epiBL dozları interaksyonunun istatistiksel olarak önemli farklılık oluşturduğu bulunmuştur (Çizelge 3.37.).

**Çizelge 3.37. Tuz dozlarına göre kallus çapı üzerine eksplant tipi, epiBL dozları ve eksplant tipi x epiBL dozları interaksyonunun etkisi**

Tuz Dozları (mM)	Eksplant Tipi	EpiBL Dozları	Eksplant Tipi x EpiBL Dozları
0	P<0.0001	P<0.0001	P=0.0001
20	ns	ns	ns
40	ns	P=0.0006	P<0.0001
60	ns	P=0.0007	P=0.0046
80	P<0.0001	ns	P=0.0202
100	P=0.0018	ns	P=0.0331

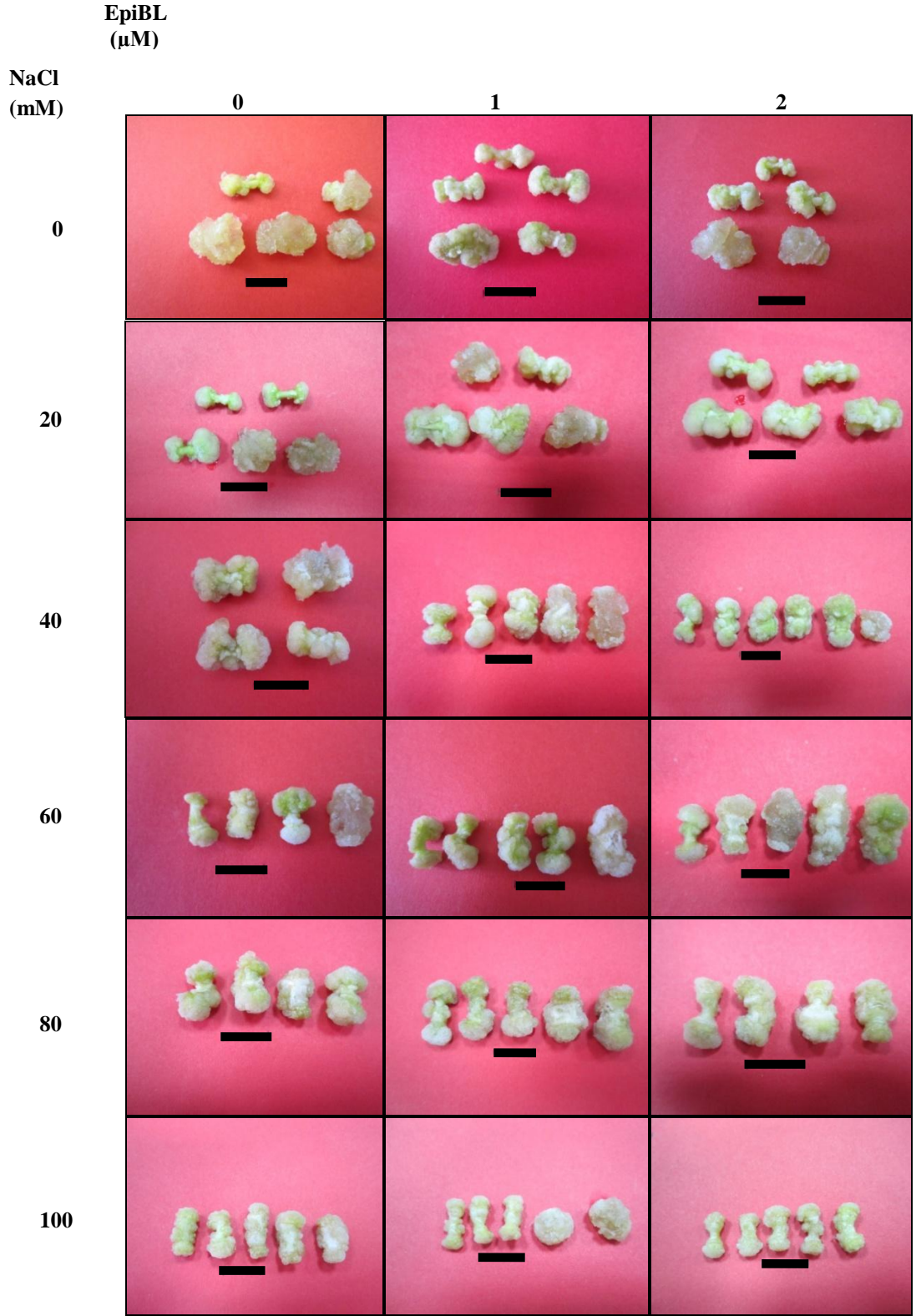
EpiBL'nin kalluslara uygulandığı bu çalışmada sonuç olarak, kullandığımız M-28 domates çeşidine ait eksplant tipinin ve tuz stresine karşı kullandığımız epiBL dozlarının kallus yaş ağırlığı, kallus kuru ağırlığı ve kallus çapı üzerine olumlu etkileri belirlenmiştir.

### **3.3.2. EpiBL'nin eksplantlara uygulandığı in vitro kültür çalışmasına ait bulgular**

EpiBL uygulaması yapılan eksplantlar, artan tuz dozlarını içeren 1 mg/l BAP+1 mg/l 2,4-D ilaveli MS ortamlarında kültüre alınmıştır. Ölçülen EC değerleri aşağıdadır;

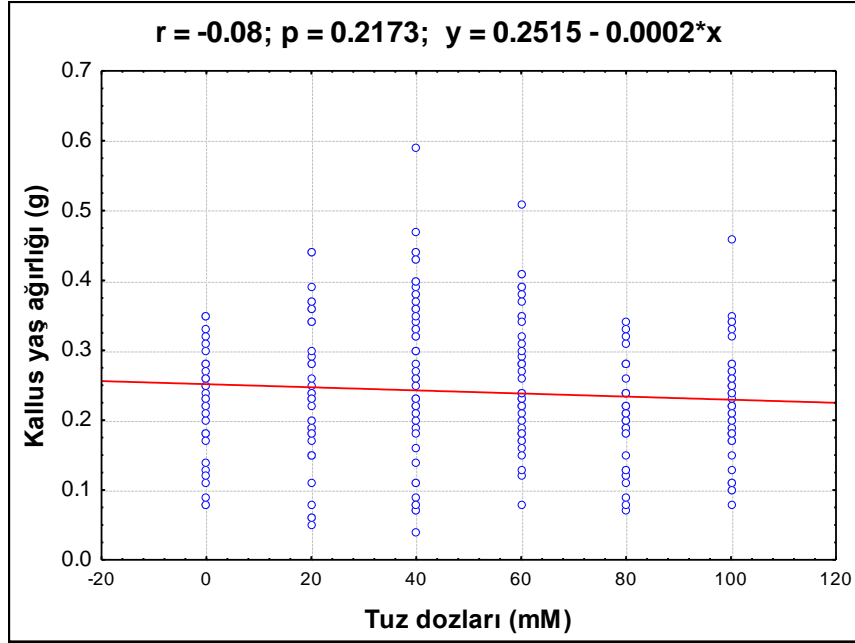
- i.** 0 mM NaCl (kontrol) ve BAP+2,4-D ilaveli MS ortamı = 5.80 mS/cm
- ii.** 20 mM NaCl ve BAP+2,4-D ilaveli MS ortamı = 7.64 mS/cm
- iii.** 40 mM NaCl ve BAP+2,4-D ilaveli MS ortamı = 9.49 mS/cm
- iv.** 60 mM NaCl ve BAP+2,4-D ilaveli MS ortamı = 11.64 mS/cm
- v.** 80 mM NaCl ve BAP+2,4-D ilaveli MS ortamı = 13.37 mS/cm
- vi.** 100 mM NaCl ve BAP+2,4-D ilaveli MS ortamı = 14.84 mS/cm

30 günlük kültürde özellikle hipokotil eksplantları tuz stresinden olumsuz etkilenmiş ve bilhassa 100 mM tuz dozunda gelişim çok fazla gerilemiştir (Şekil 3.20.).



Şekil 3.20. EpiBL uygulamasız ve uygulamalı hipokotil eksplantlarından 30 gün sonra kallus oluşumları (Ölçü çizgisi: 1 cm)

Kotiledon eksplantlarından gelişen kallusların yaş ağırlığı artan tuz dozlarında birbirine yakın olduğu görülmüştür. EpiBL uygulamasız kalluslarda, artan tuz dozları ile kallus yaş ağırlığı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon ( $p=0.2173$ ;  $r=-0.08$ ) bulunmamıştır (Şekil 3.21.).



Şekil 3.21. Artan tuz dozlarına göre epiBL uygulamasız kotiledon eksplantlarından gelişen kallusların yaş ağırlığı (g)

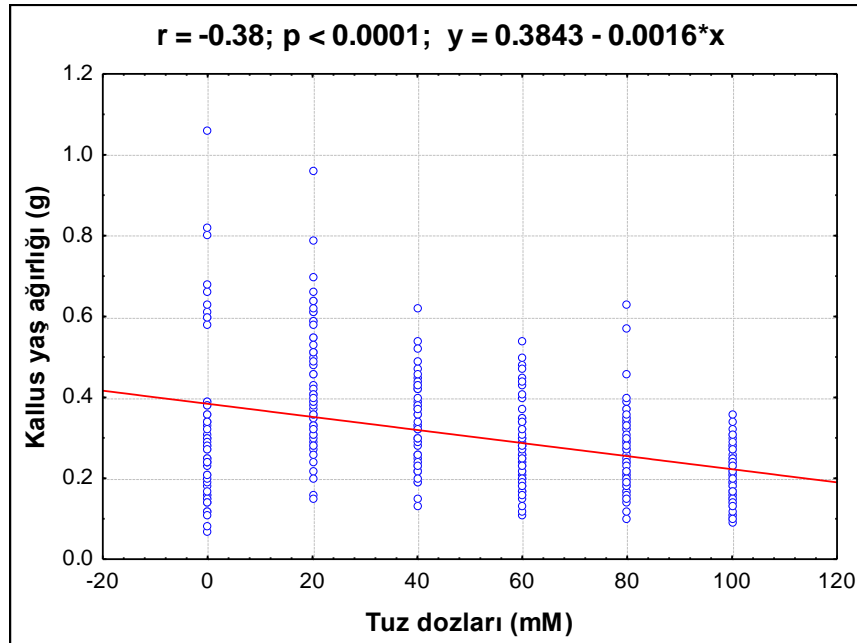
Tuz dozlarına göre epiBL uygulamasının etkisine bakıldığında; kotiledon eksplantından gelişen kallusların yaş ağırlığı, tuzsuz ortamda epiBL kullanımı ile artmış ve istatistiksel olarak farklılık önemlidir. 20 mM tuz stresinde ise kallus yaş ağırlığı epiBL uygulaması sonucunda artış göstermiş ve sadece 2  $\mu\text{M}$  epiBL uygulamasının etkisi istatistiksel olarak önemli olmuştur. 40, 60 80 ve 100 mM tuz dozunda her iki epiBL uygulamasının kallus yaş ağırlığı üzerinde istatistiksel olarak farklılık oluşturmamıştır (Çizelge 3.38.).

**Çizelge 3.38. EpiBL uygulamasız ve uygulamalı kotiledon eksplantlarından gelişen 30 günlük kallusların yaş ağırlığı (g)**

EpiBL Dozları (µM)	Tuz Dozları (mM)					
	0	20	40	60	80	100
0	0.22±0.01 <sup>b</sup>	0.23±0.01 <sup>b</sup>	0.27±0.01	0.25±0.012	0.20±0.011	0.21±0.010 <sup>a</sup>
1	0.29±0.01 <sup>a</sup>	0.27±0.01 <sup>ab</sup>	0.23±0.01	0.27±0.016	0.21±0.010	0.23±0.010 <sup>a</sup>
2	0.33±0.01 <sup>a</sup>	0.30±0.02 <sup>a</sup>	0.25±0.01	0.26±0.009	0.23±0.008	0.18±0.008 <sup>b</sup>

Değerler, ortalama±standart hatadır. Aynı sütundaki değerler bakımından, harflendirmeler P<0.05'de kontrole göre epiBL dozları arasındaki istatistiksel farklılığı göstermektedir.

Hipokotil eksplantlarından gelişen kallusların yaş ağırlığı tuzsuz ortama göre 20 mM ve 40 mM tuz içeren ortamlarda yükselmiş, ancak artan tuz dozlarında azalma eğilimi göstermiştir. EpiBL uygulamasız kalluslarda, artan tuz dozları ile kallus yaş ağırlığı arasında istatistiksel olarak anlamlı ( $p<0.05$ ) ve kuvvetli olmayan negatif bir korelasyon ( $r=-0.38$ ) bulunmuştur (Şekil 3.22.).



**Şekil 3.22. Artan tuz dozlarına göre epiBL uygulamasız hipokotil eksplantlarından gelişen kallusların yaş ağırlığı (g)**

Aazami vd. (2010), 6 domates çeşidinde hipokotil eksplantlarını 1 mg/l BAP+1 mg/l 2,4-D ve 0, 25, 50, 75, 100 mM NaCl içeren MS ortamında kültüre almışlar ve kallusların büyüme oranının tuz stresinden olumsuz etkilendiğini tespit etmişlerdir.

Buna karşılık kuru ağırlık yüzdesinin tuz stresi ile arttığını belirlemişlerdir. Çalışmamızda kallus yaş ağırlığı üzerine tuz stresinin olumsuz etkisinin olması diğer çalışmaların sonuçlarının birbiri ile uyumlu olduğunu göstermektedir. Çalışmamızda tuz stresine karşı kullandığımız epiBL'nin etkisini değerlendirdiğimizde, kullanılan herbir tuz dozuna göre epiBL uygulamasının etkisine baktığımızda; hipokotil eksplantından gelişen kallusların yaş ağırlığı, tuzsuz ortamda epiBL kullanımı ile olumsuz etkilenmiştir. 20 ve 40 mM tuz stresinde de benzer şekilde epiBL kullanımı kallus yaş ağırlığını azaltmıştır. 60 mM tuz stresinde, epiBL kallus yaş ağırlığını arttırmış ve 1 µM epiBL uygulaması ile istatistiksel olarak önemli farklılık olmuştur. Diğer yüksek tuz dozlarında epiBL'nin olumlu etkisi gözlenmemiştir (Çizelge 3.39.).

**Çizelge 3.39. EpiBL uygulamasız ve uygulamalı hipokotil eksplantlarından gelişen 30 günlük kallusların yaş ağırlığı (g)**

EpiBL dozları (µM)	Tuz Dozları (mM)					
	0	20	40	60	80	100
0	0.31±0.02 <sup>a</sup>	0.41±0.01 <sup>a</sup>	0.32±0.01 <sup>a</sup>	0.27±0.01 <sup>b</sup>	0.26±0.012 <sup>a</sup>	0.19±0.008 <sup>a</sup>
1	0.20±0.01 <sup>b</sup>	0.40±0.01 <sup>a</sup>	0.26±0.01 <sup>b</sup>	0.32±0.01 <sup>a</sup>	0.24±0.009 <sup>a</sup>	0.17±0.008 <sup>ab</sup>
2	0.22±0.01 <sup>b</sup>	0.34±0.01 <sup>b</sup>	0.26±0.01 <sup>b</sup>	0.29±0.01 <sup>ab</sup>	0.21±0.009 <sup>b</sup>	0.16±0.009 <sup>b</sup>

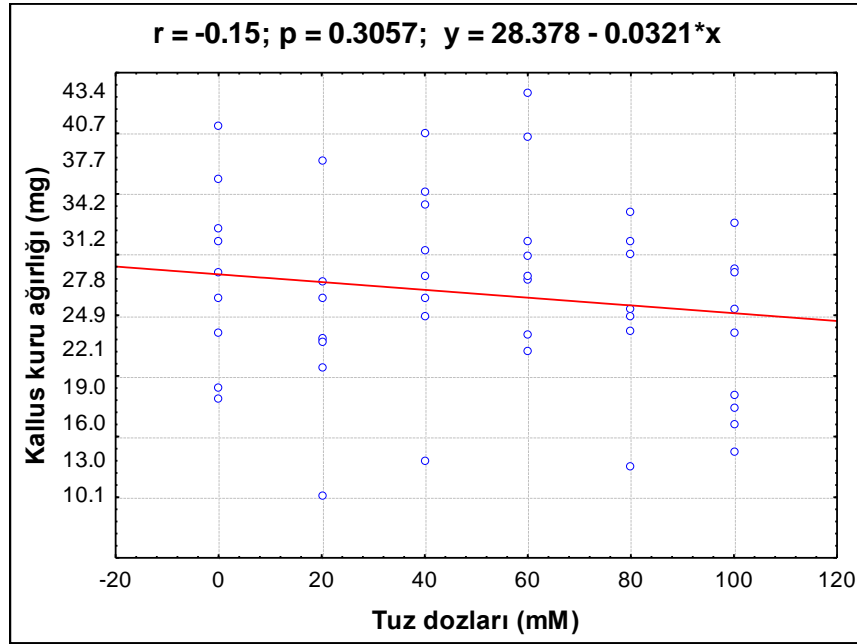
Değerler, ortalama±standart hatadır. Aynı sütundaki değerler bakımından, harflendirmeler P<0.05'de kontrole göre epiBL dozları arasındaki istatistiksel farklılığı göstermektedir.

Kullandığımız tuz dozlarına göre kallus yaş ağırlığı üzerine eksplant tipinin, epiBL dozlarının ve eksplant tipi x epiBL dozları interaksiyonunun etkisi değerlendirilmiştir. Tüm tuz dozlarında kullanılan eksplant tipinin kallus yaş ağırlığı üzerine istatistiksel olarak önemli etkisi olmuştur. Eksplanta yapılan epiBL uygulaması sadece 40 ve 100 mM tuz dozlarında istatistiksel olarak önemli farklılık oluşturmuştur. Kallus yaş ağırlığı üzerine eksplant tipi x epiBL dozları interaksiyonu, 0, 20 ve 80 mM tuz dozlarında istatistiksel olarak önemli fark oluşturmuştur (Çizelge 3.40.).

**Çizelge 3.40. Tuz dozlarına göre kallus yaş ağırlığı üzerine eksplant tipi, epiBL dozları ve eksplant tipi x epiBL dozları interaksiyonunun etkisi**

Tuz Dozları (mM)	Eksplant Tipi	EpiBL Dozları	Eksplant Tipi x EpiBL Dozları
0	P=0.0420	ns	P<0.0001
20	P<0.0001	ns	P<0.0001
40	P=0.0042	P=0.0003	ns
60	P=0.0041	ns	ns
80	P=0.0180	ns	P=0.0006
100	P<0.0001	P=0.0006	ns

EpiBL uygulamasız kotiledon eksplantlarından gelişen kallusların kuru ağırlığı yaş ağırlığına benzer şekilde artan tuz dozlarını içeren ortamlarda birbirine yakındır. Dolayısı ile epiBL uygulamasız kalluslarda, artan tuz dozları ile kallus yaş ağırlığı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon ( $p=0.3057$ ;  $r=-0.15$ ) bulunmamıştır (Şekil 3.23.).



**Şekil 3.23. Artan tuz dozlarına göre epiBL uygulamasız kotiledon eksplantlarından gelişen kallusların kuru ağırlığı (mg)**

Kotiledon eksplantından gelişim gösteren kallusların kuru ağırlığı üzerine tuz stresine karşı epiBL uygulamalarının etkisini değerlendirdiğimizde; tuzsuz ortamda epiBL uygulaması sonucunda kuru ağırlık artış göstermiştir; ancak farklılık önemli olmamıştır. 20 mM tuz dozunda, kallus kuru ağırlığı epiBL uygulaması ile artmıştır

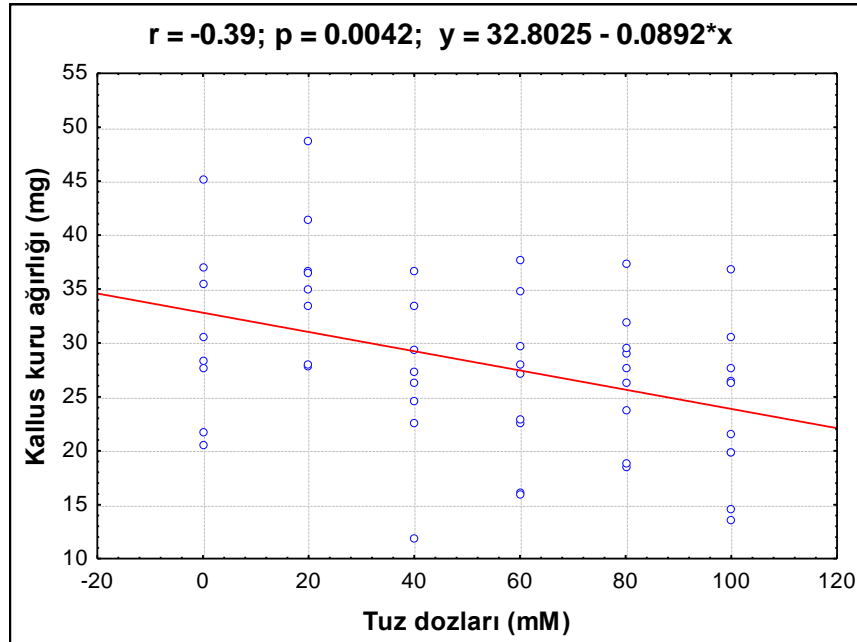
ve her iki dozdaki artış istatistiksel olarak önemli farklılık oluşturmuştur. Diğer tuz dozlarında epiBL uygulamasının kallus kuru ağırlığı üzerine istatistiksel olarak önemli etkisi olmamıştır (Çizelge 3.41.).

**Çizelge 3.41. EpiBL uygulamasız ve uygulamalı kotiledon eksplantlarından gelişen 30 günlük kallusların kuru ağırlığı (mg)**

EpiBL Dozları (µM)	Tuz Dozları (mM)					
	0	20	40	60	80	100
0	28.45±2.51	23.98±2.72 <sup>b</sup>	29.05±2.80	27.80±2.20	25.92±2.62	22.77±2.21
1	35.80±2.24	35.32±1.94 <sup>a</sup>	27.63±1.99	21.66±2.11	21.66±2.11	22.18±1.90
2	31.43±2.47	32.05±2.34 <sup>a</sup>	28.11±3.25	27.2±2.05	27.22±2.05	22.37±1.61

Değerler, ortalama±standart hatadır. Aynı sütundaki değerler bakımından, harflendirmeler P<0.05'de kontrole göre epiBL dozları arasındaki istatistiksel farklılığı göstermektedir.

EpiBL uygulamasız hipokotil eksplantlarından gelişen kallusların kuru ağırlığı tuzsuz ortama göre 20 mM tuz içeren ortamda yükselmiş, ancak tuz dozlarının artması sonucunda azalma göstermiştir. EpiBL uygulamasız kalluslarda, artan tuz dozları ile kallus yaş ağırlığı arasında istatistiksel olarak anlamlı ( $p<0.05$ ) ve kuvvetli olmasa da negatif bir korelasyon ( $r=-0.39$ ) bulunmuştur (Şekil 3.24.).



**Şekil 3.24. Artan tuz dozlarına göre epiBL uygulamasız hipokotil eksplantlarından gelişen kallusların kuru ağırlığı (mg)**



Hipokotil eksplantından gelişen kallusların kuru ağırlığı üzerine tuz stresine karşı epiBL uygulamalarının etkisi değerlendirildiğinde, hiçbir tuz dozunda epiBL'nin olumlu etkisi gözlenmemiş ve istatistiki olarak farklılık önemli olmamıştır (Çizelge 3.42.).

**Çizelge 3.42. EpiBL uygulamasız ve uygulamalı hipokotil eksplantlarından gelişen 30 günlük kallusların kuru ağırlığı (mg)**

EpiBL Dozları (µM)	Tuz Dozları (mM)					
	0	20	40	60	80	100
0	30.80±2.89 <sup>a</sup>	35.93±2.42 <sup>a</sup>	26.51±2.65	26.11±2.50	27.01±2.01	23.172±2.28
1	17.15±3.30 <sup>b</sup>	25.76±2.39 <sup>b</sup>	23.66±1.67	27.31±1.79	22.18±2.36	22.58±2.03
2	34.05±2.70 <sup>a</sup>	31.74±2.00 <sup>ab</sup>	21.07±2.39	23.68±2.16	20.38±1.60	22.16±2.38

Değerler, ortalama±standart hatadır. Aynı sütundaki değerler bakımından, harflendirmeler P<0.05'de kontrole göre epiBL dozları arasındaki istatistiksel farklılığı göstermektedir.

Kullandığımız tuz dozlarına göre kallus kuru ağırlığı üzerine eksplant tipinin, epiBL dozlarının ve eksplant tipi x epiBL dozları interaksiyonunun etkisinin olup olmadığı değerlendirildiğinde; 0, 40 ve 60 mM tuz dozlarında kullanılan eksplant tipinin kallus kuru ağırlığı üzerine istatistiksel olarak önemli etkisi olmuştur. EpiBL uygulaması, hiç bir tuz dozunda istatistiksel olarak önemli farklılık oluşturmamıştır. Kallus kuru ağırlığı üzerine eksplant tipi x epiBL dozları interaksiyonunun etkisi, sadece 0 ve 20 mM tuz dozlarında istatistiksel olarak önemli olmuştur (Çizelge 3.43.).

**Çizelge 3.43. Tuz dozlarına göre kallus kuru ağırlığı üzerine eksplant tipi, epiBL dozları ve eksplant tipi x epiBL dozları interaksiyonunun etkisi**

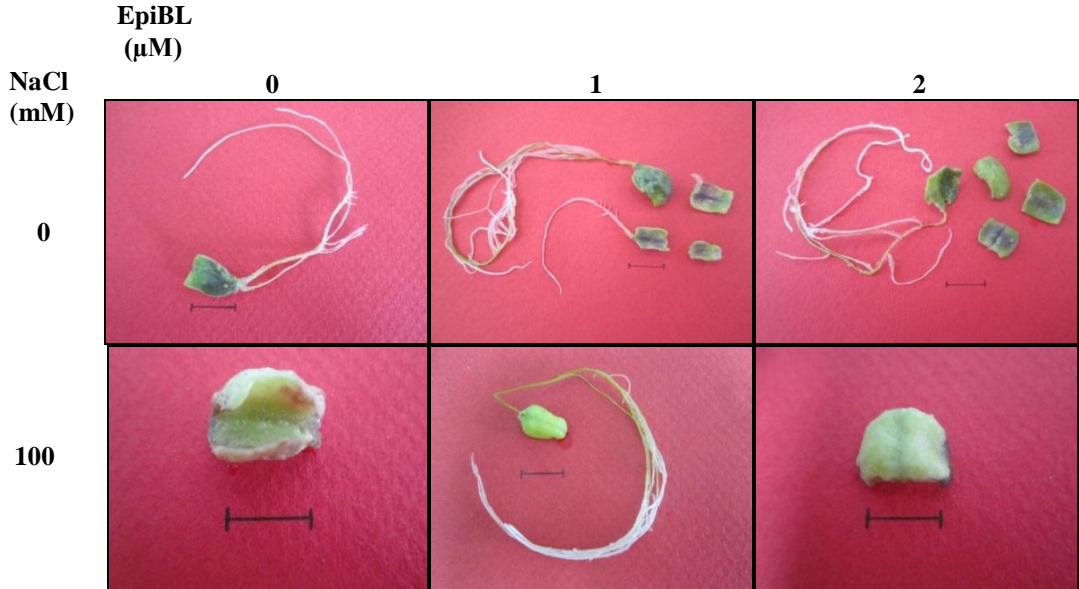
Tuz Dozları (mM)	Eksplant Tipi	EpiBL Dozları	Eksplant Tipi x EpiBL Dozları
0	P=0.0453	ns	P=0.0002
20	ns	ns	P=0.0001
40	P=0.0327	ns	ns
60	P=0.0037	ns	ns
80	ns	ns	ns
100	ns	ns	ns

Genel olarak epiBL'nin eksplantlara uygulandığı kallus kültürü çalışmasında, kallus yaş ve kuru ağırlığı üzerine düşük ve orta düzeydeki tuz stresinde epiBL'nin etkisi

gözlenmiştir. Buna karşılık olarak, kallusların doku ve rengi bakımından hipokotil eksplantları daha başarılı sonuçlar vermiştir. Hipokotil ekplantından gelişen kallusların renginin yeşil ve sulu dokulu olduğu; tuz stresinin renk ve doku üzerinde olumsuz etki sergilemediği gözlenmiştir. Buna karşılık, kotiledon eksplantlarından gelişen kallusların, sulu olmasına rağmen açık sarı-bej renginde olduğu ve kallus dokusunun çok gelişmediği tespit edilmiştir.

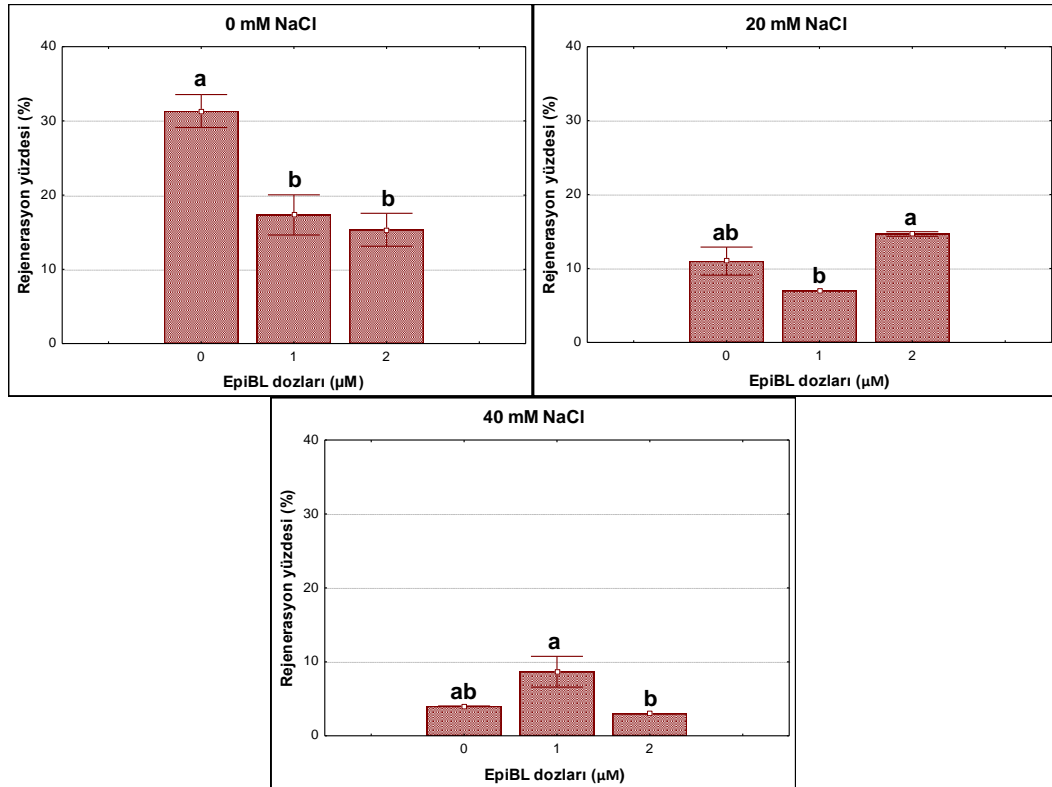
### 3.4. İn Vitro Direk Sürgün Rejenerasyonu Çalışmasına Ait Bulgular

Domateste, tuz toleransını değerlendirmede kullanılan in vitro sürgün morfogenezisi, tuz stresinin etkilerini görmek amacı ile yapılan önemli bir metottur. Dolayısı ile tuz stresi altında kotiledon ve hipokotil eksplantlarından sürgün rejenerasyonunu görmek hem de tuz stresi altında rejenerasyon üzerine epiBL'nin etkisini değerlendirmek amacı ile tez kapsamında bu çalışma yapılmıştır. Bir aylık kültür süresinin sonunda rejenerasyonla ilgili sonuçlar elde edilmiştir. Artan tuz dozlarını içeren ancak bitki büyüme düzenleyicisi ilavesiz MS ortamında kotiledon eksplantlarının kültüründe sürgün rejenerasyonu gözlenmemiştir (Şekil 3.25.).

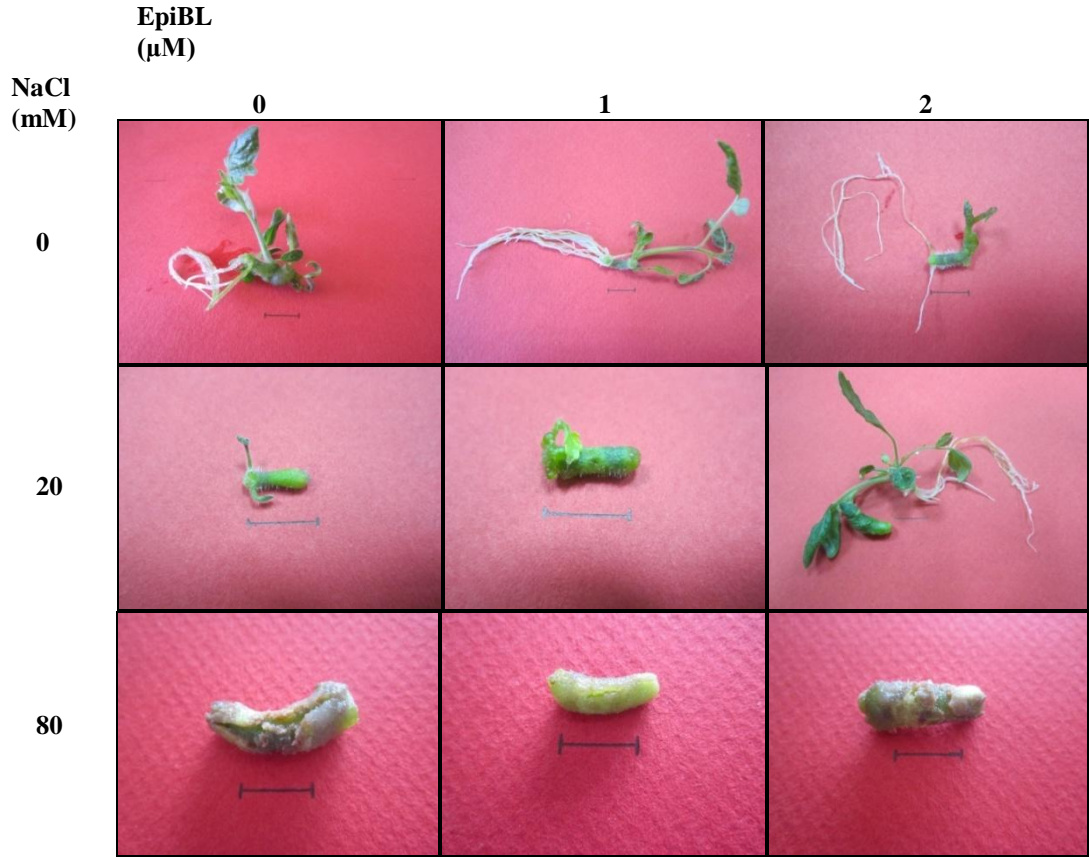


Şekil 3.25. EpiBL uygulamasız ve uygulamalı kotiledon eksplantlarının MS ortamındaki kültürlerinde 30 gün sonraki durumları (Ölçü çizgisi: 1 cm)

Bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen ve artan tuz dozları ilaveli MS ortamında kültüre alınan kotiledon eksplantlarından rejenerasyon gözlenmemesine karşın; hipokotil eksplantlarından sürgün rejenerasyonu gözlenmiştir. Rejenerasyon yüzdesi tuz stresinden olumsuz etkilenmiş ve artan tuz stresi ile rejenerasyon olumsuz etkilenmiştir. Tuzsuz ortamda, rejenerasyon %31'dir ve epiBL uygulaması ile bu rejenerasyon yüzdesi düşüş göstermiştir. 20 mM tuz dozunda 2  $\mu$ M epiBL uygulaması ve 40 mM tuz dozunda 1  $\mu$ M epiBL uygulamasının rejenerasyon yüzdesini arttırmış ancak epiBL'nin etkisi istatistiksel olarak önemli olmamıştır (Şekil 3.26.). 60 mM tuz dozunda epiBL uygulamasız ve 1  $\mu$ M epiBL uygulamalı eksplantlarda rejenerasyon gözlenmezken, 2  $\mu$ M epiBL uygulamasında %2 rejenerasyon gözlenmiştir. 80 mM tuz dozunda rejenerasyon gözlenmemiş, oysa 100 mM tuz dozunda %2 rejenerasyon gözlenmiştir. Tuz dozlarının artışı ile rejenerasyon frekansındaki düşüşle birlikte eksplantlarda çatlama ve yarılma gözlenmiştir (Şekil 3.27.).



Şekil 3.26. MS ortamında kültüre alınan epiBL uygulamasız ve uygulamalı hipokotil eksplantlarında rejenerasyon yüzdesi (%)



Şekil 3.27. EpiBL uygulamasız ve uygulamalı hipokotil eksplantlarının MS ortamındaki kültürlerinde 30 gün sonraki durumları (Ölçü çizgisi: 1 cm)

Hipokotil eksplantlarından rejenere olan adventif sürgünlerin ortalama sayısı, tuzsuz ortama göre 20 mM ve 40 mM tuz dozlarında epiBL uygulamasız eksplantlardan rejenere olan sürgün sayısı düşük iken, 60 mM ve 80 mM tuz dozlarında adventif sürgün oluşmamıştır. 100 mM tuz dozunda ise adventif sürgün gözlenmiştir. Tuz stresine karşı epiBL uygulamasının etkisine baktığımızda; tuzsuz ortamda 1  $\mu$ M epiBL uygulaması, 20 mM tuz dozunda her iki dozdaki epiBL uygulaması eksplant başına düşen sürgün sayısını arttırmasına karşın epiBL'nin istatistiksel olarak olumlu etkisi olmamıştır. 60 mM tuz dozunda 2  $\mu$ M epiBL uygulaması sürgün sayısını arttırmış ve artış istatistiksel olarak önemli olmuştur (Çizelge 3.44.).

**Çizelge 3.44. MS ortamında epiBL uygulamasız ve uygulamalı hipokotil eksplantlarından rejenere olan sürgünlerin sayısı (adet/eksplant)**

EpiBL Dozları (µM)	Tuz Dozları (mM)					
	0	20	40	60	80	100
0	2.61±0.40	1.60±0.24	2.00±0.00	0.00±0.00 <sup>b</sup>	0.00±0.00	7.00±0.0
1	3.14±0.55	2.33±1.33	1.00±0.00	0.00±0.00 <sup>b</sup>	0.00±0.00	0.00±0.00
2	1.85±0.45	3.66±1.20	1.00±0.00	3.00±0.00 <sup>a</sup>	0.00±0.00	0.00±0.00

Değerler, ortalama±standart hatadır. Aynı sütundaki değerler bakımından, harflendirmeler P<0.05'de kontrole göre epiBL dozları arasındaki istatistiksel farklılığı göstermektedir.

Rejenerasyon sonucu oluşan adventif sürgünlerin ortalama boyu tuz stresinden olumsuz etkilenmiş ve 40 mM tuz dozundan itibaren rejenerasyon olsa bile sürgün boyu ölçülebilecek kadar sürgün gelişimi olmamıştır. Tuzsuz ortamda 1 µM epiBL uygulaması sürgün boyunu arttırsa da istatistiksel olarak önemli olmamıştır. 20 mM tuz stresinde, epiBL uygulaması adventif sürgün boyunu arttırmış ve sadece 2 µM epiBL uygulaması istatistiksel olarak önemli farklılık oluşturmuştur (Çizelge 3.45.).

**Çizelge 3.45. MS ortamında epiBL uygulamasız ve uygulamalı hipokotil eksplantlarından rejenere olan sürgünlerin boyu (mm)**

EpiBL Dozları (µM)	Tuz Dozları (mM)					
	0	20	40	60	80	100
0	6.95±2.34	1.68±0.64 <sup>b</sup>	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
1	10.61±3.95	2.83±2.08 <sup>ab</sup>	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
2	4.50±1.18	17.28±3.65 <sup>a</sup>	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00

Değerler, ortalama±standart hatadır. Aynı sütundaki değerler bakımından, harflendirmeler P<0.05'de kontrole göre epiBL dozları arasındaki istatistiksel farklılığı göstermektedir.

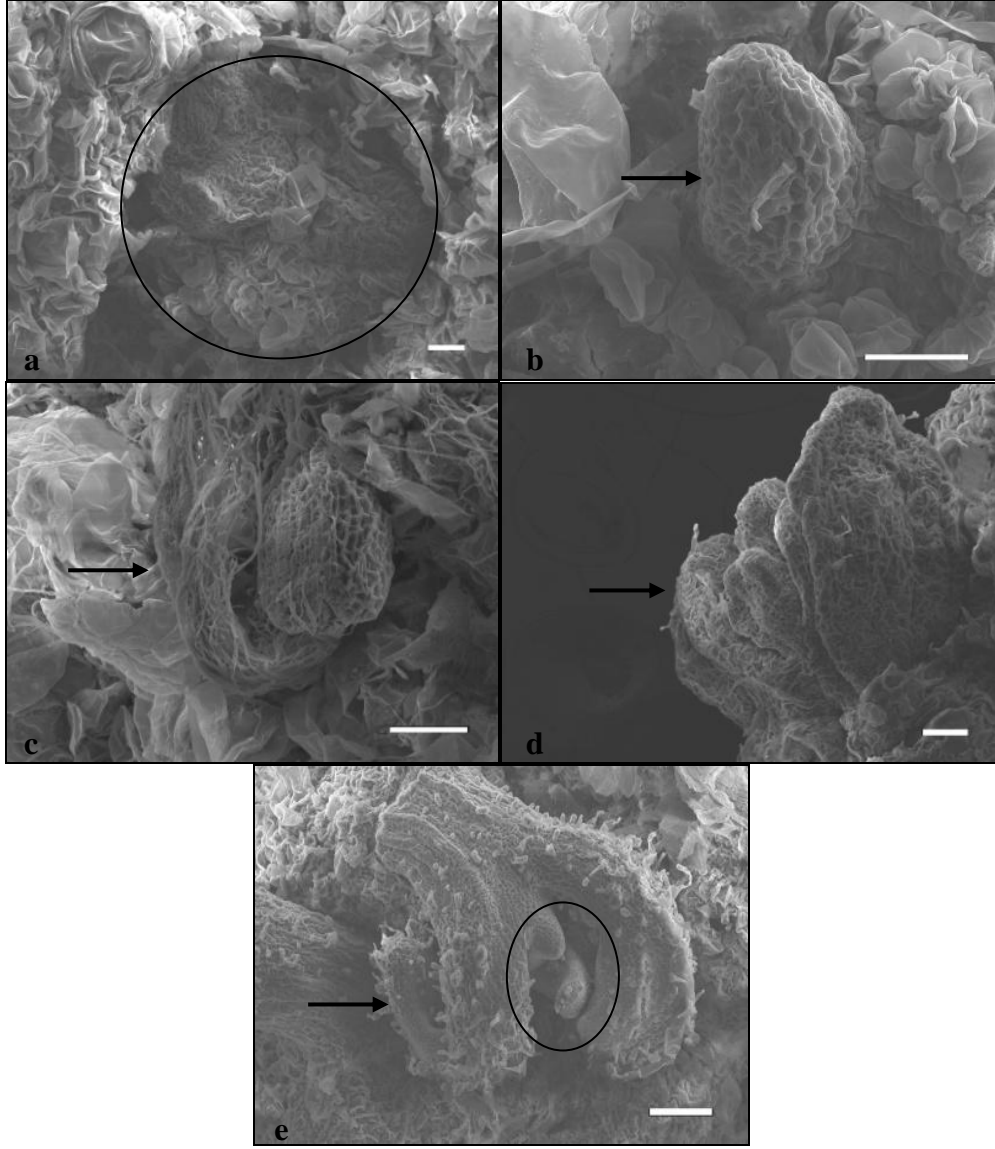
Adventif sürgünlerin yaprak sayısı da sürgün boyuna benzer şekilde tuz stresinden olumsuz etkilenmiştir. Tuz stresine karşı epiBL uygulamasının etkisi değerlendirildiğinde, tuzsuz ortamda epiBL uygulamalı eksplantlardan gelişen sürgünlerin yaprak sayısı epiBL uygulamasız eksplantlardan gelişenlere göre azalma sergilemiştir. 20 mM tuz dozunda epiBL uygulaması yaprak sayısını arttırmış ancak artış istatistiksel olarak önemli farklılık oluşturmamıştır. Diğer tuz dozlarında epiBL uygulamalı hipokotil eksplantlarından yaprak sayısı belirlenebilecek bir sürgün oluşumu gözlenmemiştir (Çizelge 3.46.).

**Çizelge 3.46. MS ortamında epiBL uygulamasız ve uygulamalı hipokotil eksplantlarından rejenere olan sürgünlerin yaprak sayısı (adet)**

EpiBL Dozları ( $\mu$ M)	Tuz Dozları (mM)					
	0	20	40	60	80	100
0	1.64 $\pm$ 0.15	1.12 $\pm$ 0.12	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00
1	1.54 $\pm$ 0.19	1.33 $\pm$ 0.33	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00
2	1.30 $\pm$ 0.13	1.45 $\pm$ 0.14	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00

Bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen MS ortamında epiBL uygulamalı kotiledon ve hipokotil eksplantlarının rejenere üzerine başarısına baktığımızda hipokotil eksplantının sürgün organogenezisine yanıt verdiği, oysa kotiledon eksplantının sürgün organogenezisine yanıt vermediği belirlenmiştir.

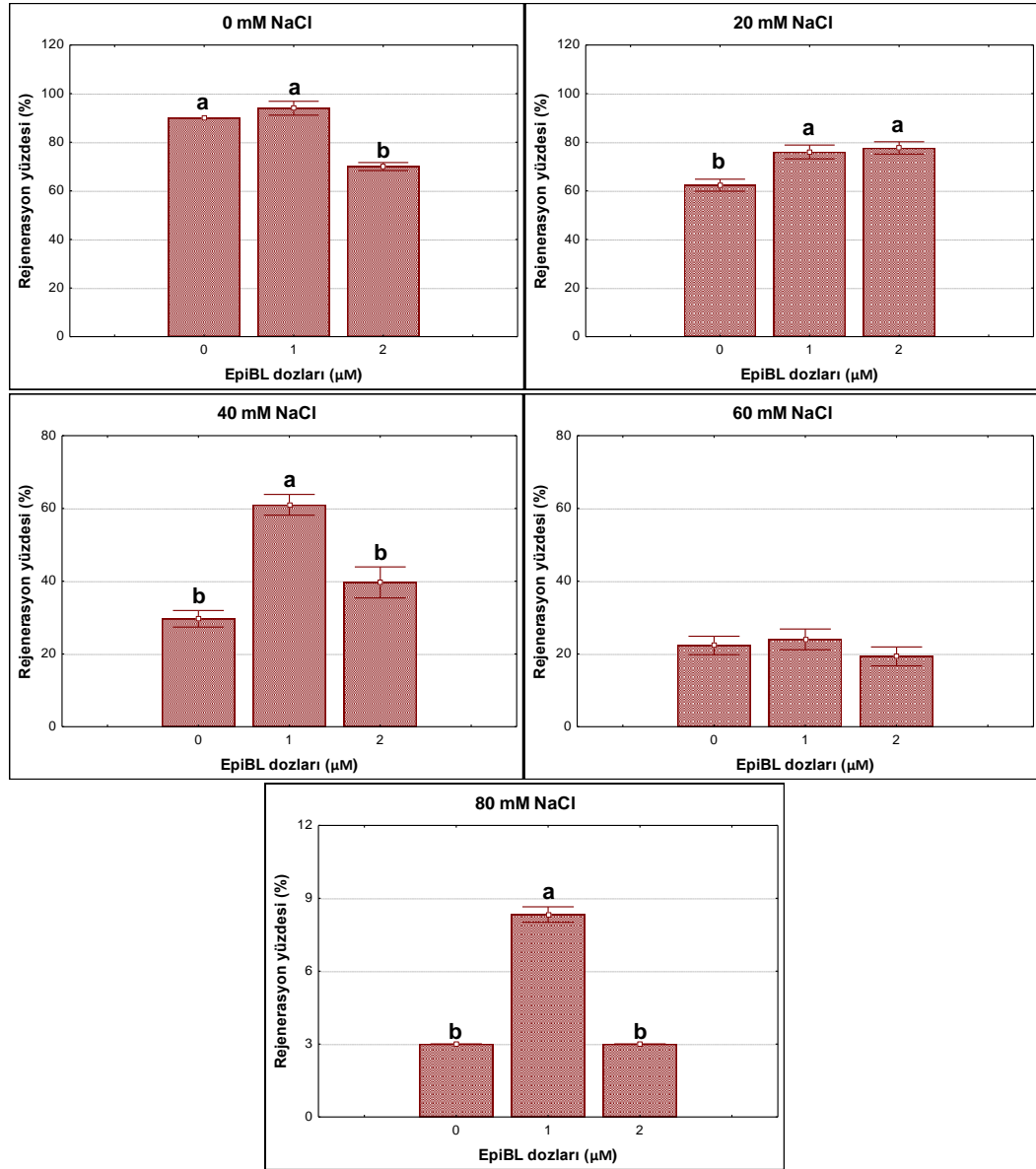
EpiBL uygulamasız ve uygulamalı hipokotil eksplantlarının artan tuz dozlarını içeren MS ortamındaki 30 günlük kültürlerinin sonunda rejenere gözlenen eksplantlarda gözle göremediğimiz ancak sürgün gelişiminin olabileceği düşünülen doku örneklerinde, SEM (Scanning Elektron Mikroskobu) incelemesi yapılmıştır. SEM incelemesi sonucunda rejenere sürgünleri veren organogenik kallus bölgesi (Şekil 3.28. a), rejenereyle oluşan adventif sürgünlerin yaprak primordiasının oluşumu (Şekil 3.28. b), tam oluşmuş yaprak primordiaları (Şekil 3.28. c ve d) ve yaprak primordialarının arasındaki meristematik bölge (Şekil 3.28. e) gözlenmiştir.



**Şekil 3.28.** Artan tuz dozlarını içeren MS ortamında kültüre alınan epiBL uygulamasız ve uygulamalı hipokotil eksplantlarından 30 gün sonra gözlenen rejenerasyon safhalarının SEM görüntüsü (○ : organogenik kallus ve yaprak primordileri arasındaki meristematik bölgeyi ve → farklı dönemlerdeki yaprak primordialarını göstermektedir; Ölçü çizgisi: 100 µm)

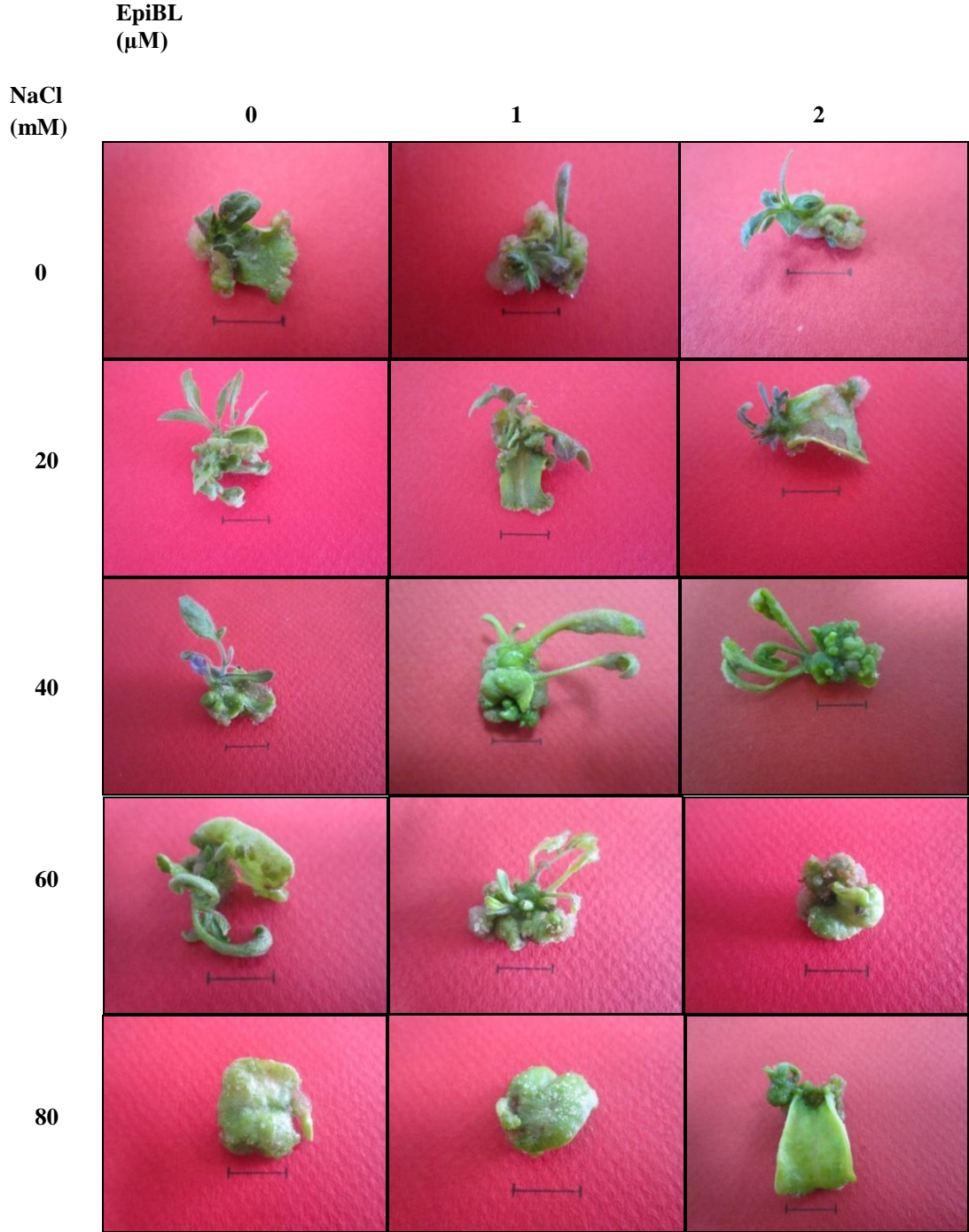
Tuz stresine karşı epiBL'nin in vitro sürgün rejenerasyonu üzerine etkisini değerlendirmek üzere, 2 mg/l BAP içeren MS ortamında kotiledon ve hipokotil eksplantları kültüre alınmıştır. Kotiledon eksplantlarından rejenerasyon yüzdesinin tuzsuz ortam şartlarında yüksek olduğu belirlenmiştir. Tuz dozlarının artışı, rejenerasyon yüzdesini olumsuz şekilde etkilemiştir. Tuzsuz şartlarda ve 1 µM epiBL uygulamalı eksplantlarda en yüksek rejenerasyon belirlenirken (%94), 100 mM tuz dozunda epiBL uygulamasız eksplantlarda rejenerasyon gözlenirken uygulamalı

eksplantlarda hiç rejenerasyon gözlenmemiştir. Tuz stresine karşı epiBL uygulamalarının etkisine baktığımızda, 20 mM tuz stresinde epiBL uygulamalarının rejenerasyon yüzdesini arttırması istatistiksel olarak önemi farklılık oluşturmuştur. 40 mM tuz dozunda epiBL uygulamaları rejenerasyonu arttırmış bunlardan 1  $\mu$ M epiBL uygulamasının etkisi istatistiksel olarak anlamlıdır. 60 mM tuz dozunda epiBL'nin etkisi görülmezken, 80 mM tuz dozunda 1  $\mu$ M epiBL uygulaması istatistiksel olarak önemli farklılık oluşturmuştur (Şekil 3.29.), (Şekil 3.30.).



Şekil 3.29. BAP ilaveli MS ortamında kültüre alınan epiBL uygulamasız ve uygulamalı kotiledon eksplantlarında rejenerasyon yüzdesi (%)

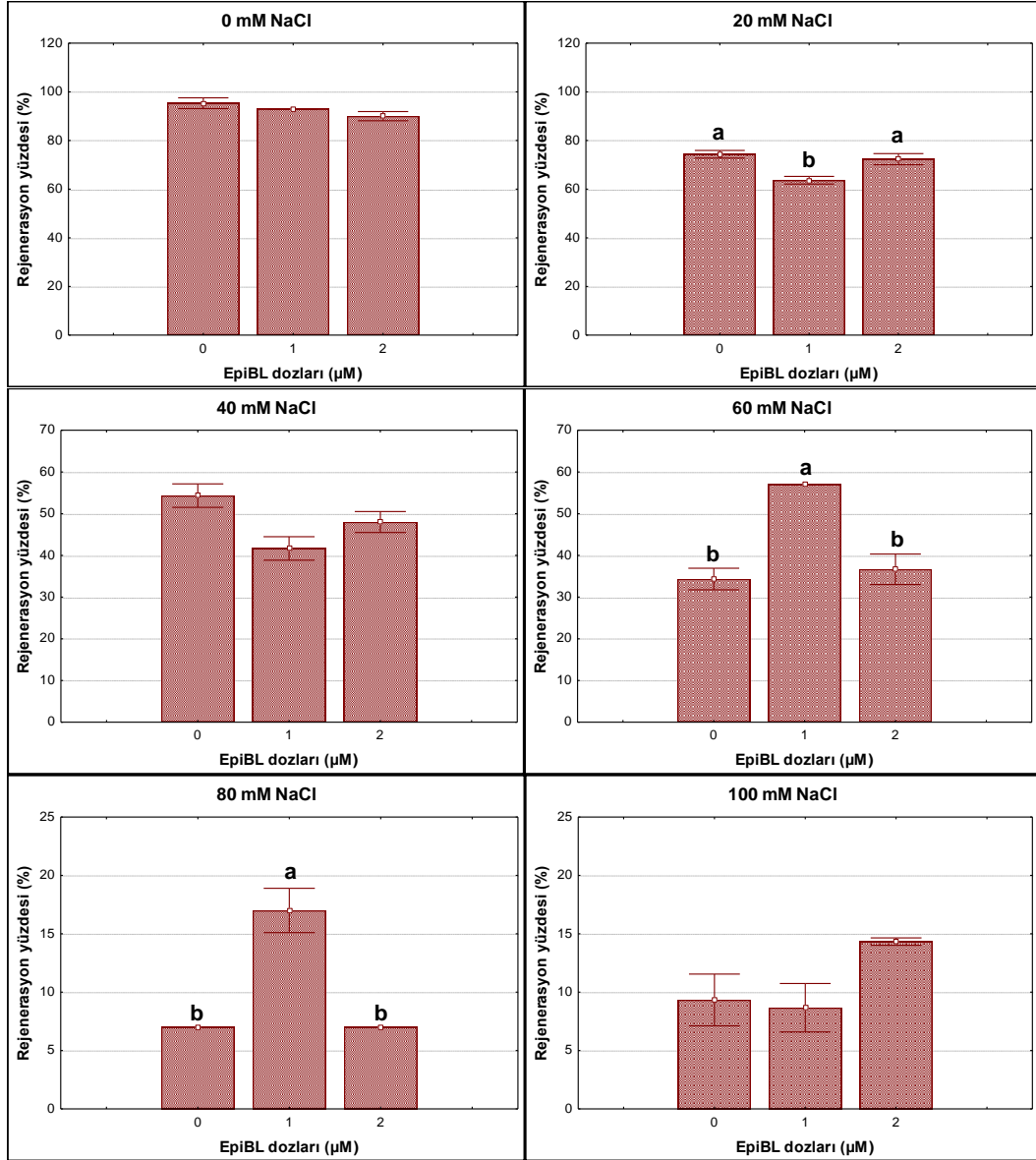




Şekil 3.30. EpiBL uygulamasız ve uygulamalı kotiledon eksplantlarının 2 mg/l BAP ilaveli MS ortamında kültürlerinde 30 gün sonraki rejenerasyon durumları (Ölçü çizgisi: 1 cm)

EpiBL uygulamasız hipokotil eksplantlarının BAP ilaveli MS ortamında rejenerasyon yüzdesi, tuz stresinin artışına bağlı olarak tedrici bir azalma göstermiştir. EpiBL uygulamasız eksplantlardan tuzsuz ortamda %96 rejenerasyon gözlenirken 20 mM tuz dozunda %76, 40 mM'da %54, 60 mM'da %34, 80 mM'da %7 ve 100 mM'da %10 rejenerasyon belirlenmiştir. Kotiledon eksplantında ise

kontrolden en yüksek tuz dozunda kadar %90, %62, %30, %22, %3 ve %3 rejenerasyon tespit edilmiştir. Hipokotil eksplantında tüm tuz dozları için rejenerasyon yüzdesinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Her iki eksplanta orta tuz dozları rejenerasyonu düşürmüş, yüksek tuz dozlarında bu düşüş çok daha fazla olmuştur. Tuzsuz, düşük ve orta dereceli tuz içeren ortamlarda yapraklara sahip adventif sürgünler gözlenirken, en yüksek tuz dozunda (100 mM) yapraklı sürgün oluşumu ve gelişiminin olumsuz etkilendiği belirlenmiştir. Mercado vd. (2000), Pera ve HF çeşidinde yaprak disk eksplantlarını 17.8  $\mu$ M BAP+5.7  $\mu$ M IAA ilaveli MS ortamında kültüre alıp 1.3  $\mu$ M BAP'lı MS ortamında alt kültüre aldıktan sonra 0, 43, 86, 129, 172 ve 256 mM NaCl tuzuna maruz bırakmışlardır. Tuzsuz şartlarda her iki çeşitte, bizim çalışmamızdaki sonuçlara benzer şekilde %90 rejenerasyon tespit etmişlerdir. 86 mM tuz dozuna kadar Pera çeşidinde rejenerasyon çok etkilenebilirken, HF çeşidinde rejenerasyon %73 düşüş göstermiştir. 129 mM NaCl'de her iki çeşitte rejenerasyon %30'a inmiş ve 172 ve 256 mM tuz dozlarında rejenerasyon gözlenmemiştir. Sonuçlar bize tuz stresinin artışı ile domates çeşidi, genotipi ve eksplant tipine bağlı olarak rejenerasyonun değişebileceğini göstermektedir. Benderradji vd. (2012), iki buğday çeşidinde (MD ve HD1220) embriyo kültürünü kullanarak tuz stresinin kallus indüksiyonu ve proliferasyonu ile rejenerasyon etkinliğini değerlendirmişlerdir. Araştırmacılar tuz stresi altında MD çeşidinin kallus indüksiyonu, kallusların sürgüne proliferasyonu ve sürgün rejenerasyonu üzerine daha iyi sonuç verdiğini belirlemişlerdir. Çalışmamızda tuzsuz ortamda rejenerasyon yüzdesi yüksek iken (%96) epiBL uygulaması ile hafif azalma göstermiştir. 20 mM ve 40 mM tuz dozlarında epiBL uygulaması ile rejenerasyon yüzdesi azalmıştır. 60 mM tuz dozunda her iki epiBL uygulaması ile rejenerasyon artmış ve 1  $\mu$ M epiBL etkisi ile rejenerasyon yüzdesindeki artış istatistiksel olarak anlamlı olmuştur. 80 mM tuz dozunda 1  $\mu$ M epiBL uygulaması rejenerasyon yüzdesini arttırmış ve istatistiksel olarak önemli farklılık oluşturmuştur. 100 mM tuz dozunda ise 2  $\mu$ M epiBL uygulaması yüzdeyi attırsa da istatistiksel olarak anlamlı artış olmamıştır (Şekil 3.31.), (Şekil 3.32.)



Şekil 3.31. BAP ilaveli MS ortamında kültüre alınan epiBL uygulamalı hipokotil eksplantlarında rejenerasyon yüzdesi (%)



Şekil 3.32. EpiBL uygulamasız ve uygulamalı hipokotil eksplantlarının 2 mg/l BAP ilaveli MS ortamında 30 gün sonraki rejenerasyon durumları (Ölçü çizgisi: 1 cm)

2 mg/l BAP ilaveli MS ortamında bulunan tuz dozlarına göre rejenerasyon yüzdesi üzerine eksplant tipinin, epiBL dozlarının ve eksplant tipi x epiBL dozları interaksyonu istatistiki olarak değerlendirilmiştir. 60, 80 ve 100 mM tuz dozlarında kullanılan eksplant tipinin rejenerasyon yüzdesi üzerine etkisi istatistiksel olarak önemli olmuştur. EpiBL uygulaması, 100 mM tuz dozu hariç diğer tüm tuz dozlarında istatistiksel olarak önemli farklılık oluşturmuştur. Eksplant tipi x epiBL dozları interaksyonu, 20, 40, 60 ve 100 mM tuz dozlarında istatistiksel olarak önemli farklılık oluşturmuştur (Çizelge 3.47.)

**Çizelge 3.47. Tuz dozlarına göre rejenerasyon yüzdesi üzerine eksplant tipi, epiBL dozları ve eksplant tipi x epiBL dozları interaksyonunun etkisi**

Tuz Dozları (mM)	Eksplant Tipi	EpiBL Dozları	Eksplant Tipi x EpiBL Dozları
0	ns	P=0.0271	ns
20	ns	P=0.0393	P=0.0007
40	ns	P=0.0272	P<0.0001
60	P<0.0001	P=0.0004	P=0.0043
80	P<0.0001	P<0.0001	ns
100	P<0.0001	ns	P=0.0276

Rejenerasyon yüzdesi yanında oluşan rejenere sürgünlerin sayısı, boyu ve sürgündeki yaprak sayısı belirlenmiştir. EpiBL uygulamasız kotiledon eksplantlarında eksplant başına düşen rejenere sürgün sayısı 40 mM tuz dozuna kadar birbirine yakın iken 60 mM tuz dozundan itibaren azalış kendini göstermiştir. Eksplant başına en yüksek sürgün sayısı 80 mM tuz dozunda 2 µM epiBL uygulamalı eksplantlarda tespit edilmiştir (11.00 adet/eksplant). 80 mM ve 100 mM tuz dozlarında epiBL uygulamasızlarda rejenere sürgün sayısı çok düşmüş (1.00 adet/eksplant) ve 100 mM tuz dozunda epiBL uygulamalılarda rejenerasyon hiç görülmemiştir. Mohamed vd. (2011), Pearl ve Beril domates çeşitlerine ait steril fidelerin kotiledon ve hipokotil eksplantlarını 2 mg/l BAP ve 0, 25, 50, 75 mM NaCl ilaveli MS ortamında kültüre almışlardır ve kültürde 8 hafta sonrasında sürgün sayısının azaldığını tespit etmişlerdir. Yapılan çalışmada kontrolden en yüksek tuz dozuna kadar sürgün sayısı 3.12 den 1.1'e kadar düşmüştür ve kontrole göre düşüş yüzdesi, 25, 50, 75 mM tuzda sırası ile %25, %47 ve %65 olmuştur. Oysa bizim çalışmamızda sürgün sayısı kontrolde 100 mM'a tuz stresine kadar 8.14'den 1.00'e düşmüştür. Sonuçlar, tuz stresinin sürgün organogenezisini olumsuz etkilemesi hususunda birbiri ile

uyumludur ancak, tuz stresi altında bizim kullandığımız çeşidin sürgün organogenezisine daha iyi yanıt verdiği ortaya çıkmıştır. Araştırmacılar kullandıkları çeşitler arasında farklılığın olmadığını ancak, kotiledon eksplantlarının hipokotil eksplantlarına göre daha fazla sürgün ürettiğini belirtmişlerdir. Bizim çalışmamızda ise kotiledon eksplantına göre hipokotil eksplantı, eksplant başına düşen sürgün sayısı üzerine daha iyi sonuç vermiştir. Bu da bize kullanılan çeşit ve eksplant tipinin tuz stresi şartlarında rejenerasyon yüzdesi ve rejenere sürgün sayısı üzerine farklılık oluşturabileceğini göstermektedir. Çalışmamızda tuz stresine karşı kullandığımız epiBL uygulamalarının etkisine baktığımızda sadece 80 mM tuz dozunda 2 µM epiBL uygulamasının sürgün sayısına etkisi istatistiksel olarak anlamlı olmuştur. Diğer tuz dozlarında anlamlı etki gözlenmemiştir (Çizelge 3.48.).

**Çizelge 3.48. BAP ilaveli MS ortamında epiBL uygulamasız ve uygulamalı kotiledon eksplantlarından rejenere olan sürgünlerin sayısı (adet/eksplant)**

EpiBL Dozları (µM)	Tuz Dozları (mM)					
	0	20	40	60	80	100
0	8.14±1.32	9.17±1.79	8.27±2.28	5.87±2.25	1.00±0.00 <sup>b</sup>	1.00±0.00
1	7.80±1.18	9.08±1.45	5.54±1.29	5.37±1.74	2.66±0.33 <sup>b</sup>	0.00±0.00
2	8.00±1.63	8.82±1.49	6.93±2.24	2.87±0.49	11.00±0.57 <sup>a</sup>	0.00±0.00

Değerler, ortalama±standart hatadır. Aynı sütundaki değerler bakımından, harflendirmeler P<0.05'de kontrole göre epiBL dozları arasındaki istatistiksel farklılığı göstermektedir.

BAP ilaveli MS ortamında kültüre alınan epiBL uygulamasız ve epiBL uygulamalı hipokotil eksplantlarından gelişen adventif sürgünlerin sayısı kontrole göre (tuzsuz şartlar) tuz stresinin artışıyla olumsuz etkilenmiş ve 40 mM tuz dozundan itibaren keskin düşüş kendini göstermiştir. Chamandoosti (2007), kanola hipokotil segmentlerinin çeşitli bitki büyüme düzenleyicilerini içeren MS ortamındaki kültürlerinde tuz stresinin etkilerini araştırmışlardır. En iyi adventif sürgün oluşumu 1 mg/l IBA+1 mg/l BAP ilavesinde gözlenmiş ve sürgün sayısının tuzsuz şartlarda 2.25 adet, 68.37 mM tuz dozunda 3.02 adet tespit etmişlerdir Artan tuz stresi adventif sürgün sayısını azaltmış ve 205.12 mM tuz dozundan itibaren rejenerasyon inhibe edilmiştir. Tez çalışmamızda ise tuz stresine karşı epiBL'nin etkisine baktığımızda, 0 mM ve 40 mM tuz dozlarında her iki konsantrasyondaki epiBL kullanımı sürgün sayısını arttırmış ancak istatistiksel farklılık oluşturmamıştır. 60 mM tuz dozunda

her iki epiBL uygulaması sürgün sayısını arttırmış, bunlardan 1 µM epiBL uygulamasının olumlu etkisi istatistiksel olarak anlamlıdır. 80 mM tuz stresinde 2 µM epiBL uygulaması ile 100 mM tuz dozunda her iki epiBL uygulaması sürgün sayısını arttırmış ancak istatistiksel olarak önemli farklılık olmamıştır (Çizelge 3.49).

**Çizelge 3.49. BAP ilaveli MS ortamında epiBL uygulamasız ve uygulamalı hipokotil eksplantlarından rejenere olan sürgünlerin sayısı (adet/eksplant)**

EpiBL Dozları (µM)	Tuz Dozları (mM)					
	0	20	40	60	80	100
0	20.30±2.37	13.50±1.68	6.12±0.95	3.92±0.63 <sup>b</sup>	4.33±1.45	2.50±1.19
1	24.82±2.64	12.79±1.82	7.29±1.52	8.41±1.35 <sup>a</sup>	3.87±1.10	3.25±1.60
2	22.22±2.56	12.75±1.52	7.81±1.38	5.88±0.79 <sup>ab</sup>	9.66±4.97	4.00±1.15

Değerler, ortalama±standart hatadır. Aynı sütundaki değerler bakımından, harflendirmeler P<0.05'de kontrole göre epiBL dozları arasındaki istatistiksel farklılığı göstermektedir.

2 mg/l BAP ilaveli MS ortamında bulunan tuz dozlarına göre rejenerasyonla oluşan adventif sürgün sayısı üzerine eksplant tipinin, epiBL dozlarının ve eksplant tipi x epiBL dozları interaksyonunun istatistiki etkisi değerlendirilmiştir. 0, 20 ve 100 mM tuz dozlarında kullanılan eksplant tipinin adventif sürgün sayısı üzerine etkisi istatistiksel olarak önemli olmuştur. EpiBL uygulaması, sadece 80 mM tuz dozunda istatistiksel olarak önemli farklılık oluşturmuştur. Eksplant tipi x epiBL dozları interaksyonu, hiç bir tuz dozunda istatistiksel olarak önemli farklılık oluşturmamıştır (Çizelge 3.50.).

**Çizelge 3.50. Tuz dozlarına göre rejenere sürgün sayısı üzerine eksplant tipi, epiBL dozları ve eksplant tipi x epiBL dozları interaksyonunun etkisi**

Tuz Dozları (mM)	Eksplant Tipi	EpiBL Dozları	Eksplant Tipi x EpiBL Dozları
0	P<0.0001	ns	ns
20	P=0.0034	ns	ns
40	ns	ns	ns
60	ns	ns	ns
80	ns	P=0.0028	ns
100	P=0.0171	ns	ns

EpiBL uygulamasız kotiledon eksplantlarından rejenere olan sürgünlerin boyu kontrole göre artan tuz stresinin etkisi ile artış göstermiş ancak 100 mM tuz dozunda

rejenere sürgünler çok küçük olduğundan (<0.5 mm) adventif sürgün boyu ölçülemedi. Mohamed vd. (2011), Pearl ve Beril domates çeşitlerinde ortamdaki tuz stresinin artışı ile sürgün boyunun azaldığını bulmuşlardır. Sürgün boyu, kontrolde 3.61 cm iken 75 mM tuz dozunda 0.56 cm'e inmiştir. Sürgün boyundaki düşüş yüzdesi, 25, 50, 75 mM tuz dozlarında %38, %67 ve %85 olmuştur. Araştırmacılar sürgün boyu üzerine Beril çeşidinin ve kotiledon eksplantlarının farklılık oluşturduğunu belirlemişlerdir. Bizim sonuçlarımıza baktığımızda 100 mM tuz dozu hariç sürgün boyu tuz stresinden fazla etkilenmemiştir. Kullandığımız çeşidin kotiledon eksplantlarından oluşan adventif sürgünlerin boyunun, diğer çalışmalarda gözlenen sürgün boyundan daha düşük olduğu belirlenmiştir. Bu da bize çeşit farklılığını göstermiştir. Çalışmamızda tuz stresi altında, epiBL uygulaması yapılmış kotiledon eksplantlarından rejenere olan sürgünlerin boyu üzerine epiBL'nin etkisi istatistiki olarak değerlendirilmiş ve anlamlı fark ortaya çıkmamıştır (Çizelge 3.51.).

**Çizelge 3.51. BAP ilaveli MS ortamında epiBL uygulamasız ve uygulamalı kotiledon eksplantlarından rejenere olan sürgünlerin boyu (mm)**

EpiBL Dozları (µM)	Tuz Dozları (mM)					
	0	20	40	60	80	100
0	4.73±0.32	7.45±0.54	9.89±1.05 <sup>a</sup>	7.53±1.67	6.00±0.00 <sup>a</sup>	0.00±0.00
1	4.13±0.34	6.45±0.76	6.00±0.73 <sup>b</sup>	5.57±1.04	1.00±0.00 <sup>b</sup>	0.00±0.00
2	4.81±0.44	6.49±0.51	7.27±0.94 <sup>ab</sup>	1.00±0.00	4.66±0.66 <sup>a</sup>	0.00±0.00

Değerler, ortalama±standart hatadır. Aynı sütundaki değerler bakımından, harflendirmeler P<0.05'de kontrole göre epiBL dozları arasındaki istatistiksel farklılığı göstermektedir.

Hipokotil eksplantlarından rejenerasyonla oluşan adventif sürgünlerin boyu, epiBL uygulamasız ve epiBL uygulamalı ortamlarda kontrole göre (tuzsuz ortam) tuz stresi şartlarında daha yüksek olmuştur. Bu durum kotiledon eksplantlarından rejenere olan adventif sürgün boyuna benzerdir. Tuz stresine karşı epiBL'nin etkisini değerlendirdiğimizde, tuz stresine karşı epiBL uygulamalarının olumlu etkisi sadece 100 mM tuz dozunda 1 µM epiBL uygulamasında görülmüş ve artış istatistiksel olarak anlamlı olmuştur (Çizelge 3.52.).



**Çizelge 3.52. BAP ilaveli MS ortamında epiBL uygulamasız ve uygulamalı hipokotil eksplantlarından rejenere olan sürgünlerin boyu (mm)**

EpiBL Dozları (µM)	Tuz Dozları (mM)					
	0	20	40	60	80	100
0	3.29±0.09	6.84±0.31	9.07±0.72	8.22±0.97 <sup>a</sup>	10.00±2.51	3.50±0.95 <sup>b</sup>
1	3.18±0.09	7.77±0.47	7.10±0.79	8.22±0.70 <sup>a</sup>	8.92±1.86	8.33±2.33 <sup>a</sup>
2	3.37±0.11	7.17±0.40	9.47±0.73	5.69±0.59 <sup>b</sup>	5.00±0.57	3.90±0.73 <sup>b</sup>

Değerler, ortalama±standart hatadır. Aynı sütundaki değerler bakımından, harflendirmeler P<0.05'de kontrole göre epiBL dozları arasındaki istatistiksel farklılığı göstermektedir.

2 mg/l BAP ilaveli MS ortamında bulunan tuz dozlarına göre rejenerasyonla oluşan adventif sürgün boyu üzerine eksplant tipinin, epiBL dozlarının ve hem eksplant tipi hem de epiBL dozlarının kombine etkisinin olup olmadığı değerlendirilmiştir. 0, 60 ve 100 mM tuz dozlarında kullanılan eksplant tipinin adventif sürgün boyu üzerine etkisi istatistiksel olarak önemli olmuştur. EpiBL uygulaması, sadece 40 ve 60 mM tuz dozlarında istatistiksel olarak önemli farklılık oluşturmuştur. Eksplant tipi x epiBL dozları interaksyonu, hiç bir tuz dozunda istatistiksel olarak önemli farklılık oluşturmamıştır (Çizelge 3.53.).

**Çizelge 3.53. Tuz dozlarına göre sürgün boyu üzerine eksplant tipi, epiBL dozları ve eksplant tipi x epiBL dozları interaksyonunun etkisi**

Tuz Dozları (mM)	Eksplant Tipi	EpiBL Dozları	Eksplant Tipi x EpiBL Dozları
0	P<0.0001	ns	ns
20	ns	ns	ns
40	ns	P=0.0034	ns
60	P=0.0315	P=0.0304	ns
80	ns	ns	ns
100	P<0.0001	ns	ns

EpiBL uygulamasız ve uygulamalı kotiledon eksplantlarından gelişen rejenere sürgünlerin yaprak sayıları birbirine yakın olup tuz stresine karşı epiBL uygulamasının rejenere sürgünlerin yaprak sayısı üzerine etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır (Çizelge 3.54.).

**Çizelge 3.54. BAP ilaveli MS ortamında epiBL uygulamasız ve uygulamalı kotiledon eksplantlarından rejenere olan sürgünlerin yaprak sayısı (adet)**

EpiBL Dozları ( $\mu\text{M}$ )	Tuz Dozları (mM)					
	0	20	40	60	80	100
0	1.14 $\pm$ 0.02	1.18 $\pm$ 0.03	1.17 $\pm$ 0.05	1.23 $\pm$ 0.12	1.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00
1	1.08 $\pm$ 0.02	1.12 $\pm$ 0.03	1.22 $\pm$ 0.08	1.36 $\pm$ 0.13	1.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00
2	1.16 $\pm$ 0.04	1.16 $\pm$ 0.03	1.24 $\pm$ 0.08	1.00 $\pm$ 0.00	1.33 $\pm$ 0.33	0.00 $\pm$ 0.00

Değerler, ortalama $\pm$ standart hatadır. Aynı sütundaki değerler bakımından, harflendirmeler P<0.05'de kontrole göre epiBL dozları arasındaki istatistiksel farklılığı göstermektedir.

Rejenerasyonla ilgili olarak hipokotil eksplantlarından gelişen adventif sürgünlerin yaprak sayısı büyük farklılıklar göstermemiştir. EpiBL uygulamasız ve uygulamalılarda, artan tuz dozlarına göre sürgün yaprak sayısı çok az yükselmiş ve en yüksek tuz dozunda azalma göstermiştir. Tuz stresine karşı epiBL kullanımının sonucunda; Tuzsuz ortamda 2  $\mu\text{M}$  epiBL kullanımının yaprak sayısını artırması istatistiksel olarak önemli olmuştur. 20 mM tuz stresinde epiBL kullanımı ile adventif sürgünlerin ortalama yaprak sayısı artmış, bunlardan 2  $\mu\text{M}$  epiBL uygulaması istatistiksel olarak önemlidir. Diğer tuz dozlarında epiBL'nin istatistiksel olarak anlamlı olmamıştır (Çizelge 3.55).

**Çizelge 3.55. BAP ilaveli MS ortamında epiBL uygulamasız ve uygulamalı hipokotil eksplantlarından rejenere olan sürgünlerin yaprak sayısı (adet)**

EpiBL Dozları ( $\mu\text{M}$ )	Tuz Dozları (mM)					
	0	20	40	60	80	100
0	1.01 $\pm$ 0.004 <sup>b</sup>	1.10 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	1.26 $\pm$ 0.05	1.20 $\pm$ 0.07	1.33 $\pm$ 0.33	1.00 $\pm$ 0.00
1	1.01 $\pm$ 0.004 <sup>b</sup>	1.19 $\pm$ 0.04 <sup>ab</sup>	1.25 $\pm$ 0.08	1.37 $\pm$ 0.08	1.07 $\pm$ 0.07	1.00 $\pm$ 0.00
2	1.08 $\pm$ 0.013 <sup>a</sup>	1.25 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	1.17 $\pm$ 0.05	1.38 $\pm$ 0.09	1.33 $\pm$ 0.21	1.11 $\pm$ 0.11

Değerler, ortalama $\pm$ standart hatadır. Aynı sütundaki değerler bakımından, harflendirmeler P<0.05'de kontrole göre epiBL dozları arasındaki istatistiksel farklılığı göstermektedir.

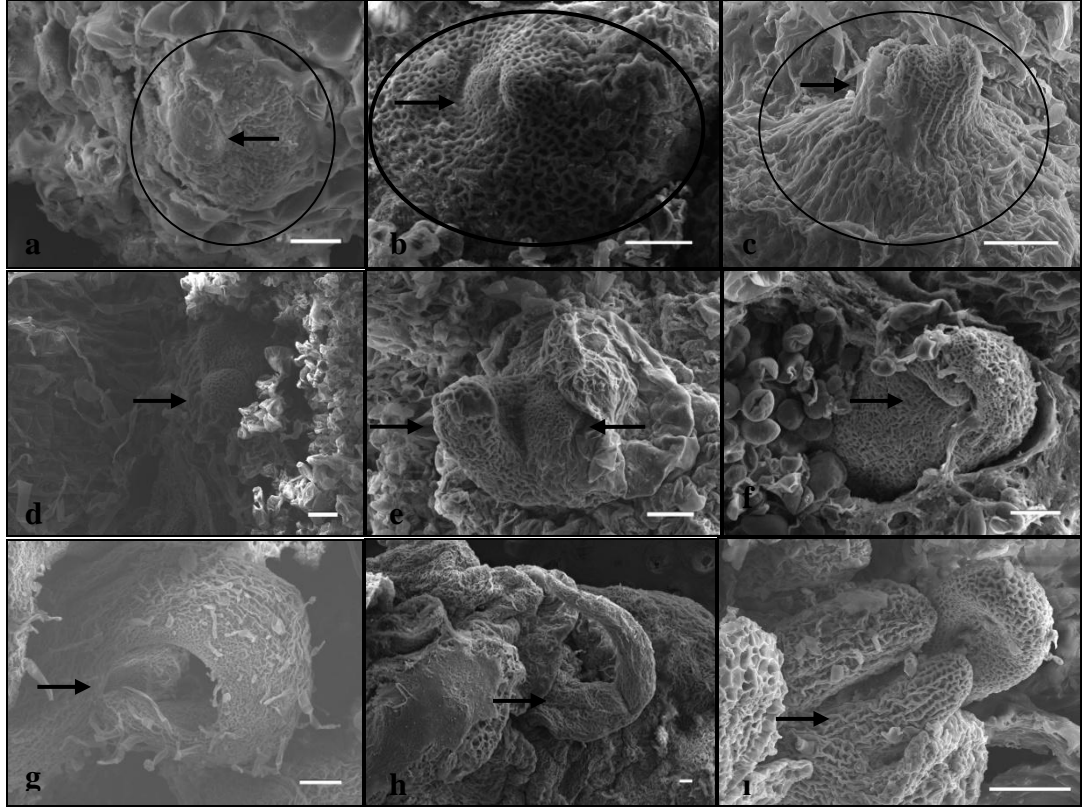
2 mg/l BAP ilaveli MS ortamında bulunan tuz dozlarına göre rejenerasyon sonucu oluşan adventif sürgündeki yaprak sayısı üzerine eksplant tipinin, epiBL dozlarının ve eksplant tipi x epiBL dozları interaksyonunun etkisi değerlendirilmiştir. 0 ve 100 mM tuz dozlarında kullanılan eksplant tipinin adventif sürgündeki yaprak sayısı üzerine etkisi, istatistiksel olarak önemli olmuştur. EpiBL uygulaması, sadece tuzsuz

ortamda istatistiksel olarak önemli farklılık oluşturmuştur. Eksplant tipi x epiBL dozları ise, sadece 20 mM tuz dozunda istatistiksel olarak önemli farklılık oluşturmuştur (Çizelge 3.56.).

**Çizelge 3.56. Tuz dozlarına göre sürgündeki yaprak sayısı üzerine eksplant tipi, epiBL dozları ve eksplant tipi x epiBL dozları interaksiyonunun etkisi**

Tuz Dozları (mM)	Eksplant Tipi	EpiBL Dozları	Eksplant Tipi x EpiBL Dozları
0	P<0.0001	P<0.0001	ns
20	ns	ns	P=0.0330
40	ns	ns	ns
60	ns	ns	ns
80	ns	ns	ns
100	P<0.0001	ns	ns

EpiBL uygulamasız ve uygulamalı hipokotil eksplantlarının artan tuz dozlarını ve BAP bitki büyüme düzenleyicisini içeren MS ortamındaki 30 günlük kültürlerinin sonunda reejenerasyon gözlenen eksplantlarda alınan doku örneklerinde, SEM incelemesi yapılmıştır. SEM incelemesi sonucunda kallus kitleleri arasında rejenere sürgünleri oluşturan organogenik kalluslar (Şekil 3.33. a, b ve c), rejenere sürgünlerin aşama aşama oluşumları (Şekil 3.33. a, b ve c), adventif sürgünlerin gelişen ilk yaprak primordisi (Şekil 3.33. d) ve tam oluşmuş yaprak primordiaları (Şekil 3.33. e, f, g, h ve ı) gözlenmiştir.



**Şekil 3.33. Artan tuz dozlarını ve BAP'ı içeren MS ortamında kültüre alınan epiBL uygulamasız ve uygulamalı hipokotil eksplantlarından 30 gün sonra rejenerasyon safhalarının SEM görüntüsü ( ○ : organogenik kallusu ve → farklı dönemlerdeki yaprak primordialarını göstermektedir; Ölçü çizgisi: 100 μm)**

Bitki büyüme düzenleyicisi ilavesiz MS ortamında kotiledon eksplantlarından rejenerasyon hiç gözlenmezken hipokotil eksplantlarının rejenerasyon frekansı düşük kalmıştır. Bunlara karşılık olarak, rejenerasyon üzerine 40 mM tuz dozunda 1 μM epiBL; rejenere sürgün sayısı üzerine 60 mM tuz dozunda 2 μM epiBL ve sürgün boyu üzerine 20 mM tuz dozunda 2 μM epiBL uygulamasının önemli etkisi belirlenmiştir. Oysa MS ortamına eklenen 2 mg/l BAP ilavesi öncelikle kotiledon eksplantlarında rejenerasyonun oluşumunu sağlamıştır. BAP, hem kotiledon hem de hipokotil eksplantlarında rejenerasyon frekansını arttırmış ve tuz stresine karşı epiBL'nin etkisinin her iki eksplantta da değerlendirilmesine olanak tanımıştır. Hipokotil eksplantı kotiledon eksplantına nazaran rejenerasyon yüzdesi ve rejenere sürgün sayısı bakımından daha iyi sonuç vermiştir.

## 4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tuzluluğa orta derecede toleranslı olan ve tarımsal öneme sahip domateste in vitro tuz stresine karşı epiBL'nin etkisi in vitro kültürler ile değerlendirilmiştir. M-28 domates çeşidinde NaCl içeren ortamda tohum çimlendirme, kallus kültürleri, sürgün rejenerasyonu ve sürgün ucu kültürleri yapılmıştır. Diğer pek çok bitki türünde belirtildiği gibi domateste düşük tuz stresi, tohum çimlenmesini ve bitki gelişimini indüklemektedir. Ancak, tuz stresinin artışına bağlı olarak bitki gelişimi olumsuz şekilde etkilenmektedir. Çimlenme ve gelişimi inhibe edici tuz dozları bitki türü ve genotiplerine bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Çalışmamızda M-28 domates çeşidinde 20 mM tuz dozu genel olarak gelişimi indüklemiştir. 40 mM ve 60 mM NaCl'nin olumsuz etkisi gözlenmiş, 80 mM ve 100 mM gibi yüksek tuz dozlarında araştırılan tüm parametrelerde olumsuz etki açık bir şekilde görülmüştür.

Çalışmamızda son yıllarda abiyotik stres faktörlerine karşı bitki toleransını arttırdığı belirtilen BR'lerden olan epiBL'nin etkisi araştırılmıştır. Tuz stresine karşı epiBL'nin etkisi ilk tohum çimlenmesinde irdelenmiştir. EpiBL uygulaması kültür öncesi tohumlara uzun süreli (24 saat) ve kısa süreli (10 saniye) yapılmıştır ve uygulamalı tohumlar artan dozlarda NaCl içeren semi-solid ½ MS ortamında kültüre alınmıştır. Petri kabında filtre kağıdı üzerinde yapılan çimlendirme çalışmasında M-28 domates hibrit çeşidi için 150 mM tuz dozu çok yüksek bulunduğu için tüm çalışmalarda maksimum tuz dozu 100 mM olmuştur. Kültür öncesi tohumlara uzun süreli epiBL uygulamasının tuz stresine karşı olumlu bir etkisi gözlenmemiş, kısa süreli uygulamada ise çimlenme ve bitki gelişimi bakımından olumlu sonuçlar alınmıştır. 40, 80 ve 100 mM tuz dozlarına karşı tohumlara kısa süre 1 ve 2 µM epiBL uygulaması çimlenme yüzdesini arttırmıştır. Kültürden gelişen 17 günlük bitkilerin boyu, yaş ağırlığı, kuru ağırlığı, yaprak sayısı ve kök gelişimi üzerine farklı tuz dozlarına karşı epiBL uygulamalarının iyileştirici etkisi belirlenmiştir. Tuz stresine karşı tohumu uygun dozlarda kısa süreli epiBL uygulaması önerilebilir.

2 mg/l K+0.4 mg/l NAA ilaveli MS ortamında gelişen 12 günlük sürgünlere epiBL uygulaması (1 ve 2 µM) yapılmış ve artan dozlarda NaCl içeren (20, 40, 60, 80, 100 mM) MS ortamında kültüre alınmıştır. 30 günlük kültürde bitkilerin gelişimi tuz stresinden olumsuz etkilenmiştir. Tohum çimlendirme çalışmasına benzer şekilde 20 mM tuz dozu bitki gelişimini olumsuz etkilemezken, 40 ve 60 mM tuz dozlarında bitki gelişimi olumsuz etkilenmiş ve yüksek tuz dozlarında (80 ve 100 mM) gelişimde büyük bir gerileme gözlenmiştir. Tuz stresine karşı kullandığımız ekzojen epiBL'nin iyileştirici etkisinin olduğu belirlenmiştir. Düşük tuz dozunda (20 mM) 2 µM epiBL uygulamasının bitki yaş ve bitki kuru ağırlığı üzerine, 100 mM tuz dozunda aynı epiBL uygulamasının bitki boyu, bitki yaş ve kök kuru ağırlığı üzerine önemli etkisi bulunmuştur. 1 µM epiBL uygulamasının 100 mM tuz stresine karşı bitkilerin klorofil a, klorofil b ve toplam klorofil içeriğini arttırdığı belirlenmiştir. MDA (lipit peroksidasyon ürünü) artan tuz dozu ile artmış, 1 µM epiBL uygulaması MDA içeriğini azaltmıştır. Tuz stresi altında birikimi artan prolin içeriğinin, 40 mM tuz dozunda 1 ve 2 µM epiBL uygulaması ile azalması istatistiksel olarak önemli olmuştur. Toplam çözülebilir protein içeriği tuz stresine bağlı olarak azalmış, 40 mM tuz dozunda 2 µM epiBL uygulaması, çözülebilir protein içeriğinde istatistiksel olarak önemli artışa neden olmuştur. Tuz stresi ile artış gösteren SOD aktivitesi, gerek 1 µM epiBL uygulaması (20, 40, 80 mM NaCl) ve gerekse 2µM epiBL uygulaması (60 ve 100 mM NaCl) ile de artış göstermiştir. POX aktivitesi, 60, 80 ve 100 mM tuz dozlarında 1 ve 2 µM epiBL uygulaması ile önemli olarak artmıştır. Bitki gelişimsel ve biyokimyasal parametreleri sonuçları tuz stresine karşı epiBL uygulamasının bitki toleransını arttırıcı rolünü göstermiştir.

İn vitro kallus kültürü çalışması iki şekilde yapılmış ve ilk olarak 1 mg/l BAP+1 mg/l 2,4-D ilaveli MS ortamında kotiledon ve hipokotil eksplantlarının kültürü ile kallus üretilmiştir. 80 mg'lık kallus kitlesine epiBL uygulanmış ve artan tuz dozlarını içeren MS ortamında (aynı büyüme düzenleyicilerini içeren) alt kültüre alınmıştır. İkinci olarak epiBL uygulaması yapılan kotiledon ve hipokotil eksplantları artan tuz dozlarını ve 1 mg/l BAP+1 mg/l 2,4-D içeren MS ortamında kültüre alınmışlardır. 30 günlük kültür sonrası, kallusların yaş ağırlığı, kuru ağırlığı ve kallus çapı belirlenmiş ve epiBL'nin tuz stresine karşı olumlu etkisi belirlenmiştir. Sonuç olarak tuz stresi altındaki kallus kültürlerinde epiBL'nin etkisinin belirlenmesinde M-28 çeşidi için

eksplanta uygulamaya göre kallusa yapılan epiBL uygulaması daha iyi sonuç vermiş ve kallus kültürlerinde tuz toleransı üzerine epiBL'nin etkisi açık şekilde gözlenmiştir.

Tuz stresi altında sürgün rejenerasyonu ve adventif sürgünlerin gelişimleri (eksplant başına düşen sürgün sayısı, sürgün boyu ve sürgündeki yaprak sayısı) üzerine epiBL'nin etkisi değerlendirilmiştir. 2 mg/l BAP ilaveli MS ortamında yapılan epiBL uygulamalı kotiledon eksplantlarından 20, 40 ve 80 mM tuz stresine karşı 1 µM epiBL uygulamasının, hipokotil eksplantında ise 60 ve 80 mM tuz stresine karşı 1 µM epiBL uygulamasının rejenerasyon yüzdesi üzerine olumlu etkisi belirlenmiştir. Kotiledon eksplantında sadece 80 mM tuz dozunda 2 µM epiBL uygulamasının eksplant başına düşen adventif sürgün sayısı üzerine etkisi olumlu bulunmuştur. Hipokotil eksplantlarında rejenerasyon sürgün sayısı üzerine 60 mM tuz stresine karşı 1 µM epiBL uygulaması, sürgün boyu üzerine 100 mM tuz stresine karşı 1 µM epiBL uygulaması ve sürgündeki yaprak sayısı üzerine 20 mM tuz stresine karşı 2 µM epiBL uygulamasının olumlu etkisi bulunmuştur.

Tüm çalışmalarımızı değerlendirdiğimizde, tuz stresi tohum çimlenmesinde, sürgün ucu kültüründe ve kallus kültürü ile sürgün rejenerasyonu çalışmalarında olumsuz etki göstermiştir. Anti-stres özelliğe sahip olan epiBL'nin tuz stresine karşı olumlu etkisi gözlenmiştir. EpiBL, M-28 domates hibrit çeşidinde tuz toleransını arttırıcı etki göstermiştir.

Tuz stresi ile ilgili olarak çok sayıda in vitro çalışma yapılmış ancak domateste tuz stresine karşı epiBL'nin etkisini belirlemeye yönelik olarak şimdiye kadar herhangi bir in vitro çalışmaya rastlanmamıştır. Tez çalışmamız ile epiBL'nin tuz stresi üzerine olan olumlu etkisi in vitro kültürlerde belirlenmiştir.

## KAYNAKLAR

- Aazami, M.A., Torabi, M. ve Jalili, E. (2010) In vitro response of promising tomato genotypes for tolerance to osmotic stress, *Afr J Biotechnol*, 9 (26): 4014-4017.
- Abu-Khadejeh, A., Makhadmeh, I., Shibli, R.A. ve Mohammed, M.J. (2011) Physiological responses of tomato microshoot cultures to in vitro induced salinity stress, *Jordan J Agr Sci*, 7 (2): 260-272.
- Abu-Shama, M.M., Shibli, R.A., Ereifej, K.I., Makhadmah, İ.M. ve Abed Alrahman, M.A. (2005) Growth and physiological responses of tomato Landrace "Rohaba" (*Lycopersicon esculentum* Mill.) to in vitro induced water deficit, *Jordan J Agr Sci*, 1 (1): 107-118.
- Ahammed, G.J., Zhou, Y.H., Xia, X.J., Mao, W.H., Shi, K. ve Yu, J.Q. (2013) Brassinosteroid regulates secondary metabolism in tomato towards enhanced tolerance to phenanthrene, *Biol Plantarum*, 57 (1): 154-158.
- Akça, Y. ve Samsunlu, E. (2012) The effect of salt stress on growth, chlorophyll content, proline and nutrient accumulation, and K/Na ratio in walnut, *Pakistan J Bot*, 44 (5): 1513-1520.
- Akıncı, I.E. ve Şimşek, M. (2004) Ameliorative effects of potassium and calcium on the salinity stress in embriyo culture of cucumber (*Cucumis sativus* L.), *J Biol Sci*, 4 (3): 361-365.
- Ali, A.A. ve Abdel-Fattah, R.I. (2006) Osmolytes-antioxidant behaviour in *Phaseolus vulgaris* and *Hordeum vulgare* with brassinosteroid under salt stress. *J Agron*, 5 (1): 167-174.
- Ali, Q., Athar, H-U-R. ve Ashraf, M. (2008) Modulation of growth, photosynthetic capacity and water relations in salt stressed wheat plants by exogenously applied 24-epibrassinolide, *Plant Growth Regul*, 56: 107-116.
- Aly, A.A., Khafaga, A.F. ve Omar, G.N. (2012) Adverse effect of salt stress in Egyptian clover (*Trifolium alexandrinum* L.) by Asa application through some biochemical and RT-PCR markers, *Journal of Applied Phytotechnology in Environmental Sanitation*, 1 (2): 91-102.
- Amini, F. ve Ehsanpour, A.A. (2005) Soluble proteins, proline, carbohydrates and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> changes in two tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cultivars under in vitro salt stress, *Am J Biochem & Biotech*, 1 (4): 204-208.
- Amini, F. ve Ehsanpour, A.A. (2006) Responce of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cultivars to MS, water agar and salt stress in in vitro culture, *Asian J Plant Sci*, 9 (1): 170-175.



- Anuradha, S. ve Rao, S.S.R. (2001) Effect of brassinosteroids on salinity stress induced inhibition of seed germination and seedling growth of rice (*Oryza sativa* L.), *Plant Growth Regul*, 33: 151-153.
- Anuradha, S. ve Rao, S.S.R. (2003) Application of brassinosteroids to rice seeds (*Oryza sativa* L.) reduced the impact of salt stress on growth, prevented photosynthetic pigment loss and increased nitrate reductase activity, *Plant Growth Regul*, 40: 29-32.
- Anuradha, S. ve Rao, S.S.R. (2007) The effect of brassinosteroids on radish (*Raphanus sativus* L.) seedlings growing under cadmium stress, *Plant Soil Environ*, 11: 465-472.
- Arora, N., Bhardwaj, R., Sharma, P. ve Arora, H.K. (2008) 28-Homobrassinolide alleviates oxidative stress in salt-treated maize (*Zea mays* L.) plants, *Braz J Plant Physiol*, 20 (2): 153-157.
- Ashraf, M. (2004) Some important physiological selection criteria for salt tolerance in plants, *Flora*, 199: 361-376.
- Ashraf, M. (2009) Biotechnological approach of improving plant salt tolerance using antioxidants as markers, *Biotechnol Adv*, 27: 84-93.
- Ashraf, M., Akram, N.A., Arteca, R.N. ve Foolad, M.R. (2010) The physiological, biochemical and molecular roles of brassinosteroids and salicylic acid in plant processes and salt tolerance, *Crit Rev Plant Sci*, 29: 162-190.
- Ashraf, M. ve Foolad, M.R. (2007) Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance, *Environ Exp Bot*, 59: 206-216.
- Ashraf, M. ve Harris, P.J.C. (2004) Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants, *Plant Sci*, 166: 3-16.
- Avcu, S., Akhoundnejad, Y. ve Daşgan, H.Y. (2013) Domateste tuz stresi üzerine selenyum ve silikon uygulamalarının etkileri, *TABAD*, 6 (1): 183-188.
- Aydın, Y., Talas-Oğras, T., Ipekçi-Altas, Z. ve Gözükırmızı, N. (2006) Effects of brassinosteroid on cotton regeneration via somatic embryogenesis, *Biologia*, 61 (3): 289-293.
- Aydın, Y., Talas-Oğraş, T., Altınkut, A., İsmailoğlu, I., Arıcan, E. ve Gözükırmızı, N. (2010) Cytohistological studies during cotton somatic embryogenesis with brassinosteroid application, *IUFS J Biol*, 69 (1): 33-39.

- Azpeitia, A., Chan, J.L., Saenz, L. ve Oropeza, C. (2003) Effect of 22(S), 23(S)-homobrassinolide on somatic embryogenesis in plumula explants of *Cocos nucifera* (L.) cultured in vitro, *J Horti Sci Biotech*, 78 (5): 591-596.
- Babaoğlu, M., Yorgancılar, M., Akbudak, M.A., 2001. *Doku kültürü: temel laboratuvar teknikleri*, Bölüm 1, s.1-35. *Bitki Biyoteknolojisi, Doku Kültürü ve Uygulamaları*, Eds. Babaoğlu, M., Gürel, E., Özcan, S., Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları, Konya, 374 s.
- Bajguz, A. (2000) Blockade of heavy metals accumulation in *Chlorella vulgaris* cells by 24-epibrassinolide, *Plant Physiol Bioch*, 38: 797-801.
- Bajguz, A. (2007) Metabolism of brassinosteroids in plants, *Plant Physiol Bioch*, 45: 95-107.
- Bajguz, A. ve Hayat, S. (2009) Effects of brassinosteroids on the plant responses to environmental stresses, *Plant Physiol Bioch*, 47: 1-8.
- Baran, A. ve Doğan, M. (2014) Tuz stresi uygulanan soyada (*Glycine max* L.) salisilik asidin fizyolojik etkisi, *SDÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 18 (1): 78-84.
- Bartwal, A., Mall, R., Lohani, P., Guru, S.K. ve Arora, S. (2013) Role of secondary metabolites and brassinosteroids in plant defense against environmental stresses, *J Plant Growth Regul*, 32: 216-232.
- Bates, L.S., Waldren, R.P. ve Teare, I.D. (1973) Rapid determination of free proline for water stress studies, *Plant Soil*, 39: 205-207.
- Beaucamp, C. ve Fridovich, I. (1971) Superoxide dismutase improved assays and an assay applicable to acrylamide gels, *Anal Biochem*, 44: 276-287.
- Behnamnia, M., Kalantari, M. ve Rezanejad, F. (2009) Exogenous application of brassinosteroid alleviates drought-induced oxidative stress in *Lycopersicon esculentum* L., *Gen Appl Plant Physiol*, 35 (1-2): 22-34.
- Benderradji, L., Brini, F., Kellou, K., Ykhlef, N., Djekoun, A., Masmoudi, K. ve Bouzerzour, H. (2012) Callus induction, proliferation, and plantlets regeneration of two bread wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes under saline and heat stress conditions, *ISRN Agronomy*, 2012: 1-8.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem*, 72: 248-254.

- Büyük, İ., Soydam-Aydın, S. ve Aras, S. (2012) Bitkilerin stres koşullarına verdiği moleküler cevaplar, *Türk Hij Den Biyol Derg*, 69 (2): 97-110.
- Cano, E.A., Perez-Alfocea, F., Moreno, V., Caro, M. ve Bolarin, M.C. (1998) Evaluation of salt tolerance in cultivated and wild tomato species through in vitro shoot apex culture, *Plant Cell Tiss Org*, 53: 19-26.
- Chamandoosti, F. (2011) Effect of sodium chloride on establishment of callus and organogenesis in *Brassica napus* L., *Pak J Biol Sci*, 10 (21): 3880-3884.
- Chance, B. ve Maehly, C. (1955). Assay of catalase and peroxidases, *Method Enzymol*, 11: 764-775.
- Chinnusamy, V., Schumaker, K. ve Zhu, J.-K. (2004) Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signalling in plants, *J Exp Bot*, 55 (395): 225-236.
- Chinnusamy, V., Jagendorf, A. ve Zhu, J.-K. (2005) Understanding and improving salt tolerance in plants, *Crop Sci*, 45: 437-448.
- Clouse, S.D. (1996) Molecular genetic studies confirm the role of brassinosteroids in plant growth and development, *The Plant Journal*, 10 (1): 1-8.
- Clouse, S.D. (2000) A role for sterols in embryogenesis, *Curr Biol*, 10 (16): 1-4.
- Clouse, S.D. (2003) Recent advances in brassinosteroid research: from molecular mechanisms to practical applications, *J Plant and Growth Regul*, 22 : 273-275.
- Çanakçı, S. ve Munzuroğlu, Ö. (2004) Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) çeliklerinde ağırlık değişimleri, pigment ve protein miktarları üzerine asetilsalisilik asit ve tuz (NaCl) uygulamasının karşılıklı etkileri, *GÜ, Gazi Eğitim Fakültesi Dergisi*, 24 (1): 23-40.
- Çavuşoğlu, K. ve Kabar, K. (2007) The effects of pretreatments of some plant growth regulators on germination and seedling growth of radish seeds under saline conditions, *DPÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 14: 27-36.
- Çolak, G., Keser, Ö. ve Caner, N. (2008) *Lycopersicon esculentum* Mill. ve *Raphanus sativus* L. bitkilerinde çimlenme ve sonrası büyüme aşamalarında Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> tipi tuz stresinin etkileri, *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 24 (1-2): 17-38.
- Çolak, G., Keser, Ö. ve Caner, N. (2011) The effects of NaCl, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> type salt stress some macromorphological parameters about *Lycopersicon esculentum* (tomato) and *Raphanus sativus* (radish) which in first seedling growth period, *Biological Diversity and Conservation*, 4 (2): 29-48.

- Çulha, Ş. ve Çakırlar, H. (2011) Tuzluluğun bitkiler üzerine etkileri ve tuz tolerans mekanizmaları, *AKÜ FEBİD*, 11: 11-34.
- Dhaubhadel, S., Chaudhary, S., Dobinson, K.F. ve Krishna, P. (1999) Treatment with 24-epibrassinolide, a brassinosteroid, increases the basic thermotolerance of *Brassica napus* and tomato seedlings, *Plant Mol Biol*, 40: 333-342.
- Ding, H.-D., Zhu, X.-H., Zhu, Z.-W., Yang, S.-J., Zha, D.-S. ve Wu, X.-X. (2012) Amelioration of salt-induced oxidative stress in eggplant by application of 24-epibrassinolide, *Biol Plantarum*, 56 (4): 767-770.
- Doğan, M., Avu, A., Can, E.N. ve Aktan, A. (2008) Farklı domates tohumlarının çimlenmesi üzerine tuz stresinin etkisi, *SDÜ Fen Edebiyat Fakültesi Fen Dergisi*, 3 (2): 174-182.
- Dorion, N., Wies, N., Burteaux, A. ve Bigot, C. (1999) Protoplast and leaf explant culture of *Lycopersicon cheesmanii* and salt tolerance of protoplast-derived calli, *Plant Cell Tiss Org*, 56: 9-16.
- Dölarslan, M. ve Gül, E. (2012) Toprak bitki ilişkileri açısından tuzluluk, *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 5 (2): 56-59.
- Dölek, M.N. (2009) *Değişik karpuz genotiplerinin tuz stresine tolerans düzeylerinin belirlenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Toprak Anabilim Dalı, Adana, 60s.
- Ekmekçi, E., Apan, M. ve Kara, T. (2005) Tuzluluğun bitki gelişimine etkisi, *OMÜ, Zir Fak Dergisi*, 20 (3): 118-125.
- El-Enany, A.E. (1995) Proline effect on shoot organogenesis and protein synthesis in salinity-stressed tomato cultures, *J Islam Acad Scie*, 8 (3): 137-142.
- El-Khallal, S.M., Hathout, T.A., Ahsour, A.E.R.A. ve Kerrit, A.-A.A. (2009) Brassinolide and salicylic acid induced antioxidant enzymes, hormonal balance and protein profile of maize plants grown under salt stress, *Res J Agri Biol Sci*, 5 (4): 391-402.
- El-Meleigy, E.-S.A., Gabr, M.F., Mohamed, F.H. ve Ismail, M.A. (2004) Responses to NaCl salinity of tomato cultivated and breeding lines differing in salt tolerance in callus cultures, *Int J Agri Biol*, 6 (1): 19-26.
- Erdal, İ., Türkmen, Ö. ve Yıldız, M. (2000) Tuz stresi altında yetiştirilen hıyar (*Cucumis sativus* L.) fidelerinin gelişimi ve kimi besin maddeleri içeriğindeki değişimler üzerine potasyumlu gübrelemenin etkisi, *YYÜ, Ziraat Fakültesi, J Agric Sci*, 10 (1): 25-29.

- Fariduddin, Q., Mir, B.A., Yusuf, M. ve Ahmad, A. (2013) Comparative roles of brassinosteroids and polyamines in salt stress tolerance, *Acta Physiol Plantarum*, 35: 2037-2053.
- Farooq, M., Wahid, A., Basra, S.M.A. ve Din, İ. (2009) Improving water relations and gas exchange with brassinosteroids in rice under drought stress, *J Agron Crop Sci*, 195: 262-269.
- Ferrie, A.M.R., Dirpaul, J., Krishna, P., Krochko, J. ve Keller, W.A. (2005) Effects of brassinosteroids on microspore embryogenesis in *Brassica* species, *In Vitro Cell Dev-Pl*, 41: 742-745.
- Flowers, T.J. ve Colmer, T.D. (2008) Salinity tolerance in halophytes, *New Phytol*, 179: 945-963.
- Flowers, T.J., Garcia, A., Koyama, M. ve Yeo, A.R. (1997) Breeding for salt tolerance in crop plants-the role of molecular biology, *Acta Physiol Plantarum*, 19 (4): 427-433.
- Fuji, S ve Saka, H. (2001) The promotive effect of brassinolide on lamina joint-cell elongation, germination and seedling growth under low-temperature stress in rice (*Oryza sativa* L.), *Plant Prod Sci*, 4 (3): 210-214.
- Fujioka, S., Noguchi, T., Yokota, T., Takatsuto, S. ve Yoshida, S. (1998) Brassinostreoids in *Arabidopsis thaliana*, *Phytochemistry*, 48 (4): 595-599.
- Gapinska, M., Sklodowska, M. ve Gabara, B. (2008) Effect of short-and long-term salinity on the activities of antioxidative enzymes and lipid peroxidation in tomato roots, *Acta Physiol Plantarum*, 30: 11-18.
- Gechev, T.S., Breusegem, F.V., Stone, J.M., Denev, I. ve Laloi, C. (2006) Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death, *BioEssays*, 28: 1091-1101.
- Gill, S.S. ve Tuteja, N. (2010) Polyamines and abiotic stress tolerance in plants, *Plant Signaling & Behavior*, 5 (1): 26-33.
- Gill, S.S. ve Tuteja, N. (2010) Reactive oxygen species and antioxidant mechinery in abiotic stress tolerance in crop plants, *Plant Physiol Bioch*, 48: 909-930.
- Glenn, E.P., Brown, J.J. ve Blumwald, E. (1999) Salt tolerance and crop potential of halophytes, *Crit Rev Plant Sci*, 18 (2): 227-255.
- Gonzalez-Olmedo, J.L., Cordova, A., Aragon, C.E., Pina, D., Rivas, M. ve Rodriguez, R. (2005) Effect of an analogue of brassinosteroid on FHIA-18 plantlets exposed to thermal stress, *InfoMusa*, 14 (1): 18-20.

- González, O., Hernández, M.M., Silva, J., Espinosa, A., Oliva, E., Sigarroa, A. ve Núñez, M. (2003) Evaluation of two brassinosteroid analogues on callus formation and shoot induction in sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.), *Cultivos Tropicales*, 24 (3): 11-18.
- Gruszka, D. (2013) Brassinosteroid signaling pathway-new key players and interconnections with other signaling networks crucial for plant development and stress tolerance, *Int J Mol Sci*, 14: 8740-8774.
- Gudesblat, G.E. ve Russinova, E. (2011) Plants grow on brassinosteroids, *Curr Opin Plant Biol*, 14: 530-537.
- Gürel, A. ve Avcioğlu, R. (2004) *Bitkilerde strese dayanıklılık fizyolojisi*, Bölüm 21, s.288-326. *Bitki Biyoteknolojisi II, Genetik Mühendisliği ve Uygulamaları*, Eds. Özcan, S., Gürel, E., Babaoğlu, M., Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları, Konya, 456 s.
- Hao, J., Yin, Y. ve Fei, S.-Z. (2013) Brassinosteroid signaling network: implications on yield and stress tolerance, *Plant Cell Rep*, 32: 1017-1030.
- Harish, M.C., Rajeevkumar, S. ve Sathishkumar, R. (2010) Efficient in vitro callus induction and regeneration of different tomato cultivars of India, *Asian J Biotech*, 2 (3): 178-184.
- Hasegawa, P.M. ve Bressan, R.A. (2000) Plant cellular and molecular responses to high salinity, *Annu Rev Plant Phys*, 51: 463-499.
- Hassan, N.M., Serag, M.S., El-Feky, F.M. ve Nemat Alla, M.M. (2008) In vitro selection of mung bean and tomato for improving tolerance to NaCl, *Ann Appl Biol*, 152: 319-330.
- Hassanein, A.M. (2004) Effect of relatively high concentrations of mannitol and sodium chloride on regeneration and gene expression of stress tolerant (*Alhagi graecorum*) and stress sensitive (*Lycopersicon esculentum* L.) plant species, *Bulg J Plant Physiol*, 30 (3-4): 19-36.
- Haubrick, L.L. ve Assmann, S.M. (2006) Brassinosteroids and plant function: some clues, more puzzles, *Plant Cell Environ*, 29: 446-457.
- Hayat, S., Maheshwari, P., Wani, A.S., Irfan, M., Alyemeni, M.N. ve Ahmad, A. (2012) Comparative effect of 28 homobrassinolide and salicylic acid in the amelioration of NaCl stress in *Brassica juncea* L., *Plant Physiol Bioch*, 53: 61-68.

- Heath, R.L., ve Packer, L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplast. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation, *Arch Bioch, Biophys*, 125: 189-198.
- Heidari, A., Bandehagh, A., Toorchi, M. (2014) Effects of NaCl stress on chlorophyll content and chlorophyll fluorescence in sunflower (*Helianthus annuus* L.) lines, *YYÜ Tar Bil Derg (YYU J Agr Sci)*, 24 (2): 111-120.
- Holmberg, N. ve Bülow, L. (1998) Improving stress tolerance in plants by gene transfer, *Trends Plant Sci*, 3 (2): 61-66.
- Houimli, S.I.M., Denten, M. ve Mouhandes, B.D. (2010) Effects of 24-epibrassinolide on growth, chlorophyll, electrolyte leakage and proline by pepper plants under NaCl-stress, *EurAsia J BioSci*, 4: 96-104.
- Janeczko, A., Koscielniak, J., Pilipowicz, M., Szarek-Lukaszewska, G. ve Skoczowski, A. (2005) Protection of winter rape photosystem 2 by 24-epibrassinolide under cadmium stress, *Photosynthetica*, 43 (2): 293-298.
- Janeczko, A., Hura, K., Skoczowski, A., Idzik, I., Biesaga-Koscielniak, J. ve Niemczyk, E. (2009) Temperature-dependent impact of 24-epibrassinolide on the fatty acid composition and sugar content in winter oilseed rape callus, *Acta Physiol Plantarum*, 31: 71-79.
- Janeczko, A., Biesaga-Koscielniak, J., Oklestkova, J., Filek, M., Dziurka, M., Szarek-Lukaszewska, G. ve Koscielniak, J. (2010) Role of 24-epibrassinolide in wheat production: physiological effects and uptake, *J Agron Crop Sci*, 196: 311-321.
- Janeczko, A. ve Swaczynová, J. (2010) Endogenous brassinosteroids in wheat treated with 24-epibrassinolide, *Biol Plantarum*, 54 (3): 477-482.
- Javid, M.G., Sorooshzadeh, A., Moradi, F., Sanavy, S.A.M.M. ve Allahdadi, I. (2011) The role of phytohormones in alleviating salt stress in crop plants, *Aust J Crop Sci*, 5 (6): 726-734.
- Joseph, B., Jini, D. ve Sujatha, S. (2010) Insight in to the role of exogenous salicylic acid on plants grown under salt environment, *Asian J Crop Sci*, 2 (4): 226-235.
- Juan, M., Rivero, R.M., Romero, L. ve Ruiz, J.M. (2005) Evaluation of some nutritional and biochemical indicators in selecting salt-resistant tomato cultivars, *Environ Exp Bot*, 54: 193-201.
- Kagale, S., Divi, U.K., Krochko, J.E., Keller, W.A. ve Krishna, P (2007) Brassinosteroids confers tolerance in *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus* to a range of abiotic stresses, *Planta*, 225: 353-364.

- Kalefetoğlu, T. ve Ekmekçi, Y. (2005) The effects of drought on plants and tolerance mechanism, *GU J Sci*, 18 (4): 723-740.
- Kang, Y.-Y., Guo, S.-R., Li, J. ve Duan, J.-J. (2007) Effects of 24-epibrassinolide on antioxidant system in cucumber seedling roots under hypoxia stress, *Agr Sci China*, 6 (3): 281-289.
- Kaur, N. ve Gupta, A.K. (2005) Signal transduction pathways under abiotic stresses in plants, *Current Sci*, 88 (11): 1771-1780.
- Kaya, C., Tuna, A.L. ve Okant, A.M. (2010) Effect of foliar applied kinetin and indole acetic acid on maize plants grown under saline conditions, *Turk J Agric For*, 34: 529-538.
- Keser, Ö., Çolak, G. ve Caner, N. (2009) Tuza toleransı farklı iki kültür bitkisinde bazı fizyolojik ve makromorfolojik parametreler üzerine Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> tipi tuz stresi etkileri, *BAÜ FBE Dergisi*, 11 (2): 64-80.
- Khamiss, K., Sabouh, M. ve Kanbar, A. (2011) Evaluating the impact of brassinolide on ascorbate peroxidase activity during *Brassica napus* embryo development in vitro, *J Appl Sci Res*, 7 (8): 1336-1339.
- Khavari-Nejad, R.-A. ve Mostofi, Y. (1998) Effects of NaCl on photosynthetic pigments, saccharides, and chloroplast ultrastructure in leaves of tomato cultivars, *Photosynthetica*, 35 (1): 151-154.
- Koca, H., Özdemir, F. ve Turkan, İ. (2006) Effect of salt stress on lipid peroxidation and superoxide dismutase and peroxidase activities of *Lycopersicon esculentum* and *L. pennellii*, *Biol Plantarum*, 50 (4): 745-748.
- Koca, H., Bor, M., Özdemir, F. ve Türkan, İ. (2007) The effect of salt stress on lipid peroxidation, antioxidative enzymes and proline content of sesame cultivars, *Environ Exp Bot*, 60: 344-351.
- Koyuncu, N. (2012) Bazı Makarnalık buğday (*T. durum* Desf.) çeşitlerinin in vitro koşullarda yüksek tuz dozlarına tepkileri, Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi, 21 (2): 70-74.
- Krishna, P. (2003) Brassinosteroid-mediated stress responses, *J Plant Growth Regul*, 22: 289-297.
- Kuşvuran, Ş., Yaşar, F., Abak, K., Ellialtıoğlu, Ş. (2008) Tuz stresi altında yetiştirilen tuza tolerant ve duyarlı *Cucumis sp.*'nin bazı genotiplerinde lipid peroksidasyonu, klorofil ve iyon miktarlarında meydana gelen değişimler, *YYÜ, Ziraat Fakültesi, Tarım Bilimleri Dergisi (J Agric Sci)*, 18 (1): 11-18.



- Kuşvuran, Ş. (2010) *Kavunlarda kuraklık ve tuzluluğa toleransın fizyolojik mekanizmaları arasındaki bağlantılar*, Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Adana, 2010, 356s.
- Li, J. ve Chory, J. (1999) Brassinosteroid actions in plants, *J Exp Bot*, 50 (332): 275-282.
- Liu, Y., Zhao, Z., Si, J., Di, C., Han, J. ve An L. (2009) Brassinosteroids alleviate chilling-induced oxidative damage by enhancing antioxidant defense system in suspension cultured cells of *Chorispora bungeana*, *Plant Growth Regul*, 59: 207-214.
- Lutts, S., Kinet, J.M., Bouharmant, J. (1996) NaCl-induced senescence in leaves of rice (*Oryza sativa* L.) cultivars differing in salinity resistance, *Ann Bot*, 78: 389-398.
- Mahajan, S. ve Tuteja, N. (2005) Cold, salinity and drought stresses: An overview, *Arch Biochem Biophys*, 444: 139-158.
- Mahajan, S., Pandey, G.K. ve Tuteja, N. (2008) Calcium- and salt-stress signaling in plants: Shedding light on SOS pathway, *Arch Biochem Biophys*, 471: 146-158.
- Malabadi, R.B. ve Nataraja, K. (2007) Brassinosteroids influences in vitro regeneration using shoot tip sections of *Cymbidium elegans* Lindl., *Asian J Plant Sci*, 6 (2): 308-313.
- Malabadi, R.B. ve Nataraja, K. (2007) 24-epibrassinolide induces somatic embryogenesis in *Pinus wallichiana* A.B. Jacks., *J Plant Sci*, 2 (2): 171-178.
- Malabadi, R.B., Teixeira da Silva, J.A. ve Mulgund, G.S. (2011) Induction of somatic embryogenesis in *Pinus caribaea*, *Tree and Forestry Science and Biotechnology*, 5 (1): 27-32.
- Mansour, M.M.F. ve Salama, K.H.A. (2004) Cellular basis of salinity tolerance in plants, *Environ Exp Bot*, 52: 113-122.
- Mazorra, L.M., Nunez, M., Hechavarria, M., Coll, F. ve Sanchez-Blanco, M.J. (2002) Influence of brassinosteroids on antioxidant enzyme activity in tomato under different temperatures, *Biol Plantarum*, 45 (4): 593-596.
- Mercado, J.A., Sancho-Carrascosa, M.A., Jimenez-Bermudez, S., Peran-Quesada, R., Pliengo-Alfaro, F. ve Quesada, M.A. (2000) Assessment of in vitro growth of apical stem sections and adventitious organogenesis to evaluate salinity tolerance in cultivated tomato, *Plant Cell Tiss Org*, 62: 101-106.

- Mittova, V., Guy, M., Tal, M. ve Volokita, M. (2002-a) Responce of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii* to salt-dependent oxidative stress: increased activities of antioxidant enzymes in root plastids, *Free Radical Res*, 36 (2): 195-202.
- Mittova, V., Tal, M., Volokita, M. ve Guy, M. (2002-b) Salt stress induces up-regulation of an efficient chloroplast antioxidant system in the salt-tolerant wild tomato species *Lycopersicon pennellii* but not in the cultivated species, *Phsiol Plantarum*, 115: 393-400.
- Miyama, M. ve Hanagata, N. (2007) Microarray analysis of 7029 gene expression patterns in burma mangrove under high-salinity stress, *Plant Sci*, 172: 948-957.
- Mohamed, A.N., Rahman, M.H., Alsadon, A.A. ve Islam, R. (2007) Accumulation of proline in NaCl-treated callus of six tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cultivars, *Plant Tissue Cult Biotech*, 17 (2): 217-220.
- Mohamed, A.-A.N., Ismail, M.R. ve Rahman, M.H. (2010) In vitro response from cotyledon and hypocotyls explants in tomato by inducing 6-benzylaminopurine, *Afr J Biotechnol*, 9 (30): 4802-4807.
- Mohamed, A.N. ve Ismail, M.R. (2011) Changes in organic and inorganic solutes of in vitro tomato cultivars under NaCl stress, *Aust J Crop Sci*, 5 (8): 939-944.
- Mohamed, A.N., Ismail, M.R., Kadir, M.A. ve Saud, H.M. (2011) In vitro performances of hypocotyl and cotyledon explants of tomato cultivars under sodium chloride stress, *Afr J Biotechnol*, 10 (44): 8757-8764.
- Montoliu, A., Lopez-Climent, M.F., Arbona, V., Perez-Clemente, R.M. ve Gomez-Cadenas, A. (2009) A novel in vitro tissue culture approach to study salt stress responses in citrus, *Plant Growth Regul*, 59: 179-187.
- Mugdhal, V., Madaan, N. ve Mugdal, A. (2010) Biochemical mechanism of salt tolerance in plant: a review, *Int J Bot*, 6 (2): 136-143.
- Munns, R. (2002) Comparative physiology of salt and water stress, *Plant Cell Environ*, 25: 239-250.
- Munns, R. ve Tester, M. (2008) Mechanisms of salinity tolerance, *Annu Rev Plant Biol*, 59: 651-681.
- Murashige, T. ve Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, *Physiol Plant*, 15: 473-497.
- Mutlu, F. ve Bozcuk, S. (2000) Tuzlu koşullarda ayçiçeği tohumlarının çimlenmesi ve erken büyüme üzerine dışsal spermin'in etkileri, *Turk J Biol*, 24: 635-643.

- Müssig, C. (2005) Brassinosteroid-promoted growth, *Plant Biology*, 7: 110-117.
- Müssig, C. ve Altmann, T. (1999) Physiology and molecular mode of action of brassinosteroids, *Plant Physiol Bioch*, 37 (5): 363-372.
- Müssig, C. ve Altmann, T. (2003) Genomic brassinosteroid effects, *J Plant Growth Regul*, 22: 313-324.
- Nassar, A.H. (2004) Effect of homobrassinolide on in vitro growth of apical meristems and heat tolerance of banana shoots, *Int J Agri Biol*, 6 (5): 771-775.
- Neelakandan, A.K. ve Wang, K. (2012) Recent progress in the understanding of tissue culture-induced genome level changes in plants and potential applications, *Plant Cell Rep*, 31: 597-620.
- Noaman, M.M. ve Ahmad, E. (2004) Development of alfalfa tolerant to salinity stress using organogenesis technique, *Biotechnology*, 3 (2): 136-139.
- Nunez, M., Mazzafera, P., Mazorra, L.M., Siqueira, W.J. ve Zullo, M.A.T. (2003) Influence of a brassinosteroid analogue on antioxidant enzymes in rice grown in culture medium with NaCl, *Biol Plantarum*, 47 (1): 67-70.
- Nunez, M., Siqueira, W.J., Hern, M., Zullo, M.A.T., Robaina, C. ve Coll, F. (2004) Effect of spirostane analogues of brassinosteroids on callus formation and plant regeneration in lettuce (*Lactuca sativa*), *Plant Cell Tiss Org*, 78: 97-99.
- Ogwen, J.O., Hu, W.H., Song, X.S., Shi, K., Mao, W.H., Zhou, Y.H. ve Hu, J.Q. (2010) Photoinhibition-induced reduction in photosynthesis is alleviated by abscisic acid, cytokinin and brassinosteroid in detached tomato leaves, *Plant Growth Regul*, 60: 175-182.
- Osman, M.G., Elhadi, E.A. ve Khalafalla, M.M. (2010) Callus formation and organogenesis of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill, c.v. Omdurman) induced by thidiazuron, *Afr J Biotechnol*, 9 (28): 4407-4413.
- Öncel, I. ve Keleş, Y. (2002) Tuz stresi altındaki buğday genotiplerinde büyüme, pigment içeriği ve çözünür madde kompozisyonunda değişimler, *CÜ, Fen-Edebiyat Fakültesi Fen Bilimleri Dergisi*, 23 (2): 8-16.
- Öz, M. ve Karasu, A. (2007) Pamuğun çimlenmesi ve erken fide gelişimi üzerine tuz stresinin etkisi, *UÜ, Ziraat Fakültesi Dergisi*, 21 (1): 9-21.
- Özdemir, F., Bor, M., Demiral, T. ve Türkan, İ. (2004) Effects of 24-epibrassinolide on seed germination, seedling growth, lipid peroxidation, proline content and antioxidative system of rice (*Oryza sativa* L.) under salinity stress, *Plant Growth Regul*, 42: 203-211.

- Parida, A.K. ve Das, A.B. (2005) Salt tolerance and salinity effects on plants: a review, *Ecotox Environ Safe*, 60: 324-349.
- Parvaiz, A. ve Satyawati, S. (2008) Salt stress and phyto-biochemical responses of plants - a review, *Plant Soil Environ*, 54 (3): 89-99.
- Pullman, G.S., Zhang, Y. ve Phan, B.H. (2003) Brassinolide improves embryogenic tissue initiation in conifers and rice, *Plant Cell Rep*, 22: 96-104.
- Rai, M.K., Kalia, R.K., Singh, R., Gangola, M.P. ve Dhawan, A.K. (2011) Developing stress tolerant plants through in vitro selection - An overview of the recent progress, *Environ Exp Bot*, 71: 89-98.
- Ramakrishna, A. ve Ravishankar, G.A. (2011) Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants, *Plant Signaling & Behavior*, 6 (11): 1720-1731.
- Rao, S.S.R., Vardhini, B.V., Sujatha, E. ve Anuradha, S. (2002) Brassinosteroids - A new class of phytohormones, *Curr Sci*, 82 (10): 1239-1245.
- Rodriguez-Rosales, M.P., Kerkeb, L., Bueno, P. ve Donaire, J.P. (1999) Changes induced by NaCl in lipid content and composition, lipoxygenase, plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase and antioxidant enzyme activities of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) calli, *Plant Sci*, 143: 143-150.
- Roy, R., Agrawal, V. ve Gupta, S.C. (2009) Comparison of drought-induced polypeptides and ion leakage in three tomato cultivars, *Biol Plantarum*, 53 (4): 685-690.
- Sairam, R.K. ve Tyagi, A. (2004) Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants, *Curr Sci*, 86 (3): 407-421.
- Sajid, Z.A. ve Aftab, F. (2012) Role of salicylic acid in amelioration of salt tolerance in potato (*Solanum tuberosum* L.) under in vitro conditions, *Pak J Bot*, 44: 37-42.
- Sakurai, A. (1999) Brassinosteroid biosynthesis, *Plant Physiol Bioch*, 37 (5): 351-361.
- Santa-Cruz, A., Acosta, M., Perez-Alfocea, F. ve Bolarin, M.C. (1997) Changes in free polyamine levels induced by salt stress in leaves of cultivated and wild tomato species, *Phsiol Plantarum*, 101: 341-346.
- Schaller, H. (2003) The role of sterols in plant growth and development, *Prog Lipid Res*, 42: 163-175.

- Shahbaz, M. ve Ashraf, M. (2007) Influence of exogenous application of brassinosteroid on growth and mineral nutrients of wheat (*Triticum aestivum* L.) under saline conditions, *Pak J Bot*, 39 (2): 513-522.
- Shahbaz, M., Ashraf, M. ve Athar, H.-U.-R. (2008) Does exogenous application of 24-epibrassinolide ameliorate salt induced growth inhibition in wheat (*Triticum aestivum* L.)?, *Plant Growth Regul*, 55: 51-64.
- Shahid, M.A., Pervez, M.A., Balal, R.M., Mattson, N.S., Rashid, A., Ahmad, R., Ayyub, C.M. ve Abbas, T. (2011) Brassinosteroid (24-epibrassinolide) enhances growth and alleviates the deleterious effects induced by salt stress in pea (*Pisum sativum* L.), *Aust J Crop Sci*, 5 (5): 500-510.
- Shalata, A. ve Tal, M. (1998) The effect of salt stress on lipid peroxidation and antioxidants in the leaf of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii*, *Physiol Plantarum*, 104: 169-174.
- Shalata, A., Mittova, V., Volokita, M., Guy, M. ve Tal, M. (2001) Response of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii* to salt-dependent oxidative stress: The root antioxidative system, *Physiol Plantarum*, 112: 487-494.
- Shannon, M.C. ve Grieve, C.M. (1999) Tolerance of vegetable crops to salinity, *Sci Hortic*, 78: 5-38.
- Sharma, I., Ching, E., Saini, S., Bhardwaj, R. ve Pati, P.K. (2013) Exogenous application of brassinosteroid offers tolerance to salinity by altering stress responses in rice variety Pusa Basmati-1, *Plant Physiol Bioch*, 69: 17-26.
- Sheeja, T.E., Mondal, A.B., Rathore, R.K.S. (2004) Efficient plantlet regeneration in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.), *Plant Tissue Cult*, 14 (1): 45-53.
- Shibli, R.A., Kushad, M., Yousef, G.G. ve Lila, M.A. (2007) Physiological and biochemical responses of tomato microshoots to induced salinity stress with associated ethylene accumulation, *Plant Growth Regul*, 51: 159-169.
- Singh, I. ve Shono, M. (2005) Physiological and molecular effects of 24-epibrassinolide, a brassinosteroid on thermotolerance of tomato, *Plant Growth Regul*, 47: 111-119.
- Sinha, A.K., Jaggi, M., Raghuram, B. ve Tuteja, N. (2011) Mitogen-activated protein kinase signaling in plants under abiotic stress, *Plant Signaling & Behavior*, 6 (2): 196-203.

- Smolik, M., Kram, P., Krupa-Malkiewicz, M., Smolik, B. ve Malinowska, K (2011) Response of tomato genotypes to salinity stress assessed at the seedling stage, *Elektronic Journal of Polish Agricultural Universities*, 14 (4): 1-7.
- Stevens, J., Senaratna, T. ve Sivasithamparam, K. (2006) Salicylic acid induces salinity tolerance in tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. Roma): associated changes in gas exchange, water relations and membrane stabilisation, *Plant Growth Regul*, 49: 77-83.
- Strain, H.H. ve Svec, W.A. (1966) *Extraction, separation, estimation and isolation of chlorophylls*, s.21-66, Bernon, V.P., Seely, G.R., (editörler), In the chlorophylls, Academic Pres, New York.
- Surgun, Y., Yılmaz, E., Çöl, B. ve Bürün, B. (2012) Altıncı grup bitki hormonu: brassinosteroidler, *CBÜ Fen Bilimleri Dergisi*, 8 (1): 27-46.
- Szabados, L. ve Savoure, A. (2009) Proline : a multifunctional amino acid, *Trends Plant Sci*, 15 (2): 89-97.
- Taiz, L. ve Zaiger, E. (2008) *Bitki fizyolojisi*, çeviri editörü: İsmail Türkan, Palme Yayıncılık, Ankara, 690s.
- Tabur, S. ve Demir, K. (2008) Tuz stresi altındaki mitotik indeks ve kromozom anormallikleri üzerine triakontanol ön uygulamasının etkileri, *BİBAD*, 1 (1): 11-15.
- Talano, M.A., Agostini, E., Medina, M.I., Milrad De Forchetti, S. ve Tigier, H.A. (2003) Tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. Pera) hairy root cultures: characterization and changes in peroxidase activity under NaCl treatment, *In Vitro Cell Dev-Pl*, 39: 354-359.
- Tekin, F. ve Bozcuk, S. (1998) *Helianthus annuus* L. var. Santafe (Ayçiçeği) tohumlarının çimlenmesi ve erken büyüme üzerine tuz ve dışsal putresinin etkileri, *Turk J Biol*, 22: 331-340.
- Trovato, M., Mattioli, R. ve Costantino, P. (2008) Multiple roles of proline in plant stress tolerance and development, *Rend Lincei*, 19: 325-346.
- Tuna, A.L., Kaya, C., Ashraf, M., Altunlu, H., Yokas, İ. ve Yağmur, B. (2007) The effects of calcium sulphate on growth, membrane stability and nutrient uptake of tomato plants grown under salt stress, *Environ Exp Bot*, 59: 173-178.
- Tuteja, N. ve Sopory, S.K. (2008) Chemical signaling under abiotic stress environment in plants, *Plant Signaling & Behavior*, 3 (8): 525-536.

- Türkan, İ. ve Demiral, T. (2009) Recent developments in understanding salinity tolerance, *Environ Exp Bot*, 67: 2-9.
- Türkmen, Ö., Şensoy, S. ve Erdal, İ. (2000) Effect of potassium on emergence and seedling growth of cucumber grown in salty conditions, *YYÜ, ZF, J Agric Sci*, 10 (1): 113-117.
- Türkmen, O., Şensoy, S., Erdal, İ. ve Kabay, T. (2002) Effect of calcium applications on the emergence and growth of seedlings grown in salty seedling growing conditions, *YYÜ, ZF, J Agric Sci*, 12(2): 53-57.
- Vardhini, B.V., Sujatha, E. ve Rao, S.S.R. (2011) Brassinosteroids: alleviation of water stress in certain enzymes of *Sorghum* seedlings, *J Phytology*, 3 (10): 38-43.
- Verbruggen, N. ve Hermans, C. (2008) Proline accumulation in plants: a review, *Amino Acids*, 35: 753-759.
- Verma, A., Malik, C.P. ve Gupta, V.K. (2011) In vitro effects of brassinosteroids on the growth and antioxidant enzyme activities in groundnut, *ISRN Agronomy*, 2012: 1-8.
- [www.agrotektohum.com](http://www.agrotektohum.com)
- Xia, J.X., Huang, Y.Y., Wang, L., Huang, F.L., Yu, Y.L., Zhou, Y.H. ve Yu, J.Q. (2006) Pesticides-induced depression of photosynthesis was alleviated by 24-epibrassinolide pretreatment in *Cucumis sativus* L., *Pestic Biochem Phys*, 86: 42-48.
- Xia, X.-J., Chen, Z. ve Yu, J.-Q. (2010) ROS mediate brassinosteroids-induced plant stress responses, *Plant Signaling & Behavior*, 5 (5): 532-534.
- Yaman, S.T., Çolak, G. ve Caner, N. (2009) *Lycopersicon esculentum* Mill.'de bazı morfometrik parametreler üzerine  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  ve  $\text{MgSO}_4$  tuzluluğunun etkileri, *KSÜ Doğa Bil Derg*, 12 (1): 29-39.
- Yang, C.-J., Zhang, C., Lu, Y.-N., Jin, J.-Q. ve Wang, X.-L. (2011) The mechanisms of brassinosteroids' action: from signal transduction to plant development, *Mol Plant*, 4 (4): 588-600.
- Yaşar, F., Ellialtıoğlu, Ş., Özpays, T. ve Uzal, Ö. (2008) Tuz stresinin karpuzda (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Mansf.) antioksidatif enzim (SOD, CAT, APX ve GR) aktivitesi üzerine etkisi, *YYÜ, ZF, J Agric Sci*, 18 (1): 61-65.
- Yeo, A. (1998) Molecular biology of salt tolerance in the context of whole-plant physiology, *J Exp Bot*, 49 (323): 915-929.

- Yıldız, M., Terzi, H., Cenkci, S., Arıkan Terzi, E.S. ve Uruşak, B. (2010) Bitkilerde tuzluluğa toleransın fizyolojik ve biyokimyasal markörleri, *Anadolu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi-C*, 1 (1): 1-33.
- Yıldıztekin, M. (2012) *Bazı bor bileşiklerinin ve yaygın kullanılan pestisitlerin domates bitkisinin (L. esculentum) fizyolojik ve biyokimyasal özellikleri üzerine etkilerinin araştırılması*, Doktora Tezi, Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Muğla, 144s.
- Yılmaz, E., Surgun, Y. ve Bürün, B., (2009). Pamuk sürgün ucu kültürlerinde epibrassinolid ve homobrassinolid uygulamasının etkisi, 17. Biyoteknoloji Kongresi, 13-16 Aralık 2009, Antalya.
- Yılmaz, E., Tuna, A.L. ve Bürün, B. (2011) Bitkilerin tuz stresi etkilerine karşı geliştirdikleri tolerans stratejileri, *CBÜ Fen Bil Dergisi*, 7 (1): 47-66.
- Yokaş, İ., Tuna, A.L., Bürün, B., Altunlu, H., Altan, F. ve Kaya, C. (2008) Responses of the tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) plant to exposure to different salt forms and rates, *Turk J Agric For*, 32: 319-329.
- Yokoi, S., Bressan, R.A. ve Hasegawa, P.M. (2002) Salt stress tolerance of plants, *JIRCAS Working Rep*, 25-33.
- Yoon, J.Y., Hamayun, M., Lee, S.-K. ve Lee, I.-J. (2009) Methyl jasmonate alleviated salinity stress in soybean, *J Crop Sci Biotech*, 12 (2): 63-68.
- Zhu, J.-K. (2001) Plant salt tolerance, *Trends Plant Sci*, 6 (2): 66-71.
- Zhu, J.-K. (2002) Salt and drought stress signal transduction in plants, *Annu Rev Plant Biol*, 53: 247-273.



## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

Ad Soyad : Emel YILMAZ GÖKDOĞAN

Uyruk : T.C.

Doğum Yeri ve Tarihi: Bodrum-02/04/1978

Medeni Hali : Evli

Telefon : 0505 875 8648

E-posta : emelyilmaz@mu.edu.tr

### Eğitim

Alınan Derece	Aldığı Kurum/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Lise	Milas Lisesi	1995
Lisans	Muğla Ünivesitesi	2000
Yüksek Lisans	Muğla Üniversitesi	2004

### İş Tecrübesi

Yıl	Yer	Pozisyon/görev
2001-2004	Muğla Üniversitesi	Araştırma Görevlisi
2004-2007	Muğla Seçkin Birey Dershanesi Ortaca Güney Ege Dershanesi	Biyoloji Öğretmenliği
2007-2014	Muğla Üniversitesi	Araştırma Görevlisi

### Yabancı Dil(ler)

Dil (İngilizce, vs)	Başlangıç	Orta	İleri
Yazma		X	
Konuşma		X	
Anlama		X	
Okuma		X	

## **Bilimsel Faaliyetler**

### **Makaleler**

- Surgun, Y., Yılmaz, E., Çöl, B. ve Bürün, B. (2012) Altıncı grup bitki hormonu: brassinosteroidler, *CBÜ Fen Bil Dergisi*, 8 (1): 27-47.
- Yılmaz E., Tuna A. L. ve Bürün B. (2011) Bitkilerin tuz stresi etkilerine karşı geliştirdikleri tolerans stratejileri, *CBÜ Fen Bil Dergisi*, 7 (1): 47-66.

### **Bildiriler**

#### **Uluslararası Bildiriler**

- Surgun, Y. , Yılmaz, E., Çöl, B. ve Bürün, B. (2014) Pamukta kallus indüksiyonu, sürgün ucu ve kotiledon nodlarından bitki gelişimi ve somaklonal varyasyon, 3. *Uluslararası Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi*, 2-6 Haziran, Bosna-Hersek.

#### **Ulusal Bildiriler**

- Yılmaz, E. ve Bürün, B. (2014-a) Domates (*Lycopersicon esculentum*) in vitro tohum kültürlerinde tuz stresine karşı 24-epibrassinolid uygulamasının etkileri, 22. *Ulusal Biyoloji Kongresi*, 23-27 Haziran, Eskişehir.
- Yılmaz, E., Aldemir, G., Surgun, Y. ve Bürün, B. (2013) Bitki genetik kaynaklarının önemi, korunması ve yararlanılması, 13. *Biyoçeşitlilik Sempozyumu*, 22-23 Mayıs, Marmaris/Muğla.
- Yılmaz, E., Surgun, Y. ve Bürün, B. (2010) Pamuk kallus kültürlerinde brassinosteroidlerin etkisi, 20. *Ulusal Biyoloji Kongresi*, 21-25 Haziran, Denizli.
- Yılmaz, E., Surgun, Y. ve Bürün, B. (2009) Pamuk sürgün ucu kültürlerinde epibrassinolid ve homobrassinolid uygulamasının etkisi, 17. *Biyoteknoloji Kongresi*, 13-16 Aralık, Antalya.
- Surgun, Y., Yılmaz, E. ve Bürün, B. (2009) Genetik mühendisliği ve çevresel riskler, 9. *Ulusal Ekoloji ve Çevre Kongresi*, 7-10 Ekim, Nevşehir.

#### **Hazırlanan Yayınlar**

- Yılmaz, E. ve Bürün, B. (2014-b) Domates (*Lycopersicon esculentum* Mill.) in vitro kültürlerinde kallus indüksiyonu ve sürgün rejenerasyonu (Makale SDÜ Fen Bilimleri Dergisine gönderilmiştir).