



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü



**PAMUK (*Gossypium hirsutum* L.)
KALLUSLARINDA TUZ STRESİNE KARŞI BAZI
MORFOLOJİK, FİZYOLOJİK VE
BİYOKİMYASAL PARAMETRELERİN
ARAŞTIRILMASI**

Yüksek Lisans Tezi

Melis SAÇU

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

İzmir
2019

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü

**PAMUK (*Gossypium hirsutum* L.)
KALLUSLARINDA TUZ STRESİNE KARŞI BAZI
MORFOLOJİK, FİZYOLOJİK VE
BİYOKİMYASAL PARAMETRELERİN
ARAŞTIRILMASI**

Melis SAÇU

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Aynur GÜREL

İkinci Danışman : Prof. Dr. Lale AKTAŞ

Biyoteknoloji Anabilim Dalı
Biyoteknoloji Yüksek Lisans Programı

İzmir
2019

Melis SAÇU tarafından Yüksek lisans tezi olarak sunulan “Pamuk (*Gossypium hirsutum* L.) Kalluslarında Tuz Stresine Karşı Bazı Morfolojik, Fizyolojik ve Biyokimyasal Parametrelerin Araştırılması” başlıklı bu çalışma EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 26 Aralık 2019 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı:

Prof. Dr. Aynur Gürel

a/gürel

Raportör Üye:

Prof. Dr. Behiye Altınbaş
B. Altınbaş

B. Altınbaş

Üye:

Doç. Dr. Meltem Bayraktar

M. Bayraktar

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “**Pamuk (*Gossypium hirsutum* L.) Kalluslarında Tuz Stresine Karşı Bazı Morfolojik, Fizyolojik ve Biyokimyasal Parametrelerin Araştırılması**” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarımı ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

26 / 12 / 2019

Melis SAÇU



ÖZET**PAMUK (*Gossypium hirsutum* L.) KALLUSLARINDA TUZ STRESİNE KARŞI BAZI MORFOLOJİK, FİZYOLOJİK VE BİYOKİMYASAL PARAMETRELERİN ARAŞTIRILMASI**

SAÇU, Melis

Yüksek Lisans Tezi, Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Aynur GÜREL

İkinci Danışman: Prof. Dr. Lale Yıldız AKTAŞ

Kasım, 2019, 147 s.

En önemli abiyotik stres faktörlerinden biri olarak bilinen tuz stresinin, pamuk üretim alanlarında verimi kısıtladığı bilinmektedir. Bu çalışmada, *in vitro* koşullarda tuza dayanıklı (Carmen) ve duyarlı (NM-503) olduğu bilinen iki farklı pamuk çeşidine ait tohumlardan elde edilen kalluslara farklı konsantrasyonlarda NaCl uygulaması yapılarak tuz stresinin oluşturulması ve bu stresin kalluslar üzerinde meydana getirdiği morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal etkilerin incelenmesi hedeflenmiştir. Carmen ve NM-503 çeşitlerine ait tohumlar, yüzey sterilizasyondan sonra *in vitro*'da yarı katı besin ortamlarında (1/2 MS) kültüre alınarak çimlendirilmişlerdir. Çimlenen 7 günlük steril fidelerin hipokotil eksplantlarından oluşturulan kalluslar altkültürlerle çoğaltılarak belirlenen tuz konsantrasyonuna sahip besin ortamlarında 4 hafta büyümeye bırakıldıktan sonra fizyolojik, morfolojik ve biyokimyasal parametreleri incelenmiş ve tuza tolerans durumları değerlendirilmiştir.

Morfolojik ve fizyolojik olarak, yaş ağırlık, kuru ağırlık, kallus rengi, kallus yapısı, kallus oluşum yüzdesi incelenen kalluslarda 400 mM tuz uygulanan konsantrasyonda iki çeşidin de büyümesinin durduğu gözlemlenmiştir. Morfolojik ve fizyolojik gözlemlere göre duyarlı olduğu bilinen NM-503 çeşidinin *in vitro*'da bitki doku kültürlerine yanıtlarının daha uygun olduğu görülmüştür. Çeşitlerin artan tuz konsantrasyonunda klorofil miktarlarının değişmediği, karotenoid miktarlarının azaldığı görülmüştür. Fotosentetik aktivitelerin artan tuz konsantrasyonu varlığında pamuk bitkisinde iki çeşit için de ayırt edici bir özellik olmadığı

görülmüştür. Dayanıklı olduğu bilinen Carmen çeşidinde artan tuz konsantrasyonu varlığında prolin miktarının artıp duyarlı olduğu bilinen NM-503 çeşidinde ise azalması pamuk bitkisinin ozmotik regülasyonlarla tuz stresini tolere ettiğini açıklamaktadır. DPPH analizleri sonucu artan tuz konsantrasyonundan iki çeşidin de % inhibisyonlarının azaldığı görülmektedir.

Carmen çeşidinin prolin miktarı 200 ve 400 mM NaCl uygulamasında 2.65 ve 3.10 μmol^{-1} g görülürken NM-503 çeşidinde aynı dozlardaki prolin miktarı 0.22 ve 0.21 μmol^{-1} g görülmüştür. Antioksidan enzimlerde Carmen çeşidinin POX miktarı 200 ve 400 mM NaCl uygulanan dozlarda sırası ile 15.6 ve 18.4 ünite mg-1 protein olarak en yüksek değerleri göstermiştir. SOD enzimi aktivitesinin Carmen çeşidinde yüksek görüldüğü dozlarda hidrojen peroksit miktarı düşük görülmüştür. NM-503 çeşidindeki hidrojen peroksit miktarının, aynı NaCl konsantrasyon uygulamasında daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Bunun sebebi Carmen çeşidinde POX ve APX enzimlerinin yüksek aktivite göstererek hidrojen peroksidin zararlı etkisini azaltmasına bağlı olduğunu göstermektedir.

NM-503 çeşidi *in vitro* seleksiyon çalışmaları için morfolojik ve fizyolojik olarak uygun olmasına rağmen, Carmen çeşidinin 200 mM tuz konsantrasyonuna kadar ozmotik regülasyon ve antioksidan enzim aktiviteleri ile tuzu tolere ettiği belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Pamuk, *Gossypium hirsutum* L., kallus, *in vitro*, NaCl, Prolin, Klorofil a, Klorofil b, Total klorofil, çözülebilir protein, tuz stresi, antioksidatif enzimler, peroksidaz, askorbat peroksidaz, DPPH

ABSTRACT

M.Sc. in Biotechnology.

Supervisor: Prof. Dr. Aynur GÜREL

Co-Supervisor: Prof. Dr. Lale Yıldız Aktaş

November 2019, 147 pages

Salt stress, one of the most important abiotic stress factors, is accepted to limit yield in cotton production areas. In this study to obtain salt stress by applying different concentrations of NaCl on the calli obtained from the seeds of two different cotton cultivars, Carmen and NM-503 known as salt-resistant and salt-sensitive respectively, *in vitro* conditions and to analyze of the morphological, physiological and also biochemical effects investigation caused by the salt stress on the calli are the main points targeted.

The seeds of Carmen and NM-503 varieties were cultured in semi-solid nutrient media (1/2 MS) for *in vitro* germination after surface sterilization provided by sulfuric acid and commercial sodium hypochlorite. The callus, formed from hypocotyl explants of sterile seedlings after 7 days of germination, mass-propagated by subculturing and transferred into the medium with determined salt concentration for 4 weeks. After 4 weeks, the morphological and biochemical parameters of the cultures are investigated and the state of salt tolerance of the callus are evaluated.

Among the callus, which are analyzed by morphological and physiological properties such as wet weight, dry weight, callus color, callus structure and callus formation percentage, it is observed the growth of both cultivars stopped at 400 mM salt applied concentration. According to morphological and physiological observations, NM-503 species, known as salt-sensitive, are found to be more suitable for plant tissue cultures *in vitro*. It is observed that chlorophyll amounts did not change and carotenoid amounts decreased in increasing salt concentration of cultivars. In the presence of increased salt concentration, photosynthetic activities are not a

distinctive feature for both cultivars of cotton plant and do not have a mechanism affected by salt stress. Increasing of the amount of proline in the cultivar Carmen, which is known to be resistant, and decreasing in the cultivar NM-503, which is known to be sensitive, in the presence of increased salt concentration, explains that cotton plant tolerates salt stress by osmotic regulation.

DPPH analysis showed that % inhibition of antioxidative enzymes of both cultivars decreased with increasing salt concentration.

While the proline content of Carmen cultivar was 2.65 and 3.10 $\mu\text{mol}^{-1} \text{g}$ in 200 and 400 mM NaCl application, the same doses of NaCl in NM-503 were 0.22 and 0.21 $\mu\text{mol}^{-1} \text{g}$. It was observed that the amount of hydrogen peroxide in NM-503 variety was higher in the same NaCl concentration application. These results show that by increasing the activity of POX and APX enzymes in Carmen cultivar, hydrogen peroxide reduces harmful effects.

Although NM-503 was morphologically and physiologically suitable for in vitro selection studies, Carmen was determined to tolerate salt with osmotic regulation and antioxidant enzyme activities up to 200 mM salt concentration.

Keywords: Cotton, *Gossypium hirsutum* L., callus, *in vitro*, NaCl, proline, chlorophyll a, chlorophyll b, total chlorophyll, total carotenoid, soluble protein, salt stress, antioxidative enzymes, peroxidase, ascorbate peroxidase, DPPH.

ÖNSÖZ

Sürdürülebilir tarım için tuz stresine karşı tolerant ya da dayanıklı bitkileri elde etme açısından önem taşıyan bu tez çalışması kapsamında, *in vitro* seleksiyon çalışmalarında kullanılabilecek seleksiyon kriterlerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Araştırmada *in vitro* koşullarda tuza dayanıklı (Carmen) ve duyarlı (NM-503) olduğu bilinen iki farklı pamuk çeşidine ait tohumlardan elde edilen fidelerin hipokotil kökenli kalluslarına farklı konsantrasyonlarda NaCl uygulaması ile tuz stresinin oluşturulması ve oluşan bu stresin kalluslar üzerinde meydana getireceği morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal etkilerinin incelenmesi hedeflenmiştir.

Denemeler sonucunda elde edilen olan bulguların, tuz stresine karşı *in vitro* seleksiyon çalışmaları açısından seçici karakteristik özelliklerin belirlenmesinde yol gösterici olması amaçlanmıştır.

Bu tez çalışması Ege Üniversitesi İdari ve Mali İşler Daire Başkanlığı, Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından FYL-2018-20040 no'lu proje ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
ÖNSÖZ	xi
1. GİRİŞ	1
2.1 Bitkiler ve Stres	9
2.2 Reaktif Oksijen Türleri (ROS)	10
2.2.1 Süperoksit Radikali ($O_2^{\cdot-}$)	11
2.2.2 Hidrojen Peroksit (H_2O_2)	12
2.2.3 Hidroksil Radikali ($OH^{\cdot}$)	13
2.2.4 Singlet Oksijen (1O_2)	15
2.2.5 Hidroperoksil Radikali ($HO_2^{\cdot}$)	15
2.3 Serbest Radikallerin Kaynakları	15
2.3.1 Endojen Kaynaklar	15
2.3.2 Ekzojen Kaynaklar	17
2.4 Biyolojik Makromoleküller Üzerinde ROS Etkisi	17
2.4.1 Serbest Radikallerin Lipitlere Etkileri	18
2.4.2 Serbest Radikallerin Proteinlere Etkileri	19
2.4.3 Serbest Radikallerin Nükleik Asit ve DNA'ya Etkileri	19
2.5 Antioksidan Savunma Sistemleri	19
2.5.1 Enzimatik antioksidanlar	20
2.5.2 Enzimatik Olmayan Savunma Sistemi (Enzimatik Olmayan Antioksidanlar)	23
2.6 Tuz Stresi	25
2.7 Bitkilerin Strese Karşı verdiği Yanıtlar	30
2.7.1 Stresten Kaçınma	31
2.7.2 Stres Sakınması	31
2.7.3 Stres Adaptasyonu	31
2.7.4 Stres Aklimasyonu	31
2.7.5 Stres Toleransı	31
2.8 Tuz Stresine Karşı Bitkilerin Geliştirdiği Tolerans Mekanizmaları	33
2.9 Bitki Doku Kültürü ve Biyoteknolojik Yaklaşımlar	36

3. MATERYAL ve YÖNTEM	44
3.1 Materyal	44
3.1.1 Kullanılan Kimyasallar	44
3.1.2 Kullanılan Cihaz ve Aletler	46
3.1.3 Bitki Materyali	46
3.2 Yöntem.....	47
3.2.1 Tohum yüzey sterilizasyonun yapılması ve tohum kültürlerinin kurulması	47
3.2.2 Tohumların çimlendirilmesi ve steril fidelerin elde edilmesi	49
3.2.3 Kallus kültürlerinin ve tuz stresinin oluşturulması	49
3.2.4 Morfolojik gözlem parametreleri	50
3.2.5 Fizyolojik gözlem parametreleri	52
3.2.6 Biyokimyasal Parametreler	53
4. BULGULAR	58
4.1 Morfolojik Gözlem Parametreleri.....	58
4.1.1 Kallus Rengi	58
4.1.2 Kallus Yapısı	65
4.1.3 Kallus Oluşum Yüzdesi.....	66
4.1.4 Kallusların Kararma Yüzdesi	67
4.1.5 Kallusların Kontaminasyon Yüzdeleri	67
4.2 Fizyolojik Parametreler.....	68
4.2.1 Kallusların Yaş Ağırlıkları	68
4.2.2 Kallus Kuru Ağırlıkları	76
4.2.3 Kuru Ağırlığın Yaş Ağırlığa Oranı	79
4.3 Biyokimyasal Parametreler	80
4.3.1 Protein Tayini	80
4.3.2 Klorofil Miktarı	82
4.3.3 Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂) Miktarı	92
4.3.4 Malondialdehit (MDA) Miktarı	94
4.3.5 Prolin Miktarı	96
4.3.6 Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi	98
4.3.7 Katalaz (CAT) Aktivitesi	101
4.3.8 Peroksidaz (POX) Aktivitesi	104
4.3.9 Askorbat Peroksidaz (APX) Aktivitesi	107
4.3.10 Glutatyon Redüktaz (GR) Aktivitesi.....	110

5. TARTIŞMA.....	116
6. ÖNERİLER	127
KAYNAKLAR.....	128



ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1: Atom içerisinde bulunan eşleşmemiş elektron.....	10
Şekil 2.2: Oksidatif Hasar.....	11
Şekil 2.3: Serbest radikal oluşumu.	12
Şekil 2.4: Süperoksit radikalinin ($O_2^{\bullet-}$) oluşma tepkimesi.....	13
Şekil 2.5: Süperoksit radikalinin hidrojen peroksit (H_2O_2) dönüşme tepkimesi	13
Şekil 2.6: Suyun iyonizasyonu ile hidroksil radikali ve hidrojen peroksidin meydana gelme tepkimesi.	13
Şekil 2.7: Peroksidasyon zinciri tepkimesi	14
Şekil 2.8: Haber-Weiss ve Fenton reaksiyonu ile hidroksil radikali oluşum tepkimleri	14
Şekil 2.9: Serbest radikallerin hücrel hedefleri.	18
Şekil 2.10: Antioksidanların sınıflandırılması.....	20
Şekil 2.11: SOD'un dismutasyon tepkimesi.....	20
Şekil 2.12: Hidrojen peroksidin kataliz tepkimesi.....	21
Şekil 2.13: Glutasyon peroksidaz enziminin katalizlediği tepkime.....	21
Şekil 2.14: Glutasyon redüktaz enziminin katalizlediği tepkime.	22
Şekil 2.15: Asada-Halliwell yolu.....	23
Şekil 2.16: Askorbik asit kimyasal yapısı	24
Şekil 2.17: Beta Karotenoid yapısı.	25
Şekil 2.18: Bitkilerde çeşitli faktörlere bağlı olarak ortaya çıkan stres cevapları.....	30
Şekil 2.19: Modifiye edilmiş, tuz stresi altında iki fazlı bitki büyüme modeli	32
Şekil 3.1: Steril Fide	49
Şekil 3.2: Kallus renk skalasında yeşil renge sahip kallus olarak nitelendirilen kallus rengi	51
Şekil 3.3: Kallus renk skalasında krem renge sahip kallus olarak nitelendirilen kallus rengi	51
Şekil 3.4: Kallus renk skalasında kahverengine sahip kallus olarak nitelendirilen kallus rengi	51

Şekil 4.1: NM-503 çeşidine ait kallusların kontrol grubunun 4 haftalık gözlemde görüntüleri	58
Şekil 4.2: NM-503 çeşidine ait kallusların 100 mM NaCl uygulanan grubun 4 haftalık gözlemde görüntüleri.....	59
Şekil 4.3: NM-503 çeşidine ait kallusların 200 mM NaCl uygulanan grubun 4 haftalık gözlemde görüntüleri.....	59
Şekil 4.4: NM-503 çeşidine ait kallusların 400 mM NaCl uygulanan grubun 4 haftalık gözlemde görüntüleri.....	60
Şekil 4.5: Carmen çeşidine ait kallusların kontrol grubunun 4 haftalık gözlemde görüntüleri	60
Şekil 4.6: Carmen çeşidine ait kallusların 100 mM NaCl uygulanan grubun 4 haftalık gözlemde görüntüleri.....	61
Şekil 4.7: Carmen çeşidine ait kallusların 200 mM NaCl uygulanan grubun 4 haftalık gözlemde görüntüleri.....	62
Şekil 4.8: Carmen çeşidine ait kallusların 400 mM NaCl uygulanan grubun 4 haftalık gözlemde görüntüleri.....	63
Şekil 4.9: Tuz stresi uygulanan her iki çeşitte değişen konsantrasyonlara bağlı olarak büyüyen kalluslarda yeşil renge sahip kallusların yüzde olarak dağılımı. .	64
Şekil 4.10: Tuz stresi uygulanan her iki çeşitte değişen konsantrasyonlara bağlı olarak büyüyen kalluslarda krem renge sahip kallusların yüzde olarak dağılımı..	64
Şekil 4.11: Tuz stresi uygulanan her iki çeşitte değişen konsantrasyonlara bağlı olarak büyüyen kalluslarda kahve renge sahip kallusların yüzde olarak dağılımı.	65
Şekil 4.12: Tuz stresi uygulanan her iki çeşitte değişen konsantrasyonlara bağlı olarak büyüyen kallusların yapısının yüzde olarak dağılımı.	66
Şekil 4.13: Carmen ve NM-503 çeşitlerine ait kallus oluşum yüzdeleri.	66
Şekil 4.14: Carmen ve NM-503 çeşitlerine ait kararan kallusların yüzde olarak gösterimi.	67
Şekil 4.15: Tuz stresi uygulanan her iki çeşide ait değişen konsantrasyonlara bağlı olarak büyüyen kalluslarda kontaminasyona uğrayan kallusların yüzde olarak dağılımı.	68
Şekil 4.16: Carmen çeşidine ait tekerrürlerden elde edilen toplam yaş kallus ağırlığı.....	71
Şekil 4.17: NM-503 çeşidine ait tekerrürlerden elde edilen toplam yaş kallus ağırlığı.....	71

Şekil 4.18: NM-503&Carmen çeşidine ait tekerrürlerden elde edilen toplam yaş kallus ağırlığı.	72
Şekil 4.19: Carmen çeşidine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda tuz uygulanması sonucu 1 g kallus başına elde edilen ortalama kallus ağırlığı.	75
Şekil 4.20: NM-503 çeşidine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda tuz uygulanması sonucu 1 g kallus başına elde edilen ortalama kallus ağırlığı.	75
Şekil 4.21: Carmen çeşidine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda tuz uygulanması sonucu 1 g kallusun kuru ağırlık miktarı.....	78
Şekil 4.22: NM-503 çeşidine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda tuz uygulanması sonucu 1 g kallusun kuru ağırlık miktarı.....	78
Şekil 4.23: Carmen ve NM-503 pamuk çeşidine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda tuz uygulanması sonucu 1 g kallusun kuru ağırlık miktarı....	79
Şekil 4.24: Çeşitlerin kuru ağırlıklarının ortalamalarının tekerrür başına ortalama yaş ağırlıkları ile karşılaştırılması.....	80
Şekil 4.25: İki çeşide ait, μmol^{-1} g cinsinden çözülebilir protein miktarı.	82
Şekil 4.26: Carmen ve NM-503 çeşitlerine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda tuz uygulanması sonucu kallusların klorofil a miktarı.	85
Şekil 4.27: Carmen ve NM-503 pamuk çeşitlerine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda tuz uygulanması sonucu kallusların klorofil b miktarı.	87
Şekil 4.28: Carmen ve NM-503 pamuk çeşitlerine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda tuz uygulanması sonucu elde edilen total klorofil grafiği.	89
Şekil 4.29: Carmen ve NM-503 çeşitlerine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda tuz uygulanması sonucu kallusların total karotenoid miktarı.	92
Şekil 4.30: Carmen ve NM-503 pamuk çeşitlerine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda tuz uygulanması sonucu analizlenen hidrojen peroksitin mikromol-1 g cinsinden miktarları	94
Şekil 4.31: Carmen ve NM-503 pamuk çeşitlerine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda tuz uygulanması sonucu MDA miktarı.....	96
Şekil 4.32: Carmen ve NM-503 pamuk çeşitlerine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda tuz uygulanması sonucu analizlenen kallusların prolin miktarı.	98
Şekil 4.33: Carmen ve NM-503 pamuk çeşitlerine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda tuz uygulanması sonucu kallusların SOD aktivite miktarı. .	101

Şekil 4.34: Carmen ve NM-503 pamuk çeşitlerine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda tuz uygulanması sonucu CAT aktivite miktarı.....	104
Şekil 4.35: Carmen ve NM-503 pamuk çeşitlerine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda tuz uygulanması sonucu kallusların POX aktivitesi.....	107
Şekil 4.36: Carmen ve NM-503 pamuk çeşitlerine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda tuz uygulanması sonucu kallusların APX aktivitesi.....	110
Şekil 4.37: Carmen ve NM-503 pamuk çeşitlerine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda tuz uygulanması sonucu GR aktivitesi	112
Şekil 4.38: Carmen ve NM-503 pamuk çeşitlerine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda tuz uygulanması sonucu kallusların % inhibisyon oranları.	115



ÇİZELGE DİZİNİ

Çizelge

Sayfa

Çizelge 1.1: Dünya Pamuk Üretiminin Ülkelere Göre Dağılımı.....	3
Çizelge 1.2: Dünyadaki Pamuk Tüketiminin Ülkelere Göre Dağılımı	4
Çizelge 1.3: Dünyadaki Pamuk İthalatının Ülkelere Göre Dağılımı.....	4
Çizelge 1.4: Türkiye Pamuk Ekim Alanları'nın Bölgelere Göre Dağılımı.	5
Çizelge 1.5: Türkiye Pamuk Lifi Üretim ve Tüketimi	6
Çizelge 3.1: MS ortam kompozisyonu.	48
Çizelge 4.1: Carmen ve NM-503 pamuk çeşitlerine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda NaCl uygulanması sonucu tekerrür başına elde edilen toplam yaş kallus ağırlığı.....	69
Çizelge 4.2: Carmen ve NM-503 pamuk çeşitlerine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda NaCl uygulanması sonucu tekerrür başına elde edilen toplam yaş kallus ağırlığı.....	70
Çizelge 4.3: Carmen ve NM-503 pamuk çeşitlerine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda NaCl uygulanması sonucu 1 gr kallus başına elde edilen ortalama kallus ağırlığı	73
Çizelge 4.4: Carmen ve NM-503 pamuk çeşitlerine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda NaCl uygulanması sonucu 1 gr kallus başına elde edilen ortalama kallus ağırlığı	74
Çizelge 4.5: Carmen ve NM-503 pamuk çeşitlerine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda NaCl uygulanması sonucu 1 gram kallusun kuru ağırlık miktarlarının iki yönlü varyans analizi.	77
Çizelge 4.6: Carmen ve NM-503 pamuk çeşitlerine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda NaCl uygulanması sonucu 1 gram kallusun kuru ağırlık miktarları	77
Çizelge 4.7: Carmen ve NM-503 pamuk çeşitlerine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda NaCl uygulanması sonucu analizlenen kallusların protein miktarının iki yönlü varyans analizi	81
Çizelge 4.8: Carmen ve NM-503 pamuk çeşitlerine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda NaCl uygulanması sonucu analizlenen kallusların proteinlerim μmol^{-1} g cinsinden miktarı.....	81

Çizelge 4.9: Carmen ve NM-503 pamuk çeşitlerine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda NaCl uygulanması sonucu elde edilen klorofil a miktarının iki yönlü varyans analizi	83
Çizelge 4.10: Carmen ve NM-503 pamuk çeşitlerine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda NaCl uygulanması sonucu kallusun klorofil a miktarı.	84
Çizelge 4.11: Carmen ve NM-503 pamuk çeşitlerine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda NaCl uygulanması sonucu elde edilen klorofil b miktarının iki yönlü varyans analizi.	86
Çizelge 4.12: Carmen ve NM-503 pamuk çeşitlerine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda NaCl uygulanması sonucu elde edilen klorofil b miktarları ve standart hataları.....	86
Çizelge 4.13: Carmen ve NM-503 çeşitlerine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda NaCl uygulanması sonucu total klorofil miktarlarının iki yönlü varyans analiz sonuçları.	88
Çizelge 4.14: Carmen ve NM-503 çeşitlerine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda NaCl uygulanması sonucu total klorofil miktarları ve standart hataları.	88
Çizelge 4.15: Carmen ve NM-503 pamuk çeşitlerine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda NaCl uygulanması sonucu kallusların total karotenoid miktarı.....	91
Çizelge 4.16: Carmen ve NM-503 pamuk çeşitlerine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda NaCl uygulanması sonucu kallusların total karotenoid miktarları ve standart hataları.	91
Çizelge 4.17: Carmen ve NM-503 pamuk çeşitlerine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda NaCl uygulanması sonucu elde edilen hidrojen peroksit miktarının iki yönlü varyans analiz sonuçları.....	93
Çizelge 4.18: Carmen ve NM-503 pamuk çeşitlerine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda NaCl uygulanması sonucu hidrojen peroksit miktarı ve standart hataları.....	93
Çizelge 4.19: Carmen ve NM-503 pamuk çeşitlerine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda tuz uygulanması sonucu MDA miktarlarının iki yönlü varyans analizi.....	95

Çizelge 4.20: Carmen ve NM-503 pamuk çeşitlerine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda tuz uygulanması sonucu analizlenen kalluslardaki MDA miktarları ve standart hataları.	95
Çizelge 4.21: Carmen ve NM-503 pamuk çeşitlerine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda NaCl uygulanması sonucu analizlenen kallusların prolin miktarlarının iki yönlü varyans analizi.	97
Çizelge 4.22: Carmen ve NM-503 pamuk çeşitlerine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda NaCl uygulanması sonucu analizlenen kallusların prolin miktarları ve standart hataları.	97
Çizelge 4.23: Carmen ve NM-503 pamuk çeşitlerine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda NaCl uygulanması sonucu elde edilen kallusların SOD analizinin iki yönlü varyans analizi.	100
Çizelge 4.24: Carmen ve NM-503 pamuk çeşitlerine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda NaCl uygulanması sonucu elde edilen kallusların SOD analizinden elde edilen sonuçlar.	100
Çizelge 4.25: Carmen ve NM-503 pamuk çeşitlerine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda NaCl uygulanması sonucu kallusların CAT aktivitesinin iki yönlü varyans analizi.	103
Çizelge 4.26: Carmen ve NM-503 pamuk çeşitlerine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda NaCl uygulanması sonucu kallusların CAT aktivitesi ve standart hataları.	103
Çizelge 4.27: Carmen ve NM-503 pamuk çeşitlerine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda NaCl uygulanması sonucu analizlenen kallusun peroksidaz aktivitesinin CAT aktivitesinin iki yönlü varyans analizi.	105
Çizelge 4.28: Carmen ve NM-503 pamuk çeşitlerine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda NaCl uygulanması sonucu analizlenen kallusun peroksidaz aktivitesinin CAT aktivitesi miktarları.	106
Çizelge 4.29: Carmen ve NM-503 pamuk çeşitlerine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda NaCl uygulanması sonucu analizlenen kallusların APX miktarlarının iki yönlü varyans analizi.	109
Çizelge 4.30: Carmen ve NM-503 pamuk çeşitlerine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda NaCl uygulanması sonucu analizlenen kallusların APX miktarları ve standart hataları.	109

Çizelge 4.31: Carmen ve NM-503 pamuk çeşitlerine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda NaCl uygulanması sonucu GR aktivitelerinin iki yönlü varyans analizi	111
Çizelge 4.32: Carmen ve NM-503 pamuk çeşitlerine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda NaCl uygulanması sonucu GR aktiviteleri ve standart hataları.	112
Çizelge 4.33: Carmen ve NM-503 pamuk çeşitlerine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda NaCl uygulanması sonucu DPPH miktarlarının iki yönlü varyans analizi.	114
Çizelge 4.34: Carmen ve NM-503 pamuk çeşitlerine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda NaCl uygulanması sonucu analizlenen kallusların % inhibisyon oranları ve standart hataları.	114

SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
°C	Santigrat derece
μl	Mikrolitre
μM	Mikromol
μmol	Mikromolar
APX	Askorbat peroksidaz
CAT	Katalaz
Chla	Klorofil a
Chlb	Klorofil b
cm	Santimetre
Cu	Bakır
DAB	3,3' diaminobenzidin
DNA	Deoksiribonükleik asit
EC	Etkili konsantrasyon
EDTA	Etilen diamin tetraasetik asit
Fe	Demir
g	Gram
GR	Glutasyon redüktaz
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
KH ₂ PO ₄	Potasyum fosfat
KI	Potastyum iyodür
L	Litre
LC	Limit konsantrasyon

LSD	En küçük anlamlı farklar testi
M	Molar
MDA	Malondialdehit
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
Mn	Mangan
MS	Murashige ve Skoog ortamı
NADP(H)	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NBT	Nitroblue tetrazolyum
nm	Nanometre
nM	Nanomolar
NOEC	Etkisi gözlemlenmemiş konsantrasyon
NTB	Nitrotetrazolyum blue
P	Prolin
pH	Hidrojen gücü
POX	Peroksidaz
ppm	Her bir milyondaki partikül sayısı
PS-II	Fotosistem II
PVP	Polivinil pirolidon
rpm	Dakikadaki devir sayısı
SH	Standart hata
SOD	Süperoksit dismutaz
TA	Taze ağırlık

TBA	Tiyobarbitürik asit
TCA	Trikloroasetik asit
<i>TÜİK</i>	<i>Türkiye İstatistik Kurumu</i>
v/v	Hacim solüsyon
w/v	Yüzde solüsyon



1. GİRİŞ

Malvaceae (ebegümeciler) ailesinden, *Malvales* takımının bir üyesi olan pamuk bitkisi *Gossypium* sınıfına aittir ve 18.yüzyılın ortalarında Linneaus tarafından isimlendirilmiştir. Upland pamuk, Amerikan pamuğu ya da Meksika pamuğu olarak yaygın çeşitleriyle bilinir. Pamuğa verilen “cotton” kelimesi Arapça “*quon*” kelimesi kökenlidir ve tohum kabukları etrafında eğrilebilir (bükülebilir) lif (pamuk tiftiği) üreten anlamına gelmektedir (Akyol, 2015).

Dünyada, kuzey yarı küre içinde 37° N ve Asya Ukrayna’da 47° N ile Güney yarı kürede 35° S enlem dereceleri arasında “Pamuk Kuşağı” (Cotton Belt) denen aralıkta yetişmektedir (Gürel ve ark, 2012). “Pamuk” *G. hirsutum* L., *G. barbadense* L., *G. arboreum* L., *G. herbaceum* L. olmak üzere toplamda 4 türü kapsamaktadır. Günümüzde en fazla kullanılan tür olan *G. hirsutum*, dünya pamuk üretiminin %90’ından fazlasını oluşturmaktadır (Akyol, 2015).

Pamuk bitkisi, önemli kullanım alanlarıyla ve istihdam olanaklarıyla yetiştiriciliğinin yapıldığı ülkelerde büyük ekonomik öneme sahiptir (Abdellatef and Khalafallah, 2008). Pamuk dünyada yetiştirilen lif bitkileri ekim alanlarının yaklaşık %90’ını kapsamaktadır. Endüstri bitkileri arasında en çok ekim alanına ve üretim önemine sahip olan ve ihracatta önemli bir yer edinen pamuk bitkisi diğer kültür bitkilerine göre daha fazla girdi kullanımına ihtiyaç duymaktadır (Dinç, 2017). Pamuk (*Gossypium hirsutum* L.) bitkisi yapısındaki lifleri nedeni ile ideal bir tekstil ürünüdür. Lif üretiminin yanı sıra, tohumları ile yüksek oranda yağ ve protein içeren küspesi de önemli bir yem kaynağı olarak değerlendirilmektedir.

Ayrıca tohumları üzerinde bulunan havlar; selüloza gereksinim duyan sicim, lamba-mum fitili, halı ipliği, tıbbi pamuk, fotoğraf filmi, plastik, rayon (suni ipek) ve barut yapımı gibi çok sayıda endüstri kolunda da kullanılmaktadır (Abdellatef and Khalafallah, 2008). Petrole seçenек olarak tohumundan elde edilen yağı biyodizel üretiminde ana madde olarak değerlendirilmektedir. Bu nedenle pamuk bitkisi, tarım ürünleri arasında yüksek sosyal ve ekonomik öneme sahip, tarım sanayi bütünleşmesinde önemli rol oynayan bir endüstri bitkisidir. Ayrıca artan nüfusun ihtiyaçlarının karşılanması adına pamuk bitkisi yetiştiriciliği önemli hale gelmiştir (Dinç, 2017).

Dünya pamuk üretiminin tamamı, pamuğun (*G. hirsutum*, *G. barbadense*, *G. herbecaum*, ve *G. arboretum*) türlerinden elde edilmektedir. Verim değeri ortalamaya göre yüksek olan *G. hirsutum* türü, dünyada yetiştiriciliği yapılan pamukların toplamda yaklaşık % 95'ini oluşturmaktadır. Bu yüzden ülkemizde yetiştiriciliği yapılan pamuk çeşitlerinin tamamı *Gossypium hirsutum* L. türüne aittir (Köken, 2017).

Yetiştiricilik yapılan bölgelerde pamuk üretim tekniklerinin ve ekolojik şartların farklılığı, birbirleri ile aynı olmayan genetik çeşitliliğe sahip pamuk türlerinin üretilmesine sebep olmuştur. Günümüzde pamuk üretiminde verim ve kalitenin artırılması temel amaçtır. Bu amaçlar doğrultusunda yapılan çalışmalar; genellikle yetiştiricilik sırasında maliyetlerin azaltılması, kütlü ve çırcır veriminin artırılması, hastalık ve zararlılara karşı dayanıklılığın sağlanması ve erkenci çeşitlerin geliştirilmesine yöneliktir (Gençer ve ark., 2005).

Dünya nüfusunun artması ile birlikte hızla gelişen tekstil sanayisinin en önemli doğal hammaddesini oluşturan pamuk, diğer yan ürünleri ile de insanların çeşitli gereksinimlerini karşılamakta ve istihdam olanağı yaratmaktadır. Pamuk linterinin çok çeşitli kullanım alanları olmasına rağmen, ülkemizde bu maddeyi işleyen firma yok denecek kadar az olduğundan neredeyse tamamı ihraç edilmektedir. İhracatının yapıldığı ülkeler arasında ilk sırada yer alan Çin'i Amerika, Japonya, İspanya, İsrail, Rusya ve İran izlemektedir (Anonim 2018).

Amerika Birleşik Devletleri Tarım Bölümü Dış Tarım Servisi'nin yayınladığı rapora göre Türkiye, 2018/2019 sezonunda Pamuk üreten ülkeler arasında 6. sırada, pamuk tüketiminde 6.sırada, pamuk ithalatında ise 4.sırada yer almaktadır (Çizelge 1.1, Çizelge 1.2, Çizelge 1.3).

Çizelge 1.1: Dünya Pamuk Üretiminin Ülkelere Göre Dağılımı (Amerika Birleşik Devletleri Tarım Bölümü Dış Tarım Servisi, 2019)

Dünya Pamuk Üretiminin Ülkelere Göre Dağılımı (1000 Balya)					
Üretim	2014/2015	2015/2016	2016/2017	2017/2018	2018/2019
Brezilya	7,180	5,920	7,020	9,220	12,800
Çin	30,000	22,000	22,750	27,500	27,750
Hindistan	29,500	25,900	27,000	29,000	25,500
Pakistan	10,600	7,000	7,700	8,200	7,700
Türkiye	3,200	2,650	3,200	4,000	3,700
Amerika Birleşik Devletleri	16,319	12,888	17,170	20,923	18,367
Özbekistan	3,900	3,800	3,725	3,860	3,300
Diğer Ülkeler	18,520	15,998	18,116	21,079	19,317
Toplam	119,219	96,156	106,681	123,782	118,434

Çizelge 1.2: Dünyadaki Pamuk Tüketiminin Ülkelere Göre Dağılımı (Amerika Birleşik Devletleri Tarım Bölümü Dış Tarım Servisi, 2019)

Dünyadaki Pamuk Tüketiminin Ülkelere Göre Dağılımı (Balya)					
Tüketim	2014/2015	2015/2016	2016/2017	2017/2018	2018/2019
Bangladeş	5,800	6,300	6,800	7,500	8,000
Brezilya	3,400	3,100	3,200	3,400	3,500
Çin	34,500	36,000	38,500	41,000	40,500
Hindistan	24,500	24,750	24,350	24,150	24,800
Endonezya	3,250	3,000	3,300	3,500	3,200
Pakistan	10,600	10,300	10,300	10,800	10,600
Türkiye	6,400	6,700	6,550	7,450	6,500
Amerika Birleşik Devletleri	3,575	3,450	3,250	3,225	3,100
Özbekistan	1,750	1,800	2,000	2,500	2,750
Vietnam	4,100	4,500	5,400	6,700	7,000
Diğer Ülkeler	14,356	13,337	12,532	12,544	12,757
Toplam	112,231	113,237	116,182	122,769	122,707

Çizelge 1.3: Dünyadaki Pamuk İthalatının Ülkelere Göre Dağılımı (1000 Balya) (Amerika Birleşik Devletleri Tarım Bölümü Dış Tarım Servisi, 2019).

Dünyadaki Pamuk İthalatının Ülkelere Göre Dağılımı (Balya)					
İthalat	2014/2015	2015/2016	2016/2017	2017/2018	2018/2019
Bangladeş	5,750	6,375	6,800	7,600	8,000
Çin	8,284	4,406	5,032	5,725	8,500
Hindistan	1,226	1,072	2,736	1,677	1,400
Endonezya	3,345	2,941	3,391	3,498	3,200
Kore	1,321	1,175	1,025	904	800
Meksika	830	975	1,000	925	850
Pakistan	950	3,300	2,450	3,300	3,000
Tayland	1,475	1,275	1,226	1,149	1,175
Türkiye	3,675	4,218	3,679	4,024	3,000
Viyetnam	4,275	4,600	5,500	7,000	7,100
Diğer	4,934	5,107	4,857	5,246	5,003
Toplam	36,065	35,444	37,696	41,048	42,028

Nüfus artışı ve yaşam standardının yükselmesi, pamuk bitkisine olan talebi de artırmaktadır. Bu yönleriyle pamuğa olan ihtiyaç, tüm dünyada ve ülkemizde artış göstermektedir. Türkiye, dünyadaki en büyük 10 pamuk üreticisinden biri olmasına rağmen, Türkiye ekonomisinde pamuğun önemi çok fazla vurgulanmamaktadır. Türkiye’de Ege Bölgesinde, Güneydoğu Anadolu Bölgesinde, Antalya-Çukurova yörelerinde pamuk yetiştiriciliği yapılmaktadır (Aydın, 2018).

Çizelge 1.4’te son 20 yılın bölgelere göre pamuk ekim alanları verilmiştir. 1995’ten bu yana pamuk tarımı yapılan tüm bölgelerde büyük ekim azalışları yaşanmıştır. Buna rağmen Güneydoğu Anadolu Bölgesi’nde ekim alanlarının azalmayıp aksine % 16,70’lik artışının sebebini Güneydoğu Anadolu Projesi ve buna bağlı olarak artan sulama olanaklarının gelişmesi olarak açıklayabiliriz (Köken, 2017).

Çizelge 1.4: Türkiye Pamuk Ekim Alanları’nın Bölgelere Göre Dağılımı (Köken, 2017).

YIL	Güneydoğu Anadolu	Ege	Çukurova	Antalya	Toplam
1995	2.040	2.490	2.720	300	7.560
2000	3.160	2.010	1.230	126	6.540
2005	2.950	1.370	1.080	54	5.460
2010	2.870	8.260	1.060	41	4.800
2015	2.640	910	716	62	4.340
2016	2.380	9.44	732	59	4.140
1995-2016 Değişim	% 16.7	% 62.2	% 73.1	% 80.3	% 45

Çizelge 1.5’te yer alan 5 üretim sezonu ortalamaları incelendiğinde, ülkemizde üretilen pamuk lifi miktarının, tükettiğimiz yarısını ancak karşılayabildiği görülmektedir.

Çizelge 1.5: Türkiye Pamuk Lifi Üretim ve Tüketimi (Bin Ton) (Köken, 2017).

Yıl	Üretim	Tüketim	Fark	Üretimin Tüketim Fark Oranı (%)
2012/2013	858	1360	-502	63.0
2013/2014	877	1400	-640	62.6
2014/2015	846	1486	-525	56.9
2015/2016	738	1500	-762	49.2
2016/2017	756	1450	-694	52.1
Ortalama	815	1440	-625	56.8

Son dönemlerde, özellikle pamuk bitkisinde olmak üzere stres faktörlerine karşı dayanıklı çeşitlerin belirlenmesi amacıyla *in vitro* teknikler kullanılarak yapılan çalışmaların arttığı görülmektedir. *In vitro* tekniklerin başarısı ise rejenerasyon sisteminin güvenilir bir şekilde oturtulmasına bağlıdır (Zhang et al., 2000).

Pamukta embriyo, sürgün ucu, meristem ve kallus gibi *in vitro* kültür metotları ile bitkiciklerin üretildiği bilinmektedir. Ayrıca pamuğun *in vitro* üretimi oldukça zordur. Geleneksel yöntemlerle ıslah edildiğinde zaman alması, lif kalitesi başta olmak üzere istenen özelliklerin elde edilen hatlarda bulunmaması gibi nedenlerle bu yöntemler pamuğun geliştirilmesini kısıtlamaktadır. Pamukta elde edilen çoğu ticari çeşitlerin, saf hatların çaprazlanması ile uzun yıllar süren seleksiyon metoduyla elde edildiği bilinmektedir (İzci, 2007).

Bu zamana kadar, en önemli abiyotik stres faktörlerinden biri olarak bilinen tuz stresine ve diğer streslere karşı dayanıklı çeşitlerin seçimi için daha çok geleneksel ıslah yöntemleri tercih edilmiştir. Tuzluluğa dayanıklı olan çeşitlerin kullandıkları tolerans mekanizmasının anlaşılması, geleneksel ıslah yöntemlerine de yol gösterecektir (Kramer, 1983). Bir bitki genotipinde tuz stresine tolerans sağlayan parametreler çok fazla olduğu için ve bu parametrelerin tümünün belirlenmesini sağlayacak tek bir yöntem olmadığı için bitkilerin tuz stresine karşı toleranslarını ölçecek farklı kriterler vardır (Weimberg, 1988).

Tuz stresi çalışmalarında, tarama ve seleksiyon amacıyla bitki doku kültürleri kullanılmaktadır. Aynı tür içerisinde bile tuza karşı farklı düzeylerde farklı tolerans düzeyleri görülmektedir. Bunun belirlenmesi için yetiştiricilik yapılan topraktaki ya da

kullanılan sulama suyundaki tuzluluk miktarına göre bitkisel materyalin seçiminin uygun olması çok önemlidir. Klasik ıslah yöntemlerinde, yetiştirilen bitkiye özellikle fide döneminde uygulanan tuz stresine karşı en yüksek tolerans gösteren genotipin belirlenebilmesi mümkün olsa bile bu yöntem zaman alıcıdır. Ayrıca fazla bitki materyali gerekmesinin yanında, sera alanına da ihtiyaç duyulur. Doku kültürü yöntemlerinin kullanılması, klasik ıslah yöntemlerinin getirdiği olumsuzlukları ortadan kaldırarak çevresel faktörden gelebilecek farklılıkların engellendiği kontrollü bir çalışma ortamı yaratmaktadır (Ellialtıoğlu&Tıprıdamaz, 1988).

Doku kültürü, tuza toleranslı bitkilerin fizyolojik ve biyokimyasal mekanizmalarını aydınlatmak için yapılan çalışmalarda yoğun kullanılmaktadır. Denemelerin *in vitro*'da yapılması ile fizyolojik çalışmaların kontrollü olması durumunda pek çok avantaj sağlar. Meydana gelen farklılıkların sadece uygulanan protokol sebebiyle olduğundan emin olunduğu gibi ve sonuçların da kısa sürede elde edilmesi mümkündür (İzci, 2007). Tuz stresi çalışmalarında doku kültürünün kullanılmasındaki bir diğer avantaj da doku kültürünün bir yöntemi olan protoplast kültürü aracılığıyla normalde melezlenmeyen türlerin somatik hibridizasyon yoluyla melezlenebilmesidir. Bu yöntem kullanılarak tuza tolerant yabancı türler ile kültür çeşitlerinde yapılan somatik hibridizasyon çalışması sonucunda yeni genetik türler oluşturulabilecektir. Bu da tuza tolerant çeşit geliştirmek için kullanılacak iyi bir yol olarak bildirilmiştir (Finch et al., 1990).

Bitki doku kültürü çalışmalarının somaklonal varyasyondan yararlanması bir diğer avantajdır. Kallus ve hücre kültürü yöntemleri ile tuza dayanıklı hatların eldesi için yapılan çalışmaların bazı kültür bitkilerinde başarı sağladığı bildirmiştir (Yeo&Flowers, 1993)

Bitkilerde tuz toleransı ile ilgili fizyolojik ve biyokimyasal mekanizmaların aydınlatılması, tuz stresinin olumsuz etkilerini azaltmak ve bitkilerde tuzluluk toleransını arttırmak için gereklidir. Bu tez çalışmasında tuzluluğa toleranslı ve duyarlı olduğu bilinen iki farklı pamuk çeşidinin kalluslarına (NM-503 ve Carmen) tuz stresi uygulanarak incelenecek olan parametrelerin (antioksidan enzim aktivite analizleri, MDA, H₂O₂, prolin, klorofil, DPPH antioksidan aktivite testleri) değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda çeşitlerin tuza dayanıklılıkları belirlenerek *in vitro* seleksiyon çalışmalarına ışık tutulması hedeflenmiştir. Yapılan bu

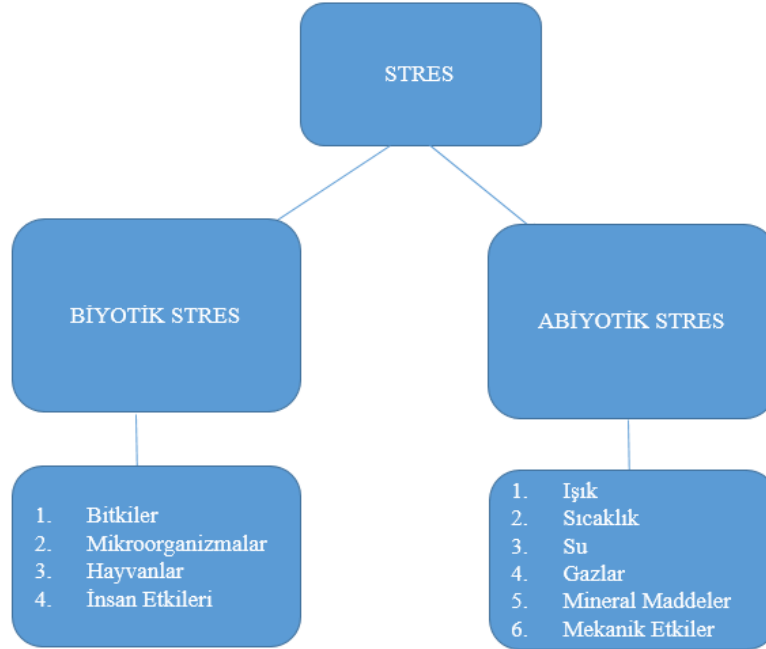
tür çalışmalar, ileride tuza tolerant hatların seleksiyonu için arazide gerçekleştirilecek olan ıslah çalışmalarına yol açacak olmasının yanında, doku kültürü yöntemleri kullanılarak *in vitro*'da daha kısa sürede sonuç alınabilmesinin mümkün olduğunu da gösterebilecektir.



2. LİTERATÜR BİLDİRİŞLERİ

2.1 Bitkiler ve Stres

Değişen çevre koşulları ve hızla artan dünya nüfusu; temel besin ihtiyaçlarının karşılanabilmesini, kültür bitkilerinin ekim alanlarının genişletilmesini, tarımda birim alandan daha yüksek ve kaliteli ürün almayı zorunlu hale getirmiştir. Bitkiler yaşamları boyunca, gelişimlerini engelleyen çeşitli olumsuz koşullarla karşılaşır. Lewitt (1980) stresin tanımını “canlılar için elverişsiz çevre koşulları” olarak yapmıştır. Bu elverişsiz koşullara neden olan faktörler “stres” olarak adlandırılmaktadır. Stres etmenleri günümüze gelene kadar farklı şekillerde gruplandırılmıştır. Oluşumlarına göre abiyotik ve biyotik stres faktörleri olmak üzere iki grupta incelenebilmektedir (Şekil 2.1). Abiyotik stres faktörleri soğuk, sıcak, kuraklık, tuzluluk, su fazlalığı, radyasyon, oksidatif stres, rüzgar ve toprakta besin yetersizliği gibi çevresel faktörlerdir. Biyotik stres faktörleri ise virüs, bakteri ve fungusları içeren patojenler, böcekler ve herbivorlardır. Stres faktörleri, temel fizyolojik ve metabolik olaylarda farklılıklara yol açarak, bitkilerde büyüme ve gelişmeyi olumsuz yönde etkilemekte, ürün, kalite ve miktarının azalmasına neden olmaktadır (Korkmaz ve Durmaz, 2017).



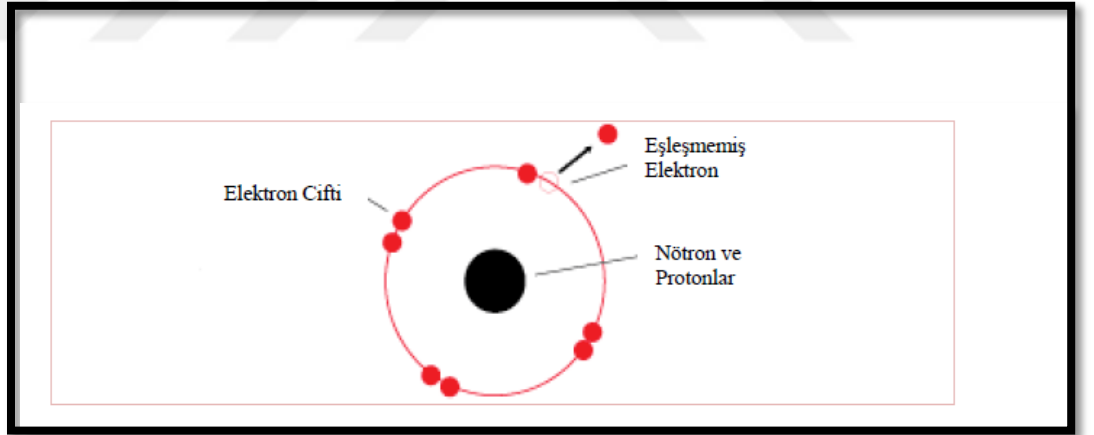
Şekil 2.1: Bitki büyümesi ve gelişmesinde etkili olan stres faktörleri (Alexieva et al., 2003; Lewitt, 1980).

2.2 Reaktif Oksijen Türleri (ROS)

Serbest radikaller, son yörüngelerinde bir veya daha fazla ortaklanmamış elektronu olan molekül ya da atomlara verilen addır (Şekil 2.2). Son yörüngelerindeki eşleşmemiş elektronu doldurup kararlı hale gelebilmek için başka elektronlara ilgi duyduklarından oldukça reaktiflerdir (Cheeseman and Slater., 1993).

Bütün canlılar için temel gereksinim elementlerinden olan oksijen; hidrojen, karbon, azot ve kükürt ile bileşik oluşturarak organik moleküllerin temelini oluşturur. Ancak aerobik canlıların metabolizmalarında gerçekleşen reaksiyonlar için gerekli olan oksijen, serbest radikallere de dönüşebilmektedir (Arasimowicz ve ark, 2009).

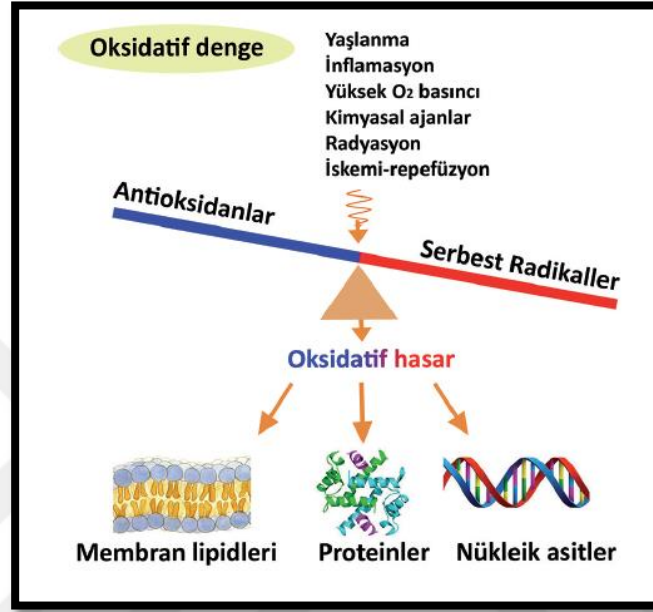
Reaktif oksijen türleri (ROS), normal metabolik reaksiyonlar esnasında ya da dış kaynaklar sebebiyle (çevre kirliliği, radyasyon vb.) meydana gelmektedirler. Lipitlere, proteinlere, DNA'ya zarar vermektedirler. Reaktif oksijen türleri (ROS) hayati önem taşıyan (kanser, kalp ve şeker hastalığı, damar sertliği gibi) hastalıkların oluşumunda görev alırlar (Moller et al., 2007; De Federicis et al., 2006, Imlay et al., 2008).



Şekil 2.1: Atom içerisinde bulunan eşleşmemiş elektron (<http://www.blessedherbs.com/internal-cleansing-kits-probiotics-antioxidants.aspx>).

Normal metabolik yolların işleyişinin doğal bir sonucu olarak serbest radikaller oluşmaktadır. Organizmalarda tüm yapım ve yıkım reaksiyonları sırasında ve sonrasında oksidan moleküller sürekli bir oluşum halindedirler. Oluşan oksidan moleküller endojen ya da eksojen antioksidanlar tarafından etkisizleştirilirler (Benzie, 2000).

Metabolizma enerji üretim işlemlerinin bir parçası olarak oksijenle reaksiyona girer. Bu kimyasal reaksiyonlar moleküllerin oksidasyonunu ve redoksunu içerir. Reaksiyon sonucu üretilen serbest radikaller, organizmada var olan veya ek olarak dışarıdan alınan antioksidanlarla dengelenemediğinde '*oksidatif stres*' oluşur (Yan, 1998) (Şekil 2.3).

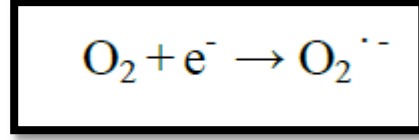


Şekil 2.2: Oksidatif Hasar (Özcan ve ark., 2015).

2.2.1 Süperoksit Radikali ($O_2^{\cdot-}$)

Süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$), Mehler reaksiyonu yoluyla çoğunlukla tilakoid membranına bağlı fotosistem I'de (PS I) tek elektron ile O_2 'nin indirgenmesiyle oluşur. Süperoksit radikalının oluşumu genellikle bir hücrenin mitokondrisinde gerçekleşir (Hsu et al., 2003). Serbest radikal olarak bilinen süperoksit hücreye tek başına doğrudan zarar veremez. H_2O_2 kaynağı ve geçiş metal iyonlarının indirgeyicisi olarak önem taşıyan süperoksit, SOD enzimi ile hidrojen peroksit ve oksijene dönüştürülür ve azaltılır. Böylece hücrel süperoksit düzeyleri kontrol altında tutulur (Mansouri ve ark, 2006; Peng ve ark, 2006).

Neredeyse tüm solunum yapan canlılarda bulunan moleküler oksijenin bir molekül aracılığıyla elektron transferi gerçekleştirerek süperoksit oluşturma tepkimesi Şekil 2.4'te verilmiştir (Yavaş, 2012).

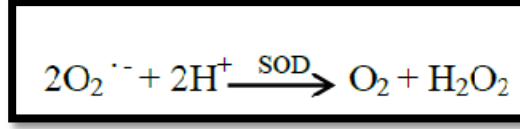


Şekil 2.3: Serbest radikal oluşumu (Yavaşer, 2012).

2.2.2 Hidrojen Peroksit (H_2O_2)

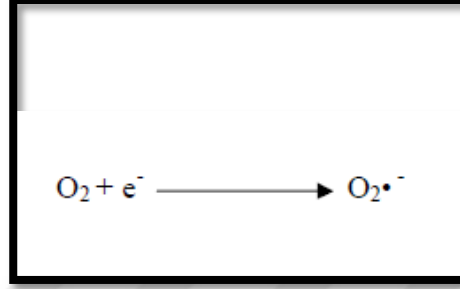
Hidrojen peroksiti kendiliğinden peroksizomlarda, gliksilat döngüsüyle, β -oksidasyonla ya da fotorespirasyon ile oluşur. Diğer kaynakları ise mitokondrideki elektron taşıma sistemi, kloroplast ve endoplazmik retikulumdur (Mittler, 2002). Süperoksit üreten herhangi bir sistem, dismutasyon tepkimesinin sonucunda H_2O_2 molekülünü de üretir. H_2O_2 zayıf bir oksidan ve geçiş metal iyonları yokluğunda kararlı ve aynı zamanda zayıf bir indirgendir. Kolaylıkla suya karışabilir ve canlı hücreler tarafından bir su molekülü olarak kabul edilir. Düşük konsantrasyonlarda sinyal molekülü olarak görev alır, sadece yüksek konsantrasyon varlığında toksiktir. Herhangi bir eşlenmemiş e^- taşımadığından dolayı serbest radikal olarak adlandırılmaz. Hidrojen peroksitin yükseltgenme ve indirgenme özelliği ile birlikte geçiş metal iyonlarının varlığında yüksek reaktif serbest radikal oluşturma kabiliyetinden ötürü canlı hücrelerin bunlara karşı savunma mekanizması vardır. İstenmeyen H_2O_2 ; katalaz, glutatyon peroksidaz ya da birtakım başka peroksidazların etkisi ile hücre dışına atılabilir. Ayrıca bu enzimlerle H_2O ve O_2 gibi ürünlere dönüştürülerek zararlı etkisi yok hale getirilir. H_2O_2 , reaktif geçiş metalleri varlığında, hidroksil radikali oluşumu için bir kaynak görevi görmektedir (Sewelam et al., 2012).

Nispeten radikalik bir tür olmamasına rağmen moleküler oksijen (O_2) ardarda indirgenerek reaktif oksijen türlerini oluşturur (Şekil 2.5). Bir e^- kazanarak süperoksit ($\text{O}_2^{\cdot -}$) radikale (Şekil 2.6), 2 e^- alarak hidrojen peroksit (H_2O_2), 3 e^- alarak hidroksil ($\text{OH}^{\cdot}$) radikale dönüşür (Şekil 2.7). Bu tepkimeye dismutasyon tepkimesi adı verilir. SOD enzimi yüksek katalitik etkiye sahip olduğu için hücrelerde süperoksit birikmesi gerçekleşemez (Harbinson et al., 1993).

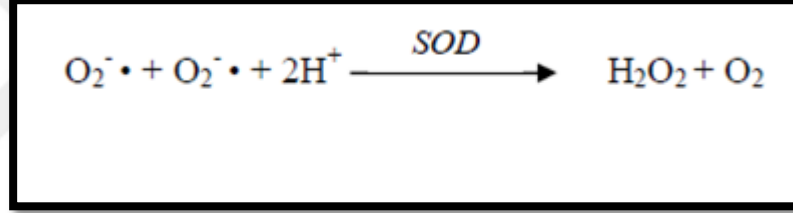


Şekil 2.5: Süperoksit radikalinin hidrojen peroksit'e dönüşüm tepkimesi

(Chaudiere and Iliou, 1999).



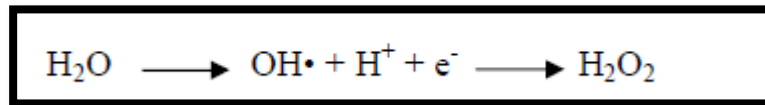
Şekil 2.4: Süperoksit radikalinin ($\text{O}_2^{\cdot-}$) oluşma tepkimesi (Becker et al., 1999).



Şekil 2.5: Süperoksit radikalinin hidrojen peroksit'e (H_2O_2) dönüşüm tepkimesi (Flora, 2007).

2.2.3 Hidroksil Radikali ($\text{OH}^{\cdot}$)

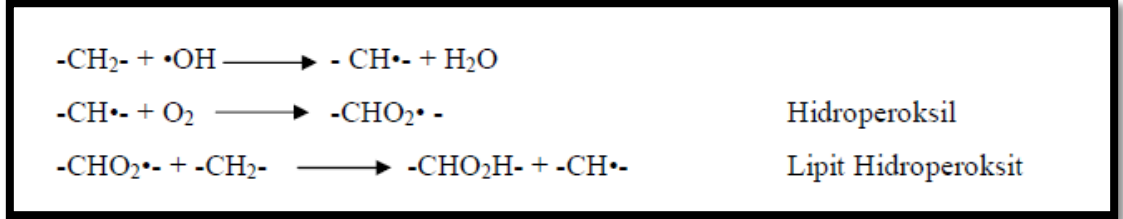
Hidroksil radikali, tek bir atom halinde ve bir adet elektronu eksik olan oksijenin hidrojen ile birleşmesinden meydana gelir. Hidroksil radikalının reaktivitesi çok yüksek ve yarı ömrü çok kısa olduğu için tehlikeli bir radikaldir. Suyun yüksek enerjili iyonizasyonundan meydana gelen (Şekil 2.8) hidroksil radikali son derece reaktif olmasından dolayı, hücreye en fazla zararı veren bir üründür (Lloyd et al., 1997; Çaylak, 2011).



Şekil 2.6: Suyun iyonizasyonu ile hidroksil radikali ve hidrojen peroksit'in meydana gelme tepkimesi

(Çaylak, 2011).

Hidroksil radikali lipid peroksidasyonunun başlatıcısı olarak bilinir. Çoklu doymamış yağ asitlerinin serbest radikal oksidasyonuna biyolojik sistemlerde lipid peroksidasyonu olarak adlandırılır. $\text{OH}\cdot$ membran fosfolipidleri, doymamış yağ asidi yan zincirlerine hücum ederek peroksidasyon dizisinin zinciri başlatılır (Şekil 2.9) (Lobo et al., 2010; Rice&Evans, 1997).

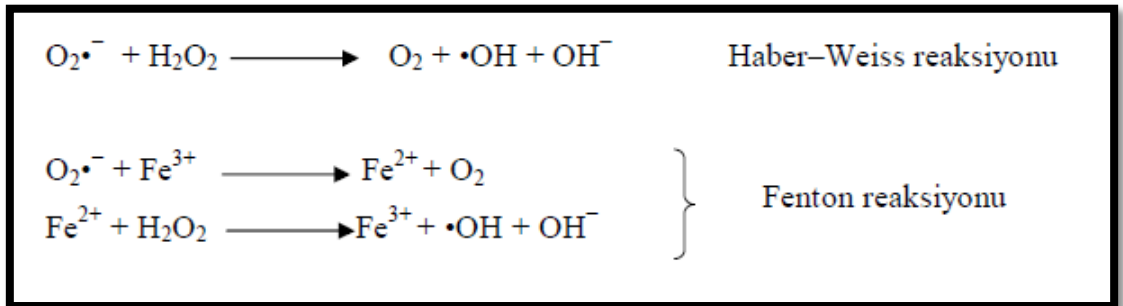


Şekil 2.7: Peroksidasyon zinciri tepkimesi (Rice&Evans, 1997).

Lipid peroksidlerin yıkım ürünleri malondialdehid (MDA) ve türevleridir. Bu yıkım sonucu oluşan ürünler, DNA veya proteinlerle etkileşime girerek hücreye zarar verebilirler (Valko ve ark, 2007; Halliwell ve Gutteridge, 1999).

Haber-Weiss reaksiyonu hidroksil radikalının kaynağıdır. $\text{O}_2\cdot^-$ radikali tarafından Fe^{3+} , Fe^{2+} 'ye indirgenir. Bunun sonucunda da Fe^{2+} ve hidrojen peroksit arasında Fenton reaksiyonu başlatılır (Nappi and Vass, 1998).

Fenton reaksiyonu ile aşağıdaki tepkimelerde gösterildiği gibi hidrojen peroksitin, Fe^{+2} ve diğer geçiş metalleri tarafından indirilmesi ile $\text{OH}\cdot$ radikali oluşturabilmektedir (Şekil 2.10) (Benzie, 2000; Lloyd, 1997).



Şekil 2.8: Haber-Weiss ve Fenton reaksiyonu ile hidroksil radikali oluşum tepkimeleri

(Lloyd, 1997).

2.2.4 Singlet Oksijen ($^1\text{O}_2$)

Singlet oksijen ($^1\text{O}_2$), fotosistem II (PSII) reaksiyon merkezi tarafından oluşturulan ilk ROS'tur (Mittler, 2002). Stoma kapanması nedeniyle gerekli CO_2 olmadığında indüklenir. Proteinlerin, yağ asitlerinin ve en önemlisi DNA'nın oksidasyon sürecinde rol alır. Oksijenin reaktiflik bakımından yüksek bir formudur. Fotokimyasal reaksiyonlarda singlet oksijenin oluşması son derece önem taşımaktadır. Hipokloröz asit ve hidrojen peroksit'in girdiği reaksiyon sonucunda da üretilebilmekte ve patofizyolojik bakımdan önemi hala araştırılmaktadır (Halliwell&Gutteridge, 1987).

2.2.5 Hidroperoksil Radikali ($\text{HO}_2^\bullet$)

Süperoksit radikalinin protonlanmasıyla hidroperoksil radikali oluşur. Süperoksite göre daha güçlü bir oksidan ve indirgeyici olduğu bilinmektedir. Biyolojik membranları kolay geçebilmesi ve yağ asitleriyle direkt etkileşime girebilmesi önemlidir (Sharp et al., 2008).

DNA'nın sürekli radikaller tarafından modifikasyona maruz kalmasına oksidatif hasar denilir ve mutajenezis, karsinogenezis ve yaşlanmaya sebep olur. Hatta birçok kanser hücresinin bulunduğu dokularda serbest radikallerin sebep olduğu DNA hasarına rastlanmıştır. Serbest radikaller ve ROS insan vücudunda metabolizma reaksiyonları sırasında, yan ürünler olarak sürekli üretilirler. Üretilen bu yan ürünler zararlıdır ve hızlı bir şekilde uzaklaştırılmazlar ise DNA yapısında, proteinlerde ve lipitlerde oksidatif hasara yol açarak fonksiyonel makromoleküllerin yapısını bozarlar (Apel and Hirt., 2004; Cai et al., 2004).

2.3 Serbest Radikallerin Kaynakları

Serbest radikallerin kaynakları, endojen ve ekzojen kaynaklar olmak üzere ikiye ayrılmaktadır.

2.3.1 Endojen Kaynaklar

Canlı fizyolojisinde pek çok hücresel aktivite oksidan oluşumuna yol açmaktadır. Bunlar endojen kaynaklarını oluşturmaktadır.

- **Mitokondriyal elektron transportu**

Oksidatif fosforilasyonun sonucunda ATP oluşur ve ara ürün olarak ise hidrojen peroksit, süperoksit radikali ve hidroksil radikali salınır. Mitokondriyal enzim olan

sitokrom C oksidaz tarafından, moleküler oksijenin %98'i H_2O_2 'ya dönüştürülür. Elektron transport zincirinden sızan elektronlar, hücre içindeki serbest radikal kaynağı olması ile önem taşır. Radikaller iç mitokondrial membranda oluşur ve bu konumda lokalize olan oksidatif fosforilasyon zinciri bileşenleri önemli oranda indirgenerek mitokondriyal süperoksit radikali üretimini arttırmaktadır. Burada üretilen radikallerden olan mitokondrial oksijenin yaklaşık % 1-2'si, başta süperoksit radikali olmak üzere hidrojen peroksit ve hidroksil radikalleri tarafından tüketilmektedir. Mitokondri içindeki SOD aracılığı ile süperoksit radikali, hidrojen peroksit ve hidroksil radikaline dönüşürken su molekülünün oluşmasıyla hücreleri oksidatif hasarın etkisinden korumaktadır (Mansouri ve ark, 2006; Peng ve ark, 2006).

- **Endoplazmik retikulum ve nükleer membranda elektron transport sistemleri**

Serbest radikal üretimi membrana bağlı sitokromların oksidasyon tepkimesinden meydana gelmektedir ve endoplazmik retikulum ile nükleusun iç membranları, sitokrom P450 açısından zengindir. Bu sistem flavoproteinleri içeren sitokrom redüktazların otooksidasyonu ile H_2O_2 ve $O_2^{\cdot-}$ radikali üretmektedir. Ayrıca doymamış yağ asitleri ve ksénobiyotikleri de okside edebilme yeteneğine sahiptirler (Liu et al., 1999; Kavas, 1989).

- **Peroksizomlar**

Peroksizomlar bünyelerinde bulunan D-amino asit oksidaz, ürat oksidaz, L-hidroksil asit oksidaz ve yağ asiti açıl-CoA oksidaz gibi oksidazlardan dolayı, hücre içi H_2O_2 'in çok önemli bir kaynağıdır. $O_2^{\cdot-}$ radikali ara ürününü oluşturmada H_2O_2 oluşumuna sebep olurlar. Ayrıca uzun zincirli yağ asitlerinin yıkılmasından sorumlu organellerdir (Akkuş, 1995).

- **Plazma membranları**

Plazma membranları; serbest radikallerin parçalanmasına sebep olan fosfolipidleri, glikolipidleri, gliseridleri, doymamış yağ asitleri ve kolay okside olan amino asitleri kapsayan transmembran proteinlerini içermektedir. Ekstrasellüler olarak açığa çıkan serbest radikaller, hücredeki diğer organeller ile etkileşime girebilmesi için plazma membranlarını aşmalı veya toksik olan tepkimeleri membran içinde

başlatmalıdır. Lipid peroksidasyonuna serbest radikaller sebep olur. Bu da membrandaki iyon dengesi bozulmasına ve hücre içindeki metabolik reaksiyonların inhibisyonuna yol açmaktadır (Niki, 1987).

- **Geçiş metalleri**

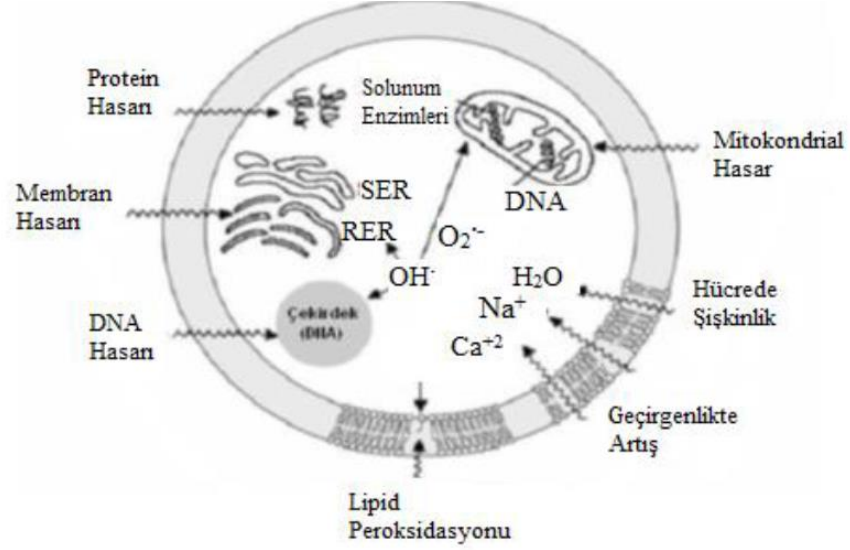
Demir ve bakır olmak üzere geçiş metalleri olarak adlandırılan metaller redoks reaksiyonlarında görev alırlar. Bu sebeple katalizör görevi görerek serbest radikallerin oluşumunu hızlandırırlar. Ancak asıl önemli görevleri lipid peroksidasyonuna nasıl etki ettikleridir. Sentezlenmiş olan lipid peroksitlerini (LOOH) geçiş metalleri parçalayarak lipid peroksidasyonunun zincir reaksiyonlarını katalize ettirerek serbest radikalleri daha az zararlı hale getirir (Halliwell and Gutteridge., 1990).

2.3.2 Ekzojen Kaynaklar

Canlıların yaşamları boyunca dış koşullardan etkilendiği ya da maruz kaldığı tüm kaynaklar ekzojen kaynak olarak adlandırılmaktadır. Bunlara örnek olarak sigara kullanımı, radyasyon, çevre kirliliği, pestisitler ve ilaçlar verilebilir (Halliwell and Gutteridge, 1987).

2.4 Biyolojik Makromoleküller Üzerinde ROS Etkisi

Endojen ve ekzojen olarak 2 şekilde oluşan serbest radikaller, hücrelerin önemli bileşeni olan lipitlere, DNA'lara, proteinlere, karbonhidratlara ve enzimlere zararlı etkide bulunurlar (Halliwell and Gutteridge, 1987). Şekil 2.11'de serbest radikallerin hücresel hedefleri ve hasarları gösterilmiştir (Onat ve ark., 2002).



Şekil 2.9: Serbest radikallerin hüresel hedefleri (Onat ve ark, 2002).

RER: Granüllü endoplazmik retikulum, SER: Granülsüz endoplazmik retikulum, DNA: Deoksiribo nükleik asit, $O_2^{\bullet-}$: Süperoksit radikali, $OH^{\bullet}$: Hidroksil radikali, Na: Sodyum, Ca: Kalsiyum, H_2O : Su

2.4.1 Serbest Radikallerin Lipitlere Etkileri

Lipitler serbest radikallerin metabolizmaya verdikleri zarar karşısında en hassas yapı gösteren makromoleküllerdendir. Membranda bulunan kolesterol ve yağ asitlerine ait doymamış bağlarla serbest radikallerin etkileşime girmesi sonucunda peroksidasyon ürünü oluşur. Poliansatüre yağ asitlerinin oksidatif yıkımı diye adlandırılan reaksiyonlar oldukça zararlıdır ve lipid peroksidasyonu olarak da bilinmektedir. Lipid peroksidasyonundaki zincir reaksiyonu kendiliğinden devam eder ve sonucunda ise membran hasarı oluşur, bu hasar dönüşümsüzdür. Lipid peroksidasyonunda, yağ asitleri zincirinden bir adet hidrojen atomu uzaklaşır ve bu yağ asidi zinciri lipid radikal özelliği kazanır. Oluşan serbest radikal varlığı ile membrandaki poliansatüre yağ asitleri zincirinden bir hidrojen atomunun uzaklaştırılması, bu yağ asidi zincirinin lipid radikal ($L^{\bullet}$) özelliği kazanması ile başlamaktadır. Lipid radikali bir takım değişikliklere uğrayarak moleküler oksijen ile olan etkileşimiyle de lipid peroksit radikali oluşmaktadır ($LOO^{\bullet}$). Lipid peroksit radikalinin membrandaki poliansatüre yağ asitleriyle yeni lipid radikalleri oluşturarak bir yandan kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarıyla lipid hidroperoksitlerine ($LOOH$) dönüşürler. Bu şekilde reaksiyonlar kendi kendini katalizleyerek devam eder (Lobo et al., 2010). Geçiş metalleri lipid hidroperoksitlerini yıktıklarında çoğunluğu aktif olan aldehit grubu ürünler oluşur ve bunlar ya hücre içinde

metabolize olur ya da hücreye hasar verirler. Lipid peroksidasyonu ürünü olan malondialdehit (MDA), genellikle lipid peroksitlerini tayin etmede kullanılmaktadır (Halliwell and Gutteridge, 1999).

2.4.2 Serbest Radikallerin Proteinlere Etkileri

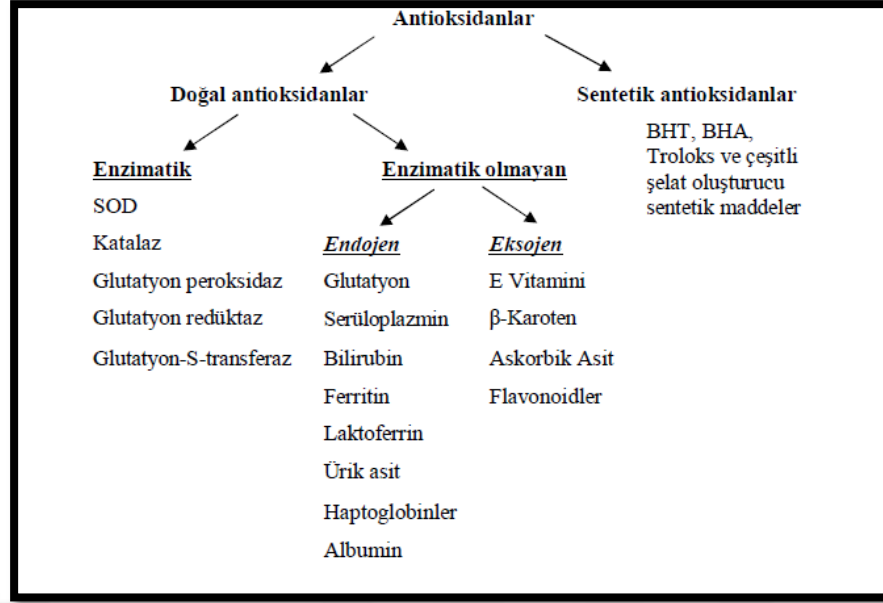
Yapılarında doymamış bağ ve sülfür bulunan aminoasitler serbest radikallerden etkilenirler. Merkezinde karbon olan radikallerin girdikleri reaksiyonlar sonucunda sülfür bağlı radikaller oluşmakta ve immünoglobülin G ve albümin gibi disülfid bağları bulunan proteinlerin yapısı bozulmaktadır. Bunun sonucunda da fonksiyonları yerine getirmeleri engellenmektedir (Freeman ve Crapo., 1982).

2.4.3 Serbest Radikallerin Nükleik Asit ve DNA'ya Etkileri

Serbest radikallerin bazıları, radyasyonla etkileşimi sonucunda meydana gelmektedir. Bunun sonucunda da DNA etkilenecek hücre mutasyonuna ve ölümüne sebebiyet verir. DNA bazı ile kolayca etkileşime giren hidroksil radikali ve hidrojen peroksit, DNA'ya zarar vererek hücre ölümüne kadar yol açtığı görülmektedir (Willcox et al., 2004).

2.5 Antioksidan Savunma Sistemleri

Antioksidanlar, mevcut radikalleri süpüren ya da serbest radikal oluşmasını engelleyen moleküllerdir ve yapılarında genel olarak fenolik bileşik bulunur. Antioksidanların kimyasal yapısı ve çözünülebilirliği, insan sağlığındaki yeri için son derece önemlidir (Elliot, 1999). Antioksidanın süpürebildiği radikal sayısı, molekül başına paylaştığı elektron sayısı ve reaksiyon kinetiği önemlidir (Akın, 2018). Fizyolojik olarak normal koşullarda hücreler, antioksidan savunma sistemi tarafından reaktif oksijen türleri gibi ürünlerin neden olacağı oksidatif stresin hasarına karşı korunurlar. Bahsedilen koruyucu sistemlerin ikiye ayrıldığı, Şekil 2.12'de gösterilmiştir (Rice-Evans et al., 1997).



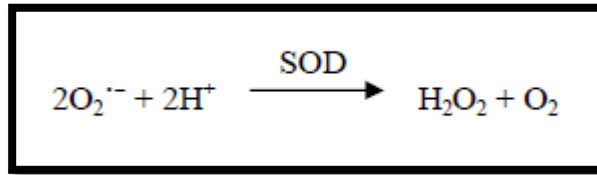
Şekil 2.10: Antioksidanların sınıflandırılması (Rice-Evans et al., 1997).

2.5.1 Enzimatik antioksidanlar

Pek çok enzim doğrudan ya da dolaylı biçimde serbest radikallerin zararlı etkisini giderme veya süpürme mekanizmasında aktif olarak görev alsalar da içlerinde en önemli olanlar aşağıdaki gibidir:

2.5.1.1 Süperoksit Dismutaz (SOD)

Süperoksit dismutaz (E.C.1.15.1.1) süperoksitin H_2O_2 ve O_2 'e dismutasyon katlızlediği tepkimeye görev alır (Şekil 2.13) (Chaudiere and Iliou, 1999).

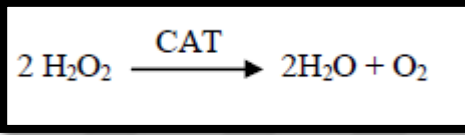


Şekil 2.11: SOD'un dismutasyon tepkimesi (Chaudiere and Iliou, 1999).

Canlı hücrelerde hücrelerde konum olarak sitozolde bulunur ve Cu-Zn SOD olarak iki adet mitokondriyal olarak ise Mn-SOD şeklinde izoenzimleri bulunmaktadır (McCord 2000; Powers 2000).

2.5.1.2 Katalaz (CAT)

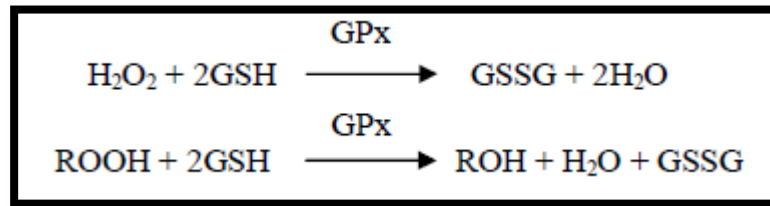
Katalaz , (CAT) (E.C.1.11.1.6) 4 alt üniteye sahiptir ve her birinin hem grubu vardır. 240.000 dalton molekül ağırlığına sahip tetramerik yapılu bir proteindir. Bu enzim, her aerobik hücrede bulunmaktadır. CAT, oran olarak %80 peroksizom, %20 ise sitozolde bulunmaktadır. Bu enzim H_2O_2 'yi parçalayak H_2O ve O_2 'e dönüştürür ve zararlı etkiler engellenir (Şekil 2.14). Hidrojen peroksit reaktif oksijen türü kabul edilmemesine rağmen, hidroksil radikali öncüsü olduğu için katalaz enzimi aracılığıyla hidrojen peroksit, 2 mol su ile 1 mol oksijen dönüştürülerek derişimi azaltılır (Şekil 2.14). Hidrojen peroksitin derişiminin düşük olduğu zaman fenol ve askorbat kosubstratlarını kullanıp peroksidaz gibi davrandığı bildirilmiştir (Percy, 1984).



Şekil 2.12: Hidrojen peroksidin kataliz tepkimesi (Percy, 1984).

2.5.1.3 Glutatyon Peroksidaz (GPx)

Glutatyon peroksidaz (E.C.1.11.1.4), hidrojen peroksit varlığında indirgenir ve selenoenzimler grubundadır. Bu enzimin varlığında oluşan reaksiyonda H_2O_2 suya ve organik hidroperoksitler de alkole indirgenirken, GSH ise (glutatyon) okside olan GSSG (glutatyon)'ye yükseltgenir (Dixon et al., 1998; Ledford et al., 2007; Chaudiere&Iliou, 1999) (Şekil 2.15).

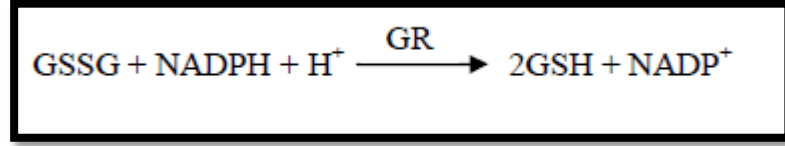


Şekil 2.13: Glutatyon peroksidaz enziminin katalizlediği tepkime (Chaudiere&Iliou, 1999).

2.5.1.4 Glutatyon Redüktaz (GR)

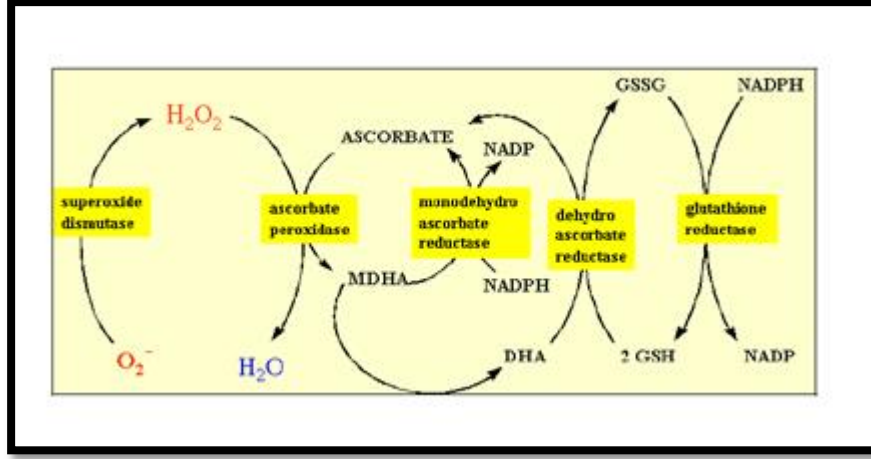
Glutatyon redüktaz enzimi (E.C.1.8.1.7), glutatyon peroksidaz aracılığıyla katalizlediği indirgenme sonucu hidroperoksitleri oluştururken, okside olan glutatyon

(GSSG)'de tekrar indirgenmiş glutatyona (GSH) dönüşür (Şekil 2.16) (Yavaş, 2012; Carlberg et al., 1985). Bu enzim bir takım bitki dokusundan izole edilerek korunmuş bir enzimdir. Okside glutatyonun disülfid bağının NADPH'e bağlı reaksiyonunu katalizler. Bu yüzden indirgenmiş glutatyon havuzunun korunması adına çok büyük önem taşır. Ayrıca askorbik asit-glutatyon yolağının son adımının hızını katalizler. Bu enzimin artışı bitkilerde aktivasyon, GSH seviyesinin artmasına ve birikmesine sebep olarak bitkilere tolerans kazandırır (Dixon et al., 1998; Ledford et al., 2007).



Şekil 2.14: Glutatyon redüktaz enziminin katalizlediği tepkime (Carlberg et al., 1985).

Ayrıca askorbat-glutatyon ya da Asada-Halliwell döngüsü şeklinde isimlendirilen ve sitozol, mitokondri, kloroplast olmaz üzere neredeyse tüm hücrel bölgelerde çalışan hidrojen peroksitin uzaklaştırılması için daha verimli olan bir döngü vardır (Şekil 2.17) (Foyer and Noctor, 2011). Bu döngü bu hücrel bölgelerde ROS'ların seviyesini kontrol altında tutmada önemli bir görev teşkil ettiğini gösterir. Ayrıca askorbat ve glutatyonun havuzlarında indirgenmiş olarak korunması için de önemlidir. Oksitlenen askorbat ve glutatyon miktarının oranının düşürülerek muhafaza edilmesi, hücre içinde ROS'un dengede tutulması ya da süpürülmesi için önemlidir. Bu oran, indirgeyici güç olan NADPH'i kullanan askorbat glutatyon döngüsü enzimlerinden, glutatyon redüktaz (GR), askorbat peroksidaz (APX), monodehidroaskorbat redüktaz (MDAR) ve dehidroaskorbat redüktaz (DHAR) ile korunmaktadır (Halliwell, 2006).



Şekil 2.15: Çeşitli antioksidan enzimleri içeren hidrojen peroksit temizleyici ve askorbik rejenerasyonun Asada-Halliwel yolu (Foyer and Noctor, 2011).

Askorbat peroksidaz (APX), bu döngünün ilk enzimidir ve hidrojen peroksidin indirgenerek suya indirgenmesini katalizler. Askorbatı indirgeyen bir etken olarak yüksek özgülüğü ve afinitesi vardır. Daha sonra askorbat, monodehidroaskorbata oksitlenerek yükseltgenir. Ardından monodehidroaskorbat kloroplasttaki monodehidroaskorbat redüktaz enziminin katalize ettiği reaksiyon ile indirgenmiş ferrodoksine ya da NADPH aracılığıyla doğrudan askorbata indirgenir. Eğer monodehidroaskorbat direkt olarak monodehidroaskorbata çevrilemezse, kendisi dehidroaskorbat ve askorbata orantısız olarak dağıtılır. Dehidroaskorbat ise daha sonra dehidroaskorbat redüktaz aracılığıyla katalizlenen indirgenmiş glutatyon (GSH) ile askorbata düşürülür. Monodehidroaskorbat redüktaz ve dehidroaskorbat redüktaz enzimi sitozol, kloroplast ve mitokondride bulunur. Askorbat-glutatyon döngüsü, elektron donörü olarak glutatyon havuzunu NADPH ile yenilemek suretiyle glutatyon redüktaz ile tamamlanır. Glutatyon redüktaz, askorbatın yenilenmesi için gerekli olan ve sitozol, kloroplast, mitokondri ve peroksizomlarda lokalize olan GSH / GSSG'nin oranını korur. Süperoksit dismutaz enzimleri (SOD'ler) süperoksitini uzaklaştırır, biri O_2^- H_2O_2 'ye düşürülür, diğeri ise O_2 'ye okside edilir (Mittler, 2002).

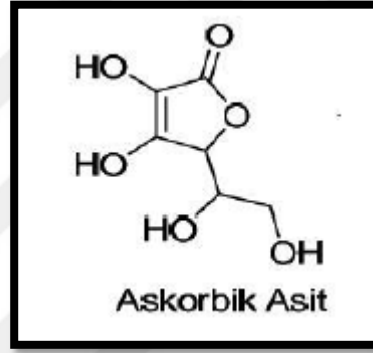
2.5.2 Enzimatik Olmayan Savunma Sistemi (Enzimatik Olmayan Antioksidanlar)

Doğal antioksidanlar enzimlerin yapılarında bulunmazlar ve bitki ya da hayvan dokularındaki bileşiklerin işlem görmesiyle ya da pişirilmesi esnasında ortaya çıkmasıyla elde edilen maddelerdir. Çoğu fenolik bileşiklerdir. Doğal antioksidanların

çoğu fenolik bileşiklerden oluşur ve bunların arasında askorbik asit, tokoferoller, karotenoidler ve flavonoidler en önemlileri olarak bilinmektedir (Kireççi, 2018).

2.5.2.1 Askorbik asit (C Vitamini)

Reaktif oksijen türlerinin zararlı etkilerini bitkilerde en aza indirgeyen ya da önleyen bu antioksidan fotosentetik hücrelerde ve meristemlerde en fazla miktarda bulunur, yapraklarda ve kloroplastlarda ise düşük seviyelerdedir. Stres koşullarına maruz kalan bitkilerde konsantrasyonu yükselir, oksijen ve hidroksil'in temizlenmesinde görev olarak oksidatif stresi en aza indirger (Yang et al., 2008; Skorzynska et al., 2003). Şekil 2.18'de askorbik asidin kimyasal yapısı gösterilmiştir.



Şekil 2.16: Askorbik asit kimyasal yapısı

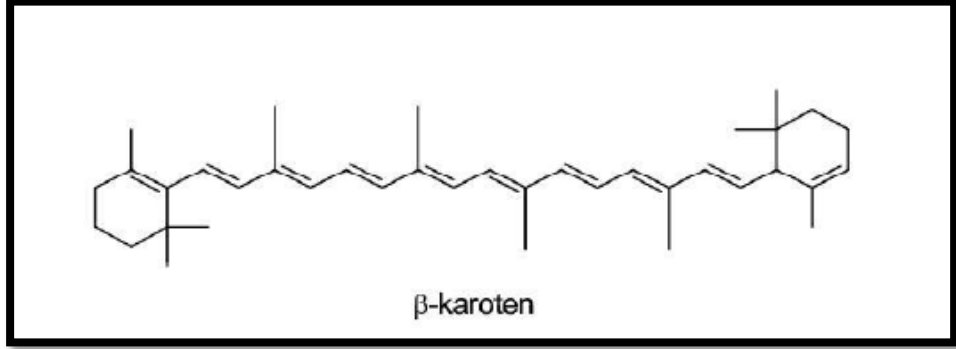
2.5.2.2 Tokoferoller (E Vitamini)

Tokoferoller izoform olarak α , β , γ , δ olmak üzere dört tane bulunur. En aktif ve yaygın olarak bulunduğu form d- α -tokoferoldür. Bu bileşikler suda çözünmemelerine rağmen yağda çözünürler ve oksijenin bulunmadığı ortamda asit ile sıcaklığa dayanıklıdırlar. Bu bileşikler, eşleşmemiş elektronlarla kolaylıkla reaksiyona giren ve indirgeyen hidroksil grubu içerirler. Radikal reaksiyon esnasında zincir kırıcı etkileri vardır (Büyük ve ark., 2012).

2.5.2.3 Karotenoidler

Kırmızı-sarı renge sahip olan pigmentler, bitkilerde ve hayvansal dokularda bulunurlar. Karotenoidler 2 temel göreve sahiptir. Bunlar, çiçek ve meyvelere renk vermek ile fotosenteze yardımcı olmaktır. Karotenoidler sekiz tane 5 C'lu izoprenoidin yanyana gelmesiyle oluşan 40 C'lu polienlere verilen addır ve bu bileşikler oldukça

karmaşık yapıya sahiplerdir (Yavaşer, 2011). Şekil 2.19’da karotenoidin beta formunun kimyasal yapısı verilmiştir.



Şekil 2.17: Beta Karotenoid yapısı.

2.6 Tuz Stresi

Dünyadaki toplam toprakların yaklaşık %46’sı kurak ve yarı kurak iklim bölgelerinde yer almaktadır (Wang et al., 2015). Bu alanların % 26’lık kısmı kuraklık stresi, % 20’lik kısmı tuz stresi etkisi altında olduğu halde, sadece % 10’luk kısım herhangi bir çevresel stres etkisi altında değildir (Doğan, 2012). Dünya tarımı, büyümekte olan nüfusun ihtiyacını karşılamak için %70 daha fazla gıda üretmek gibi birçok zorlukla karşı karşıyadır ve mahsullerin verimliliği ihtiyacı da gıda talebine paralel olarak artmamaktadır (Parihar et al., 2014). Dünya Toprak Haritası verilerine göre dünya genelinde 954 milyon hektar (ha) tuzdan etkilenmiş ve üretkenliği kısıtlanmış araziler bulunduğu bildirilmektedir. Bu tip problemlili topraklar Afrika’da 80.5 milyon ha, Avrupa’da 50.8 milyon ha, Avustralya’da 357.3 milyon ha, Amerika’da 146.9 milyon ha ve Asya kıtasında 319.3 milyon ha alan üzerinde yayılmıştır. Ülkemizdeki toprakların %1.7’sinde (1.518.746 ha), tarım yapılan arazilerin ise %3.8’inde (837.405 ha) tuzluluk problemlerine rastlanmaktadır. Başka bir deyişle çorak araziler ülkemiz yüz ölçümünün % 2’sine, toplam işlenen arazilerin ise % 5.48 (27.699.003 ha)’ine eşdeğer büyüklüktedir. Toplam çorak arazilerin % 74’ü tuzlu, %2 5.5’i tuzlu-alkali ve % 0.5’i alkali (sodyumlu) topraklardan oluşmaktadır. Dünyada her yıl 10 milyon ha arazi tuzluluk problemi sebebiyle kullanılamaz hale gelmektedir (Wang et al., 2015). Bahsedilen bu çevresel stres faktörlerden kaynaklanan yüksek tuzluluk oranı, bitkisel üretimde verim kaybına neden olmakta, su ve arazi kullanım etkinliğini azaltmaktadır. Bu da gıda gereksinimlerinin karşılanmasında endişe yaratmaktadır (Parihar et al., 2015). Çoğunlukla hücresel düzeyde oksidatif bir hasar

olarak ortaya çıkan tuz stresi, kurak ve yarı kurak bölgelerde verimi etkileyen önemli bir faktördür (Rezende et al., 2018). Gelişmekte olan ülkelerde nüfus yoğunluğunun artması ile başa çıkma seçeneği, ekili alanın verimliliğini arttırmaktan ibarettir. Bu tür bir genişleme, kurak ve yarı kurak bölgelerde, su kıtlığı ve düşük su kalitesi nedeniyle zor olabilir. Bu durum, bu tür ülkelerdeki bitkilerde çevresel stres olaylarının ve ilgili tolerans mekanizmalarının anlaşılmasını gerekli bir adım haline getirmektedir (Koubaa et al., 2015).

Onlarca yıldır kurak ve yarı kurak ortamlarda tarım, dünyadaki en büyük sorunlardan biri haline gelen toprak tuzluluğunda bir artışla karşı karşıya kalmıştır (Koubaa et al., 2015). Tuzluluk ile ilgili çalışmalarda asıl amaç, tuzluluğun tüm canlı yaşamına etkisinin anlaşılması, yaşamın hangi ölçüde tuzluluktan etkilenmediğini belirlemektir (Aydın, 2012).

Bitkiler, tuzlu ortamda yaşayabilme yeteneklerine göre halofitler ve glikofitler adı altında gruplandırılırlar (Şen, 2005). Tuzlu koşullarda hayatta kalan bitkiler, halofit olarak adlandırılır. Halofitik türler, birçok canlı için zararlı olan tuzluluktan faydalanmaktadır. Halofitler, yüksek konsantrasyonlarda çözünür tuz içeren alanlarda yaşam döngüsünü sürdürme yeteneğine sahiptirler ve Dünya bitki örtüsünün %1'ini oluştururlar. Halofitlerde tuz direnci mekanizması genellikle tuzdan kaçınma ve tuz toleransı olarak iki kategoride gruplandırılır. Bitkiler tuz toleransını, hücrelerinin içinde tuz iyonları birikirken yaşayabilirliğini koruyan bazı fizyolojik ve biyokimyasal değişiklikler ile sağlar. Düşük toleransla ise bitkinin tuzdan arındırılması ile sağlanabilir. Tuza toleranslı bitkiler, tuzun toksik etkilerinden kendilerini korumak ve fazlalıkları dışarıya atmak için enerjiyi kullanırlar. Tuzdan uzak durma, hücre içindeki tuz konsantrasyonlarını en aza indirecek şekilde bazı yapısal ve fizyolojik uyarlamaları içerebilir. Bu durum iki şekilde gerçekleşebilir: ya iyonlar geçirgen membranlardan pasif olarak uzaklaştırılır ya da iyon kanalları yoluyla aktif olarak çıkarılır. Halofitler ayrıca bazı dışsal tuzluluk şartları ile başa çıkmak için birtakım anatomik adaptasyon modifikasyonları da adapte eder (Parida et al., 2015). Tuza duyarlı olan bitkilere glikofit denir. Pek çok bitki yüksek konsantrasyonda tuz stresini tolere edemediğinden ötürü glikofit olarak adlandırılır (Şen, 2005).

Topraklarda tuzluluk; primer tuzluluk olarak adlandırılan doğal yollardan ya da sekonder tuzluluk adı altında iki farklı şekilde oluşur. Primer tuzluluğun kaynakları

arasında tuz deposu olan okyanuslar, ana kayaların aşınması ve iklimsel etmenler vardır. Kayalar aşındığında açığa çıkan sodyum, kalsiyum, magnezyum, sülfat ve karbonat şeklindeki tuz iyonları toprağın bünyesine alınır. Tuzlu bileşikler içinde çözünürlük oranı en yüksek olan bileşik sodyum klorürdür (NaCl). İklim olayları sırasında yağmur ve rüzgarlar okyanus suyunun yapısında bulunan tuzları karaya ulaştırarak toprağın yapısına katar ve bu durum primer tuzluluğu oluşturur. Sekonder tuzluluğa sebep olan başlıca etmenler; tarımsal olarak tek yıllık bitkilerin kullanımı toprak drenajının yeterince iyi olmaması ve sulama suyunda var olan tuz bileşikleridir. Bu da toprakta hidrolik düzenin farklılaşmasına yol açar. Düzgün yıkama yapılmamasından kaynaklı topraktan uzaklaşamayan tuzların bir kısmı bitkinin kök bölgesinde birikebilir. Toprağın yapısında bulunan çözünebilir tuzların miktarı, bitkinin büyüme ve gelişmesine engel olacak seviyeye geldiğinde tuzluluk sorunu oluşur. Topraktaki tuz içeriği arttıkça bitkinin su alımı da kısıtlanmaya başlanır. Bitkideki tuz konsantrasyonu, kullanılabilir su potansiyelini düşürmeye yetecek seviyeye geldiğinde ise (0.5-1.0 bar) bitki strese girer (Ülkü, 2014). Tuzluluk problemi olan topraklarda, kültür bitkilerinin çimlenmesi, büyümesi ve ürün verimleri, toprakta mevcut olan tuzların cinsi ve miktarlarına bağlı olarak azalmakta ve hatta tamamen durmaktadır (Çizelge 2.2) (Şen, 2005; Wang et al., 2015). EC, 4 dSm^{-1} veya daha fazla olduğunda bu değer yaklaşık 40 mM NaCl'ye eşdeğer olmakla birlikte, 0.2 MPa'lık bir ozmotik basınç oluşturur. Bu eşikteki topraklar tuzlu olarak sınıflandırılır (Çizelge 2.1, Çizelge 2.2) (Ekmekçi ve ark., 2005)

Çizelge 2.1: Toprak tuz düzeylerine göre bitkilerin duyarlılıkları (Ekmekçi ve ark., 2005).

Tuzluluk (ECe, dS/m)	Bitki Tepkisi
0-0.98 Çok az tuzlu	Tuzluluk etkisi çoğunlukla ihmal edilebilir
1.71-3.16 Tuzlu	Çok duyarlı bitkilerin ürün verimleri düşebilir
3.16-6.07 Çok tuzlu	Tuza dayanıklı bitkiler normal ürün verebilir
>6.07 Aşırı tuzlu	Tuza çok dayanıklı birkaç bitki ürün verebilir

Çizelge 2.2: Tarla bitkilerinin tuz toleransı ve tuz stresine bağlı olarak verim azalmaları (Wang et al., 2015).

Bitki Çeşidi	Eşik Değer		Verimdeki azalma					
	EC _e (Ds/m)	EC _w (Ds/m)	10		25		50	
			EC _e (Ds/m)	EC _w (Ds/m)	EC _e (Ds/m)	EC _w (Ds/m)	EC _e (Ds/m)	EC _w (Ds/m)
Arpa	8.0	5.3	10.0	6.7	13.0	8.7	18.0	12.0
Fasülye	1.0	0.7	1.5	1.0	2.3	1.5	3.6	2.4
Mısır	1.7	1.1	2.5	1.7	3.8	2.5	5.9	3.9
Pirinç	3.0	2.0	3.8	2.6	5.1	3.4	7.2	4.8
Pamuk	7.7	5.1	9.6	6.4	13.0	8.4	17.0	12.0
Sorgum	4.0	2.7	5.1	3.4	7.2	4.8	11.0	7.2
Şeker Pancarı	7.0	4.7	8.7	5.8	11.0	7.5	15.0	10.0

Toprak suyundaki tuzlar, iki nedenden dolayı bitki büyümesini engelleyebilir. Bunlardan birincisi, toprak çözeltisindeki tuzun varlığının, bitkinin su alma kabiliyetini azaltarak büyüme oranının düşmesine neden olmasıdır. Tuzluluğun bitkiler üzerinde; spesifik iyon toksisitesinin oluşması, ozmotik basıncın artışı, suyun kullanılabilirliğinin azalması ve alkaliteninin artışı gibi etkileri vardır (Chinnusamy., 2005). Tuz, bitkiler üzerindeki doğrudan etkisini osmotik ve iyon stresi oluşturarak gösterirken, dolaylı etkisini ise sekonder etki olarak adlandırılan, stres faktörleri sonucunda bitkide meydana gelen yapısal bozulmalar ve toksik bileşiklerin sentezlenmesi ile göstermektedir (Shams, 2019). Tuz stresinin bitkilerdeki ilk etkisi osmotik ve iyon stresidir. Bu stres faktörleri sonucunda bitkide meydana gelen oksidatif stres ise ikinci ve dolaylı etkisidir. Toprak çözeltisinin ozmotik potansiyelinin azalması, bitkinin mineral madde

bakımından beslenmesinin bozulması ve özel sodyum ve klor toksisitesi bitki büyüme ve gelişmesi üzerinde tuzluluğun zararlı etkilerindendir. Ozmotik stresin sebebi su eksikliğinden kaynaklanma ile birlikte, sodyum iyonlarının doğrudan bir etkisi olmamaktadır. Na^+ , Cl^- ve SO_4^{2-} iyonlarının yüksek yoğunluklarda birikimi spesifik iyon toksisitesi olarak adlandırılmaktadır. Metabolizma için zehir etkisi yaratan hücreler arasındaki Na^+ toprakta yüksek yoğunlukta bulunmaktadır ve toprakta fazla birikimi bitkilerde büyüme ve gelişmenin engellenmesine sebep olmaktadır (Marscher, 1995). Bitkilerin normal gelişmeleri için toprakta sürekli olarak, gelişmelerine engel olmayacak düzeyde suyun bulunması gerekmektedir. Kök bölgesinde suyun azalması, bitkilerin su kullanımlarının da azalması anlamına gelmektedir. Tuzluluk da toprak ortamında bitkinin suyu kolaylıkla almasını engelleyen durumlardan birisidir. Kök bölgesi çözelti ortamında tuz konsantrasyonunun artması ile bitkinin bu suyu alabilmek için harcamak zorunda kaldığı enerji miktarı da artar ve sonuçta tuzluluk arttıkça bitkinin su kullanımı azalır (Yediyıldız, 2008).

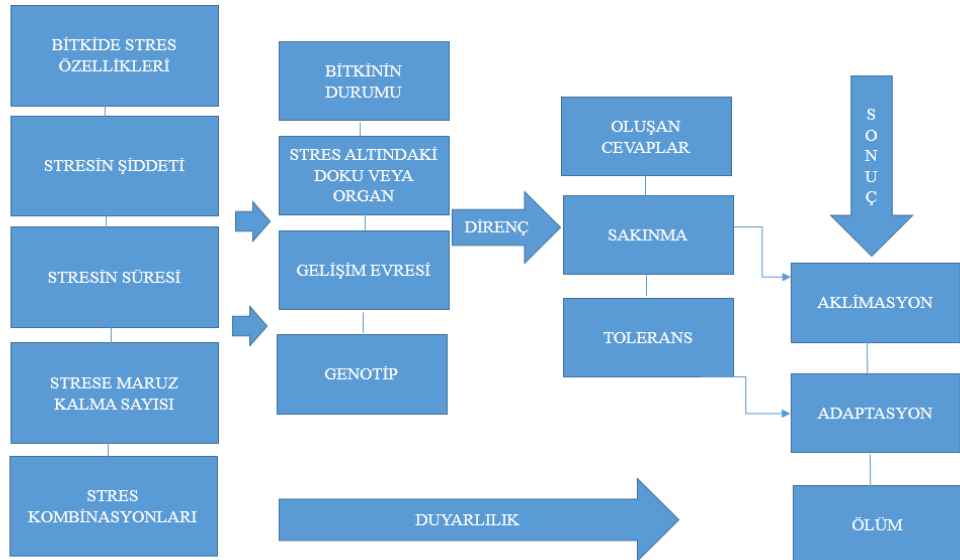
DNA, protein, klorofil ve zar fonksiyonuna zarar veren reaktif oksijen ürünlerinin sentezi, metabolik toksisite ve hücre bozulması ise NaCl 'nin bitki üzerindeki sekonder etkisi olarak ifade edilmektedir (Shams, 2019). Bu etkilerin tümü bitki büyüme ve gelişmesinde fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler seviyede olumsuz etkilere neden olarak birtakım hasarların oluşmasına ortam hazırlamaktadır. Tüm bunların sonucunda ise ürün veriminde ciddi kayıplara neden olmaktadır (Bildiren, 2018). Genel olarak tuz; daha küçük bitki boyutu, yaprak sayısında ve alanında azalmaya sebep olur ve bu durum büyümede yavaşlama olarak adlandırılır. Bunun yanı sıra, bitki yaş ve kuru ağırlıklarında azalma, klorofil miktarında azalma, meyve tat ve kalitesinde bozulma ve buna bağlı olarak verimde düşüş, tuz stresinin ortaya çıkardığı etkiler arasında yer almaktadır (Ülkü, 2014). Tuz stresinin etkisi, bitkinin türü, uygulanan tuz çeşidi ile konsantrasyonu ve maruz kalma süresine bağlı olarak değişmektedir. Tuzlu koşullarda bitkiler genotipik farklılıklara bağlı olarak çok farklı tepkiler göstermektedir. Tuzluluğa karşı verilen bu farklı tepkiler türler arasında değişebileceği gibi aynı tür içindeki genotipler arasında da farklılık gösterebilmektedir (Shams, 2019). Tarımı yapılan kültür bitkilerinin tümü, tuzluluğa karşı aynı tepkiyi göstermezler. Bazı bitkiler tuzluluğa karşı daha hassas iken, bazı bitkiler daha dayanıklıdır. Dayanıklı bitkiler, tuzlu topraklarda su gereksinimlerini karşılamak amacıyla ozmotik etkiye karşı daha fazla güç geliştirebilen bitkilerdir. Bitkinin tuza

dayanımlarının incelenmesi, özellikle toprak tuzluluğunun belirli bir düzeyin altına düşürülemediği alanlarda, ekonomik düzeyde ürün verebilecek bitkilerin seçilerek yetiştirilmesi amacıyla önemlidir (Ekmekçi ve ark., 2005).

Dayanımlı bitkiler, tuzlu topraklarda su gereksinimlerini karşılamak amacıyla ozmotik etkiye karşı daha fazla güç geliştirebilen bitkilerdir. Bitkinin tuza dayanımlarının incelenmesi, özellikle toprak tuzluluğunun belirli bir düzeyin altına düşürülemediği alanlarda, ekonomik düzeyde ürün verebilecek bitkilerin seçilerek yetiştirilmesi amacıyla önemlidir (Jan et al., 2018).

2.7 Bitkilerin Strese Karşı verdiği Yanıtlar

Bitkilerin stres faktörleri karşısında gösterdikleri cevapların şiddeti birçok etkene bağlı olarak değişkenlik gösterebilir. Bitki strese tamamen dayanıklılık gösterebileceği gibi, yalnızca bazı organları strese karşı dayanıklılık da geliştirebilir. Bitkilerde stres dayanıklılığının derecesi, stresten kaynaklanan özelliklere (stresin şiddeti, süresi, maruz kalınan stres sayısı) ve bitkiden kaynaklanan özelliklere (stres altında sahip olunan doku/organ, bitkinin gelişim evresi, bitkinin sahip olduğu genotip) bağlı olarak değişebilir (Şekil 2.20) (Hale&Orcut, 1987; Doğru, 2006).



Şekil 2.18: Bitkilerde çeşitli faktörlere bağlı olarak ortaya çıkan stres cevapları (Doğru, 2006).

2.7.1 Stresten Kaçınma

Çevresel koşullar uygun olduğu dönemde bitkinin yaşamını tamamlayabilmesi için sahip olduğu yetenektir (Salisbury ve Ross, 1992). Yani bitkinin stresten kaçması kısaca stresle yüzleşmekten uzak kalmasıdır (Bildiren, 2018).

2.7.2 Stres Sakınması

Bitkinin ortamındaki stresi ya da stres yaratabilecek faktörlerin olumsuzluklarını azaltarak/engellerek stresten uzak bir iç ortam oluşturmaları durumuna denilmektedir. Örneğin çölde yaşayan bitkilerdeki sukkulent organların yağmurlu mevsimlerde bolca su depolayarak bitkiyi sakınım mekanizması ile kuraklık stresinin etkilerinden korumaktadır (Hale and Orcut, 1987).

2.7.3 Stres Adaptasyonu

Uzun süren stres koşulları nedeniyle bitkinin genotipinde morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal anlamda farklılıklar görülür ve bu farklılıklar “adaptasyon” olarak adlandırılır. Bitkinin genotipinde meydana gelen bu değişiklikler sabit kaldığı için kuşaktan kuşağa aktarılmaktadır (Bildiren, 2018).

2.7.4 Stres Aklımasyonu

Bitkinin çevresel koşullara fenotipik olarak, herhangi bir genetik değişiklik olmadan verdiği tepkidir. Bu tepkiler sonucu bitkide yeni bir morfolojik ve anatomik yapı meydana gelir (Gaspar et al., 2002).

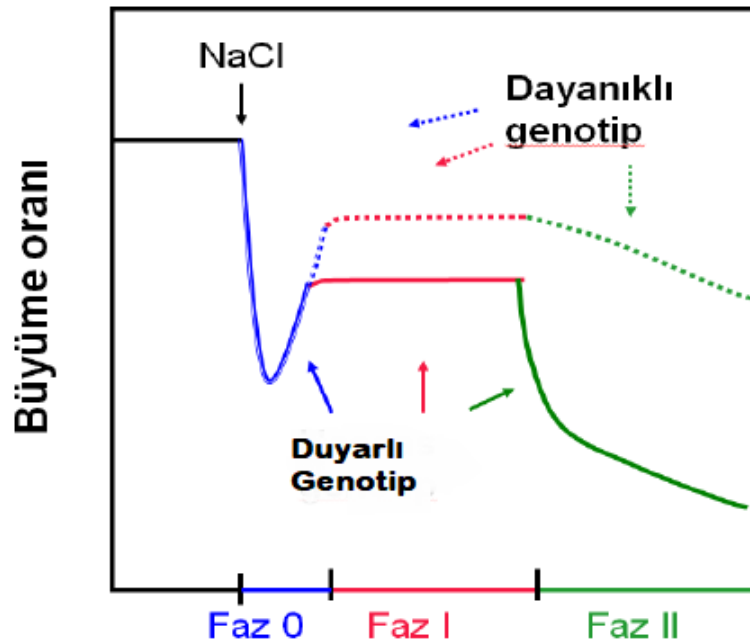
2.7.5 Stres Toleransı

Tolerans mekanizmasında bitkinin stresten etkilenmediği ya da strese sebep olan zararı tamir eden iki durum söz konusudur. Bu ise bitkinin metabolizması ile stres faktörü arasında termodinamik varlığın olduğunu gösterir (Bildiren, 2018).

Bitkiler tuz stresi ile karşılaştıklarında farklı büyüme tepkileri gösterirler. Bu büyüme tepkisi Munns’un (1993) iki fazlı modeli ile açıklanabilir (Şekil 2.21). Munns’un (1993) modeline göre bitkisel performansı iki önemli fizyolojik problem sınırlayabilir. Ozmotik sorunlar uzayıp büyümeyi azaltmaya sebep olur ve bu birinci aşama olarak adlandırılır. Sonuç olarak bitkiler bodur büyüme ve koyu yeşil renklenme gösterirler. Daha sonra iyon toksisitesi gelişerek hassas bitkilerin büyümesi ciddi

şekilde önlenir. Bu da ikinci aşamadır. Dayanıklı genotipler, hassas genotiplere göre tuzluluk altında daha fazla büyüme gösterirler. İki fazlı modelde, “faz 0” olarak adlandırılan faz tuz stresinin birinci aşamasından öncedir. Bu faz tuz uygulamasından sonraki ilk birkaç saat içindeki kısa süreli etkileri dikkat almaz.

Genel olarak büyümede azalmayla başa çıkma stratejinin olduğu faz tuz stresinin birinci fazıdır. Bu durum ise genotipe bağımlı olarak ortaya çıkar. Düşük su potansiyeli bitki hücrelerinin geçici olarak suyu serbest bırakıp ozmotik düzenleme sayesinde orjinal turgorunu geri kazanmasını sağlar. Bitkinin yaş gövde ağırlığı ve yaprak alanı üretebilme kapasitesi, tuz stresinin birinci fazında ozmotik dayanıklılık olarak ölçülür. Tuz stresinin ilk fazında kalsiyum beslenmesi ve fizyolojik kalsiyumun eksik olması da sorun teşkil edebilir. Kalsiyum eksikliğinden kaynaklı zarar eğilimi tuza hassas olan tür ve çeşitlerde dayanıklı genotiplere göre daha fazladır. İlk ve en önemli strateji sodyumun kök yüzeyinden dışarı atılmasıdır. Bunun sebebi, tuz stresinin ikinci faz yani iyon toksisitesinin etkilerini azaltmaktır. Bu stratejinin temelinde bitkiye sodyum girişinin engellenerek bitkinin içindeki sodyum birikimini önlemektir. Bu olay; sodyumun dışlanmasıyla kök yüzeyindeki iyon seçici katyon kanallarından dolayı pasif, kök hücresi vakuollerinin içeriye alınımı ile de kökten gövdeye düşük taşınım olduğu için aktif olarak gerçekleşir (Köse, 2015).



Şekil 2.19: Modifiye edilmiş, tuz stresi altında iki fazlı bitki büyüme modeli (Köse, 2015; Munns, 1993).

2.8 Tuz Stresine Karşı Bitkilerin Geliştirdiği Tolerans Mekanizmaları

Strese tepki ve tolerans yollarının düzenlenmesi için stresin tanınması ilk adım olarak kabul edilir. Osmotik ve iyonik etkiler ya da membran akışında meydana gelen değişiklikler ilk stres sinyali olarak kabul edilir. Bu etkiler ve değişiklikler hasar görmüş protein ve membranları korumak ya da onarmak için, strese duyarlı mekanizmaları harekete geçiren sinyal verme işlemi ile transkripsiyon kontrollerini başlatır (Ercan, 2008).

Stresi algılayan sinyal mekanizmaları spesifik olan genleri uyarmak için gelen sinyali iletirler. Stres koşullarında uyarılan genlerin meydana getirdiği ürünler ikiye ayrılır. Birincisi, stres yanıtında görevli ve sinyal iletiminin düzenlenmesinde rol oynayan protein faktörlerini içeren gen ekspresyonudur. Bunlar protein kinaz, transkripsiyon faktörler, fosfolipaz C ve fosfatazdır.

Ayrıca, fitohormon absisik asit (ABA) de strese cevap verme mekanizmalarında önemli roller oynar. Stres toleransında görev alan ikinci grup ise su kanalı proteinleri, çeşitli osmoprotektanların (şekerler, prolin, glisin-betain) biyosentezi için gerekli enzimleri, makromoleküller ve membranları, proteazlar, Na^+/H^+ taşıyıcıları ve detoksifikasyon enzimlerini içerir (Ercan, 2008).

Bitkilerin tuz stresiyile başa çıkmak için geliştirdiği mekanizmalar biyokimyasal ve moleküler mekanizmalardır. Tuz stresine karşı toleransın artırılması için biyokimyasal stratejiler:

- 1) İyonların seçici olarak birikimi veya uzaklaştırılması,
- 2) İyonların kökler tarafından alınıp yapraklara gönderilmesinin kontrolü,
- 3) İyonların hücreler olarak ya da tüm bitki seviyelerinde pay edilmesi,
- 4) Osmotik düzenleyicilerin sentezlenmesi,
- 5) Fotosentez yolunda meydana gelen değişimler,
- 6) Zar yapısındaki meydana gelen değişimler,
- 7) Antioksidatif enzimlerin indüksiyonu,
- 8) Bitki hormonlarının indüksiyonu

şeklinde. Tuz toleransı mekanizmaları düşük ya da yüksek karmaşıklık seviyesinde mekanizmalar olabilir. İyon alımı ve alınan iyonların bölmelere ayrılması sadece

büyümelerin normalitesi için değil tuzlu ortamlardaki büyüme için de hayati derecede önemlidir, çünkü oluşan stres iyon dengesini bozmaktadır. Sitoplazmadaki yüksek miktardaki tuzu tolere edemeyen glikofit ve halofit bitkiler tuzlu koşullarda fazla tuzu ya vakuollerle sınırlarlar ya da iyonları metabolik fonksiyonlarını harekete geçirmek için farklı dokulara bölüştürürler (Şen, 2005).

Bitkiler stres oluşturabilecek düzeyde tuzlu ortama maruz kaldıklarında kök hücrelerindeki Na^+ pompaları sayesinde Na^+ u ortama geri verirler ve bu sayede sitoplazmalarındaki Na^+ konsantrasyonunu tolere edebilir seviyede tutmaya çalışırlar. Bu mekanizma, vakuollerde Na^+ birikimine dayalı bitkiye zarar vermesini engelleyen bir mekanizmadır. Tuza toleranslı olan bitkilerin, bünyelerine hassas olan bitkilere göre daha az miktarda Na^+ ve Cl^- iyonları aldıklarını, toksik iyonların etkilerini bu sayede tuz toksisitesinden kendilerini korudukları bildirilmiştir (Munns, 2002).

Tuza toleranslı olan bitkilerin tuzdan sakınımı ilk olarak kökler ile olur. Yani yüksek tuz konsantrasyonu varlığında bitkiler tuzları ya içeri almaz ya da bünyesine giren tuzu, enerji kullanarak dışarı pompalayıp kurtulmaktadır. Bitkilerin tuzdan sakınım amacıyla kullandıkları bir diğer mekanizmada hızlı büyüme göstererek birim hacimde alınan tuzun bünyede seyreltilmesidir. Hızlı büyüme sonucunda yapraklarda seyrelen tuz miktarı tolere edilebilir düzeylerde kalmaktadır (Bildiren, 2018).

Bitkiler tuz stresi altındayken sitozolde K^+ konsantrasyonunun yüksek, Na^+ konsantrasyonunun düşük olmasını sağlar. Bu durumu, H^+ pompalarının ve K^+-Na^+ taşıyıcılarının aktivitesini ve ekspresyonunu düzenleyerek gerçekleştirirler. Tuz- stres sensörlerinin bulunması hala zor olmasına rağmen bazı ara sinyal komponentlerinin tanımlandığı bilinmektedir. Bilinen komponentler arasında, kalsiyum bağlayıcı protein olan SOS3 ve serin/treonin protein kinaz SOS2'den oluşan protein kinaz kompleksinin tuz stresi ile ortaya çıkan kalsiyumun sinyali ile aktifleştiği bilinmektedir. Bunun sonrasında fosforlanan protein kinaz kompleksi plazma membran Na^+/H^+ antiporter SOS1 gibi iyon taşıyıcıları aktive eder (Kocca, 2017).

Bitki iyon dengesi ve tuz toleransının temel regülatörü ve tuza karşı aşırı derecede duyarlı olarak görülen SOS sinyal yolu tarafından sağlanır. SOS yolu Na^+ ve K^+ iyon dengesini düzenler ve genlerin kontrolünü gerçekleştirir. *SOS1* geninin

kodladığı yer plazma membranı Na^+/H^+ taşıyıcılar, *SOS2* geninin kodladığı yer bir serin/treonin proteinkinaz ve *SOS3* geni ise kalsiyum bağlayıcı bir proteindir. *SOS2*'nin *SOS3* tarafından aktive edilmesi *SOS3* ve *SOS2* geni birbirleriyle etkileşime girdiğinde gerçekleşir. *SOS2*, *SOS3* ile birlikte ise *SOS1*'i aktive ederek *SOS1*'in gen ekspresyonu seviyesini kontrol eder. Tuz stresine karşı iyon dengesi ve tuz toleransı *SOS1* geninin aktifleştirilmesi ile sağlanır. Fazla Na^+ varlığında sitosoldeki Ca^{+2} miktarı artar, Ca^{+2} sensörü olarak bilinen *SOS3* sinyal yolu tarafından algılanır ve *SOS* yolunu aktifleştirir. Ortamdaki Ca^{+2} 'nın artışı sayesinde *SOS3*, *SOS2* proteinine bağlanarak *SOS2* proteinini etkinleştirir. Bu da *SOS2* aktivitesinin, *SOS3* ve Ca^{+2} 'ya bağlı olduğunu göstermektedir. *SOS2* ve *SOS3* birlikte protein kinaz kompleksini oluşturarak, *SOS1* geninin aktivasyonunu sağlayarak fazla Na^+ 'nın hücre dışına çıkmasını sağlayan *SOS1* proteinini sentezler. Ayrıca oluşan *SOS2*-*SOS3* protein kinaz kompleksi, *HKT1* geninin etkinliğini inaktive ederek Na^+ 'nın hücreye girişini engeller. *SOS2*, *NHX*'i (Na^+/H^+ taşıyıcıları) aktive ederek fazla Na^+ 'nın vakuolde depolanmasını sağlar. Bu da iyon dengesine ekstra katkı sağlar. Bu karmaşık yapı sayesinde *CAX1*' in ($\text{Ca}^{+2}/\text{H}^+$ antiportu) etkinliği artar ve sitosolik olarak Ca^{+2} dengesi sağlanır. Bunların yanında Ca^{+2} miktarının artışı, diğer Ca^{+2} bağlı proteinler (kalneksin, kalmodulin (*CaM*)) tarafından algılanır ve bu proteinler de *NHX* ile bağlantı kurarak *NHX*'in aktivasyonunu sağlar. Hücre zarındaki reseptörlerin bu sayede tuz stresini algılaması sayesinde fosfolipazlar (*PLC*) aktifleştirilir. Aktifleştirilen *PLC*'ler fosfolipidlerle birleşip stres toleransının sağlanmasında önemli olan ikincil habercilerin (*DAG*; diaçil gliserol, *IP3*; inositol trifosfat) oluşturulmasına neden olur. *IP3*'ler ise Ca^{+2} 'nın serbest kalmasını. *DAG*'lar ise protein kinazları etkinleştirilmesini sağlar (Bildiren, 2018).

ABA (fitohormon absisik asit) bitkinin su dengesinin düzeninden ve ozmotik stres toleransından sorumlu gibi görünse de tohum gelişimi, dormansi (uyku hali), çimlenme ve stoma kapanmasının yanı sıra, çeşitli stres etmenlerine karşı cevap olarak merkezi bir rol oynamaktadır. Yüksek tuz ya da kuraklığın oluşturduğu ozmotik stresin iki yoldan iletiminin olduğu çalışmalar sırasında görülmüştür. Birincisi, *ABA*'ya bağlı, diğeri ise *ABA*'dan bağımsızdır. Soğuk, gen ifadesi üzerindeki etkilerini büyük ölçüde *ABA* bağımsız bir yoldan uygular (Finkelstein et al., 2002). *ABA* ile uyarılabilen genlerin promotörlerinde *ABA*'ya yanıt veren elemente (*ABRE*) sahiptirler. Temel lösün fermuar faktörü olarak bilinen (*bZIP*) strese neden olan genler, *ABRE* elemanına bağlanarak sinyal iletiminin oluşmasında işlev görür. Koornneef (1998), *Arabidopsis*'te

aba1, aba2 ve aba3 isimli ABA eksikliği olan mutantlar olduğunu bildirmiştir. Herhangi bir stres işlemi olmadan, bu mutantların gelişimi, yabancı tip bitkilerle karşılaştırılabilir. Tuz stresi altında ABA eksikliği olan mutantlar da zayıf büyüme gösterdiği görülmüştür (Xiong et al., 2001; Ercan, 2008).

2.9 Bitki Doku Kültürü ve Biyoteknolojik Yaklaşımlar

Tuzluluğun da içerisinde olduğu stres faktörlerinin neden olduğu zararlar dünya çapında büyük ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Klasik ıslah teknolojileri ve uygun yönetim stratejileri bitki ıslahında önemli rol oynamaktadır. Klasik ıslah programlarında türler ve cinsler arası melezleme ile stres toleransını indüklemek için bitkilere uygun genlerin aktarımı mümkündür. Ancak klasik ıslah metodunda başarı oranı düşüktür ve istenilen sonuçların elde edilmesi güçtür (Rai et al., 2011). Çeşitli araştırmacılar, klasik bitki ıslahı ile özellikle yabancı döllen bitkilerde melez çeşitlerden yararlanarak elde edilen ürünlerin miktar ve kalitesinde artış olduğunu, öte yandan hastalık ve zararlılara dayanıklılık başta olmak üzere diğer biyotik ve abiyotik stres faktörlerine karşı aynı başarının sağlanamadığını bildirmişlerdir (Aydın ve Turhan, 2009; Ulukan, 2007). Bu yüzden geleneksel bitki ıslahının yanı sıra, bitki doku kültürleri ticari alanlarda da kullanılmaktadır. Özellikle hastaliksız bitki üretimi, sentetik tohum üretimi, mikroçoğaltım, sekonder metabolitlerin üretimi ve kimerik bitkilerin oluşturulmasında ilk başvurulana ve sıklıkla kullanılan yöntemdir.

Sürdürülebilir tarım için bitki elde edilmesindeki kritik problemlerin çözümünde biyoteknolojik yaklaşımlara ihtiyaç bulunmaktadır (Rai et al., 2011). Bitki biyoteknolojisi, genetik varyabilitenin elde edilmesi ve manipüle edilmesinde ıslahçılara yardım etmektedir (Abdel-Raheem et al., 2007). Biyoteknolojik yaklaşımların getirisi olan bitki doku kültürü teknikleri, abiyotik ve biyotik stres faktörlerinin en önemlisi olan tuza dayanıklı ve toleranslı bitkilerin *in vitro* seleksiyonu açısından uygun yöntemler olarak bilinmektedirler (Koubaa et al., 2015).

Dış ortamı olumsuz koşullarla temsil etmek için uygun bir alternatif olarak kabul edildiklerinden, *in vitro* yaklaşımları kullanan tuz stresi çalışmalarının yapılması bir ıslah programındaki seçim aşamasında, bazı çevresel sınırlamalar bu sistem kullanılarak çözülebildiğinden daha iyi beklentiler de sunmaktadır (Rezende et al., 2018).

Bütün kültür bitkileri belli düzeylerdeki tuzluluğa karşı duyarlıdırlar. Bitkinin tuzluluğa duyarlı olmasının anlamı, düşük tuzluluk düzeylerinde dahi çözelti içerisinde oluşan ozmotik basınç değerlerinin bitki kökleri tarafından karşılanamamasıdır. Ekonomik veya çevresel sınırlamalar nedeniyle topraktan tuzu uzaklaştırmak mümkün olmayabilir. Bu gibi durumlarda topraktaki tuz düzeyine tolerans gösterebilen bitkiler seçilmelidir (Ekmekçi ve ark., 2005).

Pamuğun orta derecede tuza toleranslı olduğu bildirilmiştir; bununla birlikte, bu tolerans sınırlı değildir, aynı zamanda bitkinin gelişim aşamasına, dokusuna ve türüne göre de değişiklik gösterir. Hassas ve toleranslı pamuk çeşitlerinde bu özellikleri farklı bileşenler belirler. Çünkü tuz toleransı çoklu mekanizmalar tarafından kontrol edilen fizyolojik olarak karmaşık bir özelliktir. Daha önceki çalışmalara dayanarak, bitkilerin, tuz toleransı elde etmek için tüm kilit mekanizmaların tam olarak düzenlenmesi gerektiği görülmektedir; aksine, tüm savunma stratejisinin bir veya birkaç spesifik bileşeni, bir mahsulden diğerine büyük olasılıkla değişebilen önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir (Wang et al., 2017).

Pamuk bitkisi, biyotik ve abiyotik strese karşı oldukça duyarlı olduğundan, yoğun bir mahsul yönetimi gerektirir. Geleneksel ıslah programları, agronomik özelliklerde sürekli iyileştirmeler yapmış olsa da, daha fazla gelişme için çok fazla genetik çeşitlilik mevcut değildir (Haq, 2005). Bununla birlikte, geleneksel yöntemlerle pamuğun genetik gelişimi, özellikle zararlı bitkilere ve pamuk bitkisi için önemli tehditlere neden olan hastalıklara karşı, gerekli varyasyonun bulunmaması gibi birçok faktör nedeniyle sınırlıdır.

Tuza toleransın fizyolojik ve biyokimyasal mekanizmalarının aydınlatılması için yapılan temel araştırmalarda bitki doku kültürü yönteminin kullanılmasının sebebi bu çalışmalarda tamamen kontrollü ve homojen materyalin kullanılması ile klasik ıslah yöntemlerine göre çok sayıda avantaj sağlanmasıdır (İzci, 2007). Ayrıca bu çalışmalarda kısa sürede sonuç alınabilmektedir.

İzci (2007), 3 farklı pamuk (*Gossypium hirsutum* L.) çeşidinin yaprak ve hipokotil eksplantından oluşturduğu kalluslar üzerine uyguladığı artan tuz konsantrasyonuna bağlı olarak fizyolojik, morfolojik ve biyokimyasal değişimleri

incelemiştir. Sonuçlara göre en iyi fotosentetik aktiviteyi 150 mM uyguladığı orta derecede dayanıklı olan çeşidin verdiğini ve antioksidatif enzimler ile prolin miktarının artan tuz konsantrasyonuna bağlı olarak tüm çeşitlerde arttığını bildirmiştir.

Pessarakli (2014), tuz stresi koşulları altında, bitki büyümesi, azot absorpsiyonu ve metabolizması, protein sentezi ve su emiliminin etkilediğini fakat tuza dayanıklı olduğu bilinen pamuğun bu faktörlerinin etkilenmediğini bildirmişlerdir. Bunu da tuz toleransı, büyüme, besin emilimi, metabolizması ve su alımı arasındaki bağ ile ilişkilendirmişlerdir.

Şahin ve Akçalı (2016), farklı pamuk çeşitlerine farklı konsantrasyonda uyguladıkları tuzun çimlenme üzerine etkisini araştırdıkları çalışmalarında, tüm çeşitlerde 100 mM ve üstünde çimlenmenin durduğunu bildirmişlerdir.

Renu and Goswami (1995), tuz stresinin pamukta kotiledon yapraklarında total klorofil ve karotenoid içeriğini düşürdüğünü bildirmişlerdir.

Zhang et al (2014), *Gossypium hirsutum* L.'da artan konsantrasyonda tuz stresi uygulanan, tuza duyarlı ve dayanıklı olduğu bilinen iki çeşit üzerindeki fizyolojik ve biyokimyasal etkileri araştırdıkları çalışmalarında dayanıklı çeşidin duyarlı çeşide göre daha belirgin antioksidan aktivite ile fotosentetik aktivite değiştirdiğini görmüştür. Ayrıca prolin miktarının dayanıklı çeşitte yükseldiğini bildirmişlerdir.

Ashraf and Ahmad, (2000) sera koşullarında tuza duyarlı ve dayanıklı olduğu bilinen farklı pamuk çeşitlerine uyguladıkları tuz stresinin verimlerine ve iyon birikimlerine etkisini inceledikleri çalışmada artan tuz konsantrasyonundan tüm çeşitlerin etkilendiğini, fakat dayanıklı çeşitte duyarlı çeşide göre daha fazla verim ile daha fazla potasyum birikimi olduğunu, duyarlı çeşitte ise daha fazla iyon birikimi olduğunu bildirmişlerdir. Bunun sebebinin pamukta daha önce yapılan çalışmalara dayanarak, tuz stresi altında iyon birikiminin fazla olduğunu ve biriken sodyum iyonunu dengede tutmak için potasyum iyonunun üretiminin gerçekleştiği düşünülmektedir.

Meloni et al (2003), pamuk bitkisinin farklı türlerinin melezlenmesiyle elde ettikleri iki farklı çeşitte tuz stresinin etkilerini araştırdıkları çalışmalarında çeşitlerin fotosentetik aktivitelerinin tuz stresine bağlı olarak değişmediğini, fakat enzim aktivitesinin dayanıklı olduğu bilinen çeşitte artış gösterdiğini bildirmişlerdir.

Desingh ve Karaganaj (2007), iki farklı pamuk çeşidinde artan tuz konsantrasyonlarının fotosentetik, antioksidan enzim aktivitesi ve prolin miktarının incelendiği çalışmalarında tüm bu parametrelerin dayanıklı olduğu bilinen çeşitte artış gösterdiğini bu yüzden de tuza karşı savunma mekanizmasında bu parametrelerin önemli olduğunu bildirmişlerdir.

Garratt et al., (2002), *Gossypium herbaceum* L. pamuk bitkisinde tuza duyarlı, orta derecede toleranslı ve toleranslı olduğu bilinen çeşitlerin kallus kültürlerinde tuz stresinin etkisini araştırdıkları çalışmada artan konsantrasyonlarda uyguladıkları tuz sonucu çeşitlerin yaş ağırlıklarında azalma olduğunu, fakat azalmanın tuza toleranslı olduğu bilinen çeşitte en az olduğunu gözlemlemişlerdir. Ayrıca, tuz konsantrasyonu arttıkça sadece tuza toleranslı olduğu bilinen çeşidin enzim aktivitesinde önemli değişimler olduğunu, diğerlerinde ise değişme olmadığını bildirmişlerdir.

Saleh (2012), pamuk (*Gossypium hirsutum* L) bitkisinde 200 mM tuz uyguladıkları farklı çeşitlere karşı büyüme parametrelerini inceledikleri çalışmada, kontrol grubuna göre tuz uyguladıkları gruptaki büyüme parametrelerinin çeşitlere bağlı olarak değiştiğini bildirmişlerdir.

Bora (2014), yaptığı çalışmada Biber (*Capsicum annuum*) bitkisine artan konsantrasyonda uyguladığı (0, 50, 75, 100 mM) tuz stresi sonucunda tuz konsantrasyonu arttıkça büyüme ve gelişmenin gerilediğini gözlemlemiştir.

Keleş (2019), farklı konsantrasyonlarda uygulanan (0, 50, 75, 150, 300 mM) NaCl tuz stresi altında Aspir (*Carthamus tinctorius* L.) bitkisinin morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal parametreleri incelediği çalışmasında, gelişimin en yüksek tuz konsantrasyonunda durduğu ve artan konsantrasyona bağlı olarak büyüme ve gelişmenin gerilediğini bildirmiştir.

Karakuş (2008), aspir bitkisinde farklı konsantrasyonlarda (0, 50, 75, 150, 300 mM) tuzluluk faktörünün morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal parametreler üzerindeki etkisini incelemiştir. NaCl konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak tuzluluk şiddetinin artışına bağlı olarak prolin içeriğinin de arttığı gözlemlenmiştir.

Kılavuz (2006), nohutta üç farklı tuz ve üç farklı fosforun artan konsantrasyonda etkilerinin araştırdığı çalışmada, artan tuz uygulamasıyla birlikte bitki boyu, bitkideki yan dal sayısı ve yaş ağırlığının azaldığını gözlemlemişlerdir.

Duman ve ark (2017), *Amsonia orientalis* bitkisine uyguladıkları artan konsantrasyonlardaki (0, 25, 50, 75, 100, 125 ve 150 mM) tuz stresi varlığında elde ettikleri protein miktarlarının kontrole göre, artan tuza bağlı olarak değişmediği ve kontrole yakın sonuçlar elde ettikleri görülmüştür.

Osswald et al (1992), tuz stresine bağlı oluşan oksidatif stresin oluşturduğu süperoksit radikallerini süpüren sistemler hasar gördüğünde ya da çalışmadığında, ilk olarak plastidlerin bütünlüğünün zarar görerek fotosentez hızının azaldığı bildirmişlerdir.

Reddy and Vora (1986), tuz uygulanan bitkilerin klorofil içeriğinde görülen azalmanın, klorofil parçalayan klorofilaz enziminin aktivitesindeki artışa bağlı olduğu görüşünü ileri sürmüşlerdir.

Tuz stresine maruz kalan bitkilerde, iyon birikiminde meydana gelen artış sebebiyle total klorofil miktarlarında azalma görülmektedir. Bu azalma, tuzluluğun artmasıyla klorofilin moleküler yapısının bozulmasından ve sonuç olarak da klorofil sentezinin azalmasından kaynaklanmaktadır (Çanakçı ve Munzuroğlu, 2004).

Köşkeröğlu (2006), mısır bitkisinde üç farklı tuz konsantrasyonu ve su stresinin (normal sulama ve PEG 6000) prolin birikimi üzerine etkilerinin araştırıldığı çalışmada, artan tuz konsantrasyonu ve su stresi koşullarında total klorofil ve karotenoid miktarının azaldığını bildirmişlerdir.

Ercan (2008), mercimek (*Lens culinaris* M.) fidelerine tuz ve kuraklık stresinin antioksidan savunma sistemi ve fizyolojisi üzerine etkilerini araştırdığı çalışmada, tuz stresinin prolin miktarıyla doğru orantıda arttığını bildirmiştir.

Gehlot (2005), tuza duyarlı ve toleranslı olan dört susam çeşidi üzerinde farklı tuz (0, 30, 50 ve 70 mM) konsantrasyonlarının etkilerinin araştırıldığı çalışmada, tuza dayanıklı olan çeşidin diğer çeşitlere göre daha fazla prolin biriktirdiği bildirmişlerdir.

Koca (2007), yaptığı çalışmada tuz stresi uyguladıkları bitki dokularında sonuç olarak lipid peroksidasyonunun stresin bir göstergesi olduğunu ve ürünü olan MDA'nın enzim aktiviteleri ile arasında ters bir olduğunu bildirmiştir. Ayrıca, tuz stresine bağlı

olarak artan prolin miktarının enzim aktivitesi üzerine etkili olmasından dolayı MDA miktarını da önemli derecede azalttığı tahmin edilmektedir.

Tuzluluk, genel olarak yaprak hücrelerinde erken yaşlanmaya sebep olmaktadır. Bunun sonucunda da protein veya klorofil konsantrasyonunda azalma, hücre zarı geçirgenliğinde ise artış meydana gelmektedir. Tuz stresinin neden olduğu yapraklardaki erken yaşlanma ile lipid peroksidasyonu ürünü olarak bilinen malondialdehit (MDA) arasında bir bağlantı olduğu düşünülmektedir (Kuşvuran, 2008).

Gossett et al (1994), tuz stresine duyarlı olduğu bilinen pamuk çeşidine uygulanan 150 mM tuz konsantrasyonu sonrası ölçülen lipid peroksidasyon miktarının dayanıklı çeşitten %51 oranında daha fazla olduğunu bildirmişlerdir.

Shalata et al (1998), domatesin genotiplerinde; Karanlık (2001) buğday, Yaşar (2003) patlıcanda tuza toleransı yüksek olduğu bilinen genotiplerin MDA miktarlarının düşük, yani daha az lipid peroksidasyonuna sahip olduğunu, tuza duyarlı olan genotiplerin ise daha fazla lipid peroksidasyonuna sahip olduğunu belirlemiştir. Tuz stresinin farklı patlıcan genotipleri üzerindeki etkisini araştıran Yaşar (2003), tuza toleransı olduğu bilinen patlıcan genotiplerinin yapraklarındaki MDA miktarının; duyarlı olduğu bilinen genotiplere göre daha düşük olduğunu belirlemiştir.

Kuşvuran (2008), bazı kavun genotiplerine tuz stresinin etkisini araştırdıkları çalışmalarında bitkinin tuzdan etkilenme düzeyi ile yapraklarda ölçülen MDA miktarı arasında ilişki bulunduğunu görmüşler ve MDA miktarındaki artış ya da azalışa göre yapılan sıralamasının, tuza tolerans özelliğiyle bağlantılı olduğunu saptamışlardır. Kavunları kontrol grupları ile karşılaştırdıklarında tuza toleranslı olduğu bilinen genotipin MDA miktarlarında konsantrasyon artışına bağlı olarak azalma, tuza duyarlı olan genotiplerin ise MDA miktarlarında artış meydana geldiğini bildirmişlerdir.

Tuzlulukla ilgili yapılan çalışmalarda GR aktivitesi ve APX aktivitesi birlikte incelenmiştir. Çeltik köklerinde, tuz stresi altında hem toleranslı, hem de hassas çeşitlerde GR aktivitesinde anlamlı bir azalma olduğu gösterilmiştir (Demiral ve Türkan, 2005).

de Azevedo Neto et al., (2006), Tuz toleranslarında farklılık gösteren iki mısır çeşidinin yaprakları ve köklerinde tuz stresi konsantrasyonunun artışıyla birlikte doğru orantılı olarak GR aktivitesinde artış olduğunu göstermiştir.

Glutatyon redüktaz aktivitesi Ercan (2008)'in yaptığı çalışmada hem kuraklıkta, hem de tuz stresi altındaki bitkilerde anlamlı olarak artmıştır. Tuz stresi muamelesinde GR aktivitesi sürgünlerde artmıştır. Bu sonuçlara göre tuz stresi koşullarında

sürgünlerde antioksidan savunmadan GR, APX ve prolin sorumlu olduğu gösterilmiştir. Ayrıca köklerde, tuz muamelesinde, GR aktivitesi önemli ölçüde artmıştır ve kuraklıkla muamele edilenlerden hiçbir fark göstermemiştir. Yine tuzda strese uğramış köklerde GR ve APX aktivitelerinin oksidatif strese karşı savunmadan sorumlu olduğu gösterilmiştir.

Farklı patlıcan anaç çeşitlerinin tuzluluk stresine karşı gelişimlerini araştıran Kıran ve ark. (2015), 150 mM tuz uyguladıkları farklı patlıcan çeşitlerinin anaçlarına yaptıkları tayinlerde GR ve APX aktivitelerinin kontrol grubuna göre tüm çeşitlerde artış gösterdiğini bildirmişlerdir.

Yaşar ve ark. (2007), tuzluluğa duyarlı ve dayanıklı olduğu bilinen karpuz genotiplerinin yapraklarında tuz stresinin etkilerini araştırdıkları çalışmada enzim aktivite testleri yapmışlardır. Duyarlı olduğu bilinen çeşitlerde glutatyon redüktaz aktivitesi tuz uygulanan grupta kontrol grubuna göre azalma, dayanıklı olduğu bilinen çeşitlerde ise artış göstermiştir. Askorbat peroksidaz aktivitesi ise tuz uygulanan gruplarda iki çeşitte de kontrole göre artış göstermiştir.

Hernandez et al., (1995), bezelyede tuz stresi uygulamasının APX enzimi aktivitesini tolerant çeşitte artırdığını, duyarlı çeşitte ise etki etmediğini bildirmiştir.

Gossett et al., (1994) pamukta, Hernandez et al., (1995) bezelyede, Karanlık (2001) buğdayda tuzlu koşullarda dayanıklı bitkilerin, duyarlı olanlara göre daha yüksek oranlarda artan GR enzim aktivitelerine sahip olduklarını bildirmişlerdir. Shalata and Tal (1998), domatesin tuza hem toleranslı ve duyarlı genotiplerinde, GR aktivitelerinin tuz stresi altında azalma gösterdiğini bildirmiştir. Aynı çalışmalarda paralel olarak APX aktivitelerinin dayanıklı çeşitlerde tuz stresine bağlı olarak daha fazla arttığı bildirilmiştir.

Zhang et al. (2014), *Gossypium hirsutum* L.'da; Mostofa et al. (2014), *Oryza sativa*'da; Gao et al. (2015), *Solanum tuberosum*'da; Talaat (2015), *Phaseolus vulgaris*'de yaptıkları çalışmada tuz stresi uygulanan örneklerin kontrole göre, SOD aktivitesinde artış olduğu bildirilmiştir.

Jebera et al. (2005), fasulye bitkisine ait farklı genotiplerle yaptıkları çalışmalarında ise tuza toleranslı genotipin daha yüksek antioksidan aktivite gösterdiğini, bu sayede tuz stresinden daha az etkilendiğini bildirirken, SOD enzim aktivitesi ile tuzu tolere edebilme kabiliyeti arasında kuvvetli bir şekilde ilişki olduğunu vurgulamışlardır.

Yılmaz ve Şeyda (2015), yaptıkları çalışmada ise *P. vulgaris*'de tuz stresine maruz bırakılan grubun SOD aktivitesi kontrol grubuna göre belirgin değişiklik göstermemiştir.



3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Kullanılan Kimyasallar

2-Tiyobarbütirik asit (Merck)

3,3' diaminobenzidin (DAB) (Santa Cruz)

4-(2-Pyridylazo)resorcinol (Acros)

Amonyak (Merck)

Asetik Asit (Merck)

Aseton (Sigma, Germany)

Askorbik asit (Merck)

DPPH (Santa Cruz)

Etanol (Sigma, Germany)

Etilen diamin tetraasetik asit (EDTA) (Sigma, Germany)

Fenil metil sülfonil florid (Alfa Aesar)

Gliserol (Isolab)

Hidrojen peroksit (Carlo Erba)

Jelatin (BD)

L-metiyonin (Duchefa)

Metanol (Merck)

β -NADP(H) (Sigma, Germany)

Ninhidrin (Merck)

Nitroblue tetrazolyum (NBT) (Duchefa, Germany)

Oksidize glutatyon (Sigma, Germany)

o-fosforik asit %85 (Carlo Erba)

Perklorik asit %60 (Merck)

Polivinil pirolidon (PVP) (Sigma, Germany)

Potasyum titanyum oksalat (Alfa Aesar)

Potasyum iyodid (Sigma, Germany)

Potasyum fosfat tamponu (Carlo Erba)

PVP-10 (Duchefa)

Riboflavin (Alfa Aesar)

Sıvı azot

Sulfosalicylic Acid Dihydrate (Merck)

Tampon solüsyonu (Hidrojen Fosfat) (Merck, Germany)

Tiyobarbitürik asit (TBA) (Sigma, Germany)

Toluen (Merck)

Trikloroasetik asit (TCA) (Sigma, Germany)

Trolox (Santa Cruz)

3.1.2 Kullanılan Cihaz ve Aletler

Buzdolabı +4 °C (Arçelik)

Derin dondurucu -20 °C (Arçelik)

Etüv (Nüve FN 500)

Floresan mikrokobu (Olympus)

Hassas terazi (Preciso XB 220A)

Manyetik karıştırıcı (IKA C-MAG HS 7)

Mikropipet (Thermo, USA)

Mini santrifüj (eppendorf 5415R)

pH metre, inoLab (wtw, level 1)

Soğutmalı santrifüj (Hettick)

Spektrofotometre (Optizen)

Vorteks (BIOSAN FVL- 2400N)

3.1.3 Bitki Materyali

Proje materyali olarak Nazilli Pamuk Araştırma Enstitüsü'nden temin edilen tuz stresine tolerant “Carmen” ve duyarlı “NM-503” pamuk çeşitlerine ait tohumlar kullanılmıştır.

3.2 Yöntem

3.2.1 Tohum yüzey sterilizasyonunun yapılması ve tohum kültürlerinin kurulması

In vitro çimlendirme denemeleri için yarı katı ½ MS (Murashige and Skoog, 1962) besin ortamı kullanılmıştır (Çizelge 3.1). Yarı katı besin ortamının hazırlığı için, ilk olarak önceden hazırlanan stok çözeltilerden 1 litre besin ortamı için eklenmesi gereken miktarların yarısı pipetle çekilerek besin ortamının yapılacağı behere aktarılmıştır. Daha sonra besin ortamına eklenmesi gereken kimyasallar ve karbon kaynağının yarısı (15 g/L sükroz) tartılarak ilave edilmiştir. Son olarak hacim distile su ile 1 litreye tamamlanmıştır. Katı bileşikler iyice çözüldükten sonra seyreltilmiş 1N NaOH (sodyum hidroksit) veya 1N HCl (hidrojen klorür) kullanılarak pH 5.8'e ayarlanmıştır. Besin ortamı, 3.5 g/L gelrite ilave edildikten sonra besin ortamı manyetik karıştırıcılı ısıtıcıda bulanıklığı gidene kadar kaynatılmış ve sıcak olarak 210 mL'lik kavanozlara her biri 25 mL içerecek şekilde paylaştırılmıştır. Ağızları kapakla kapatılan kültür kavanozları, steril edilmek amacıyla 121°C'de, 105 kPa basınçta 15 dakika süre ile otoklavlanmıştır. Çalışma kapsamında kullanılan temel besin ortamının içerikleri Çizelge 3.1'de verilmiştir (Murashige and Skoog, 1962)

Çizelge 3.1: MS ortam kompozisyonu (Murashige and Skoog, 1962).

Bileşikler	Murashige and Skoog (MS) besin ortamı (1962)	Miktar (mg/L)		Kallus ortamı (Modifiye MS)
		½ MS	Gamborg (B5) besin ortamı (1968)	
Makro Elementler	MS	½ MS	B5	Modifiye MS
NH ₄ NO ₃	1.650	825	----	1.650
KNO ₃	1.900	950	2.500	1.900
CaCl ₂ .2H ₂ O	440	220	150	440
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	185	250	370
MgCl ₂	----	----	----	750
KH ₂ PO ₄	170	85	----	170
(NH ₄) ₂ SO ₄	----	----	134	----
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	----	----	150	----
Mikro Elementler	MS	½ MS	B5	Modifiye MS
KI	0,83	0,42	0,75	0,83
H ₃ BO ₃	6,2	3,10	3	6,2
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3	11,15	----	22,3
MnSO ₄ .H ₂ O	----	----	10	----
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6	4,30	2	8,6
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	0,13	0,25	0,25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	0,01	0,025	0,025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	0,01	0,025	0,025
Na ₂ .EDTA	37,3	18,65	37,3	37,3
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8	13,90	27,8	27,8
Organik Bileşikler	MS	½ MS	B5	Modifiye MS
Myo-İnositol	100	50	100	100
Nikotinik Asit	0,5	0,25	1	1
Pridoksin-HCl	0,5	0,25	1	1
Thiamin-HCl	0,1	0,05	10	10
Diğer Bileşikler	MS	½ MS	B5	Modifiye MS
Glisin	2	1	----	----
Sukroz	30.000	15.000	20.000	----
Glukoz	----	----	----	30.000

Tohumlar; öncelikle tohum kabuğunu inceltmek amacıyla % 98'lik Sülfürik asitte (H_2SO_4) 3-4 dakika çalkalanıp, akabinde steril saf su ile durulanmıştır. Ardından % 0.01'lik Tween-20 eklenmiş % 20'lik ticari sodyum hipoklorit ($NaClO$ -aktif klor içeriği % 4-5 olan) çözeltisi ile 20 dakika çalkalanarak steril edilmiş ve üç kez steril saf suda durulanarak sterilizasyonu yapılmıştır. Sterilizasyonu gerçekleştirilen tohumlar son olarak 24 saat boyunca steril saf su içerisinde bekletilmiştir.

3.2.2 Tohumların çimlendirilmesi ve steril fidelerin elde edilmesi

Yirmi dört saat sonunda steril tohumların fazla suları steril peçete ile alınarak tohumlar % 0.3 gelrite içeren ve pH'ı 5,8'e ayarlanmış $\frac{1}{2}$ MS (Murashige and Skoog, 1962) besin ortamında kültüre alınmışlardır. Kültür kabı olarak 25 mL besin ortamı içeren 210 mL hacimli kavanozlar kullanılmıştır. Her bir çeşit için 100'er adet tohum kültüre alınmış ve kültürler 8 saat karanlık/16 saat aydınlık fotoperiyotta, 25 ± 2 °C sıcaklıkta ve 3500 lux ışık şiddetinde muhafaza edilmiştir. Muhafaza edilen kültür ortamındaki 7 günlük steril fideler Şekil 3.1'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1: Steril Fide

3.2.3 Kallus kültürlerinin ve tuz stresinin oluşturulması

Kallus kültürlerini başlatmak amacıyla, steril olarak çimlendirilen 7 günlük fidelerden 1-1.5 cm uzunluğunda kesilen hipokotil eksplantları kullanılmıştır. Eksplantlar; MS tuzları, B5 (Gamborg et al, 1968) vitaminleri, 0.1 mg/L 2,4-D, 0.5 mg/L Kinetin, % 3 Glukoz içeren, % 0.3 gelrite ile yarı katı hale getirilmiş ve pH'ı 5,8'e ayarlanmış besin ortamında kültüre alınmışlardır. Kültür kabı olarak 25 mL kallus

ortamı içeren 210 mL hacimli kavanozlar kullanılmıştır ve kültürler 8 saat karanlık/16 saat aydınlık fotoperiyotta, 25 ± 2 °C sıcaklıkta ve 3500 lux ışık şiddetinde muhafaza edilmiştir. Kallus kültürlerini oluşturmak amacı ile kültüre alınan hipokotil eksplantları üzerinde oluşan kallus dokusu izole edilerek 3 hafta sonra aynı besin ortamında birinci altkültür ortamlarına transfer edilmiştir. Kallusları çoğaltmak amacı ile kültürler her üç haftada bir altkültüre alınmıştır. Dört altkültür sonunda tuz denemelerine geçilmiştir.

3.2.3.2 Kallus kültürlerinde farklı konsantrasyonlarda tuz uygulanması

Uygun tuz konsantrasyonunu belirlemek amacıyla kabin içerisinde 1.0 g ağırlığında aynı renk ve tekstüre sahip kalluslar tartılarak 0-50-100-150-200-250-300-350-400 mM NaCl içeren aynı kallus oluşumuna yönelik besin ortamlarında kültüre alınmışlardır. Kültür kabı olarak 25 mL besin ortamı içeren 210 mL hacimli kavanozlar kullanılmıştır. Her bir kavanoza 1.0 g ağırlığında kallus aktarılmıştır. Denemeler üç tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiş ve her bir tekerrür için 7 eksplant kullanılmıştır. Kültürler 8 saat/karanlık 16 saat aydınlık fotoperiyotta, 25 ± 2 °C sıcaklıkta ve 3500 lux ışık şiddetinde bekletilmiş ve 4. hafta sonunda gözlem yapılmıştır.

3.2.3.3 Kallus kültürlerinde uygun tuz konsantrasyon skalasının belirlenmesi

Tuz uygulamasından dört hafta sonra her ortamda gelişen kallusların yaş ağırlıkları ölçülmüş ve kallus rengi, kallus yapısı, kararma yüzdesi (%) belirlenmiştir. Farklı konsantrasyonlarda tuz stresine maruz kalan kalluslarda gelişimin gerilediği ve sınırlandığı konsantrasyonu yaş ve kuru ağırlık büyüme oranlarına göre 400 mM olarak belirlenmiştir.

3.2.4 Morfolojik gözlem parametreleri

Her iki çeşide ait kallusların kontrol ve tuz uygulaması yapılan gruplarında aşağıdaki parametreler incelenmiştir.

3.2.4.1 Kallus rengi

İki çeşide ait olan kallusları, maruz kaldığı konsantrasyonlar, her hafta incelenerek 30. gün sonunda renk skalalarına göre ayrılarak yüzde dağılımı hesaplanmıştır. Şekil 3.2, Şekil 3.3. ve Şekil 3.4'te kallusların renginin hangi skalaya göre belirlendiği gösterilmiştir.



Şekil 3.2: Kallus renk skalasında yeşil renge sahip kallus olarak nitelendirilen kallus rengi



Şekil 3.3: Kallus renk skalasında krem renge sahip kallus olarak nitelendirilen kallus rengi



Şekil 3.4: Kallus renk skalasında kahverengine sahip kallus olarak nitelendirilen kallus rengi

3.2.4.2 Kallus Yapısı

30.gün sonunda iki çeşide ait farklı tuz konsantrasyonuna maruz kalan kalluslar kompakt (sert) veya gevşek (yumuşak) olarak gruplandırılmıştır.

3.2.4.3 Kallus oluşum yüzdeleri (%)

Tuz denemelerinden önce kallusların oluşması için oluşan fidelerin hipokotil kısmından kavanoz başına 3'er adet olmak üzere 30 adet kavanoz içerisine toplamda 90 adet eksplant kültüre alınmış ve 1 hafta sonra her bir kavanozdan kallus oluşumları hesaplanarak kallus oluşum yüzdeleri belirlenmiştir.

3.2.4.4 Kararma yüzdesi (%)

Tuz denemelerindeki her bir çeşide ait her konsantrasyondaki tekerrürlerde 7 adet olmak üzere toplamda 21 kavanozun kalluslarına ait kararma yüzdesi hesaplanmıştır.

3.2.4.5 Kontaminasyon yüzdesi (%)

Tuz denemelerindeki her bir çeşide ait her konsantrasyonda kontaminasyon yüzdesi hesaplanmıştır.

3.2.5 Fizyolojik gözlem parametreleri

Her iki çeşide ait kallusların kontrol ve tuz uygulaması yapılan gruplarında büyüme özellikleri ile ilişkili olarak:

3.2.5.1 Kallus yaş ağırlığı

Her iki pamuk çeşidindeki kontrol grubu ile tuz stresi uygulanan grupların her tekerrüründeki kavanozlardaki kallusların 4 hafta sonra tartılarak yaş ağırlık ölçümleri yapılmıştır.

3.2.5.2 Kallus kuru ağırlığı

Her iki pamuk çeşidinde kontrol ve tuz stresi uygulanan kallus gruplarından 4 hafta sonra 1 gram tartılarak 70 °C sıcaklıkta 72 saat süre ile kurumaya bırakılmış ve ağırlık ölçümleri yapılmıştır.

3.2.5.3 Kuru ağırlık oranı (%)

Ölçümleri yapılan her iki pamuk çeşidinin kontrol ve tuz stresi uygulanan kallus gruplarının yaş ağırlıklarının kuru ağırlıklarına oranının yüzdesi belirlenmiştir.

3.2.5.4 Kallus gelişim skalası

Her iki pamuk çeşidinde kontrol ve tuz stresi uygulanan kallus grupları 4 hafta sonra renk, yaş ağırlık gibi fizyolojik parametrelerine göre büyüme gelişme skalası oluşturularak lethal konsantrasyon belirlenmiştir.

3.2.6 Biyokimyasal Parametreler

3.2.6.1 Klorofil içeriğinin belirlenmesi

Arnon (1949) yöntemine göre kallusların klorofil a,b ve total klorofil içerikleri belirlenmiştir. İki çeşit için de her bir konsantrasyondaki kalluslardan 0.1 g örnek tartılarak %80'lik aseton çözeltisi ile porselen havanda dövülmüştür. Elde edilen homojenatlar filtre kağıdı ile süzülerek 663, 646 ve 470 nm dalga boyunda spektrofotometrede absorbans ölçümleri yapılmıştır. Klorofil a, klorofil b ve total klorofil içeriği aşağıdaki formüller ile belirlenmiştir. Deneyler her bir konsantrasyon için 4 tekrarlı olarak yapılmıştır.

I. Klorofil a (mg g^{-1}) = $[(12.21 \times A_{663}) - (2.81 \times A_{646})] \times \text{mL aseton/mg yaprak miktarı}$

II. Klorofil b (mg g^{-1}) = $[(20.13 \times A_{646}) - (5.03 \times A_{663})] \times \text{mL aseton/mg yaprak miktarı}$

III. Total Klorofil = Chla + Chlb

IV. Total Karotenoid Miktarı (mg g^{-1}): $1000 \times A_{470} - (2.27 \times \text{Chl a}) - (81.4 \times \text{Chl b}) / 227 \times \text{mL aseton} / \text{mg yaprak miktarı}$

3.2.6.2 Reaktif Oksijen Türlerinin Belirlenmesi

3.2.6.2.1 Lipid peroksidasyonun belirlenmesi

Lipid peroksidasyonu ürünlerinin seviyesi Cakmak and Horst (1991) yöntemine göre Malondialdehit (MDA) miktarı ile belirlenmiştir. MDA miktarını belirlemek için 0.3 g bitki yaprağı 3 mL %0.1 Trikloroasetik asit (TCA) ile porselen havanlarda sıvı azot eklenerek buz üzerinde dövülmüş ve homojenat 4500 rpm de 30 dk +4 derecede santrifüj edilmiştir. Daha sonra süpernatantlar MDA ve Hidrojen peroksit (H_2O_2) analizleri için ayrılmıştır. Pigment materyallerinden kaynaklanabilecek farkı düzeltmek için Tiyoarbitürik asit (TBA) içeren ve TBA içermeyen olmak üzere 2 farklı paralel tüp hazırlanmıştır. İlk tüpte 0.5 mL süpernatant 1.5 mL % 20 TCA (w/v) ile ikinci tüpte ise 0.5 mL süpernatant 1.5 mL %0.5 TBA içeren %20 TCA (w/v) ile karıştırılmıştır. Örnekler 30 dk boyunca su banyosunda kaynatılmış ve ardından buz banyosunda soğutulduktan sonra oda sıcaklığına gelmesi için bekletilmiştir. Örneklerin 532 ve 600 nm dalga boyunda absorbansları spektrofotometrede ölçülmüştür. Deneyler dört tekrarlı olarak yapılmıştır. Sonuçların hesaplanması;

$$E = E'_{532} - E'_{600}$$

$\mu\text{M MDA per 1 g fw} = (Ex2)/7.75$ Formülüne göre yapılmıştır.

3.2.6.2.2 Hidrojen peroksit (H_2O_2) içeriğinin belirlenmesi

Hidrojen peroksit seviyeleri (H_2O_2) Alexieva ve arkadaşlarının yöntemine göre ölçülmüştür. Taze kallus dokuları (0.2 g), % 0.1 (w/v) trikloroasetik asit (TCA) ile homojenize edilmiş ve 12.000 g'de 15 dakika boyunca +4 °C'de santrifüjlenmiştir. Süpernatant (0.05 mL), 0.5 mL 10 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7.0) ve 1 mL 1M potasyum iyodür (KI) üzerine ilave edilmiştir. Son olarak, reaksiyon karışımının absorbansı 390 nm'de ölçülmüştür.

H_2O_2 miktarı, 0.1 ila 1 mM arasında değişen bilinen H_2O_2 konsantrasyonlarından hazırlanan standart bir eğri kullanılarak hesaplandı. Deneyler dört tekrarlı olarak yapılmıştır.

3.2.6.2.3 Prolin miktarının belirlenmesi

Prolin miktarı Bates ve arkadaşlarının kullandığı yöntemle göre belirlenmiştir. 1 g bitki materyali 10 mL, %3 sülfosalisilik asitte çözümüştür. Homojenat filtre kağıdından geçirilerek süzülmüştür. Süzülen filtratın 2 mL'si tüplere eklenip üzerlerine 2 mL asetik asit ve ninhidrin reaktifi eklenmiş ve karışım vortekslenmiştir. Karışımların üstü parafilmle kapatılarak sıcak su banyosunda 1 saat bekledildikten sonra 5 dk soğuk su banyosunda oda sıcaklığına gelmesi beklenmiştir. Daha sonra üzerlerine 2 mL tolüen eklenerek karışım vortekslenmiş ve iki katman oluşturulmuştur. Pembe renkteki reaksiyon ürününü içeren üstteki tolüen tabakası alınarak tolüen körüne karşı 518 nm'de okunmuştur.

3.2.6.3 Antioksidan Enzim Denemeleri

3.2.6.3.1 Bitki ekstraktlarının hazırlanması

İki çeşit için her konsantrasyondan 1 g kallus örneği 500 μL 0.1 M Fenil metil sülfonil florid (PMSF) eklenmiş ve 50 mL 0.1 M K-fosfat (pH 7.8) tamponu ile 0.04 g Polivinil pirolidin (PVP) eklenerek buz üzerinde porselen havanda azot eklenerek dövülmüştür. Homojenatlar santrifüj tüplerine alınarak 12000 g'de 30 dakika boyunca

+4 °C’de derecede santrifüj edilmiş ve enzim analizleri için ependorflara dağıtılmıştır. Ependorflar -20 °C’de derin dondurucuda saklanmıştır.

3.2.6.3.2 Protein Miktarının Belirlenmesi

Bradford (1976) yöntemine göre, enzim analizleri için hazırlanan ekstraktlardan tüplere 300 µL bitki ekstresi, 200 µL ve deiyonize su ve 5 mL 5/1 oranında seyreltilmiş Bradford çözeltisi eklenmiştir. Vorktekslenen tüpler 10 dakika karanlıkta bekletildikten sonra 595 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçümleri alınmıştır.

3.2.6.3.3 Süperoksit Dismutaz Aktivitesinin Belirlenmesi (SOD; E.C. 1.15.1.1)

SOD aktivitesinin belirlenmesi, SOD varlığında ya da yokluğunda formazonların miktarının ölçümü prensibine dayanan Beauchamp and Fridovich (1971) yöntemine göre yapılmıştır.

Deneyde hazırlanan bitki ekstraktları 50, 100, 150 ve 200 µl olacak şekilde küvetlere dağıtılmıştır. Ekstrelerden 50, 100 ve 150 µL konulan küvetlere sırası ile 150, 100 ve 50 µL 0.1 M K-fosfat (pH 7.8) ekstraksiyon tamponundan eklenerek seyreltme yapılmıştır. Daha sonra üzerlerine, içeriği 0.05 M K-fosfat tampon (7.8) 1 mM Nitrotetrazolyum Blue (NTB), 0.1 M L-metiyonin, 0.01M Na₂EDTA, 0.2 M Riboflavin olacak şekilde hazırlanan 3 mL reaksiyon karışımı eklenmiştir. Kör olarak 200 µL ekstraksiyon tamponu ve 3 mL reaksiyon karışımı kullanılmıştır ve karanlıkta saklanmıştır. Hazırlanan örnekler ise floresan lambanın altına alınarak 10 dakika boyunca aydınlatılmıştır ve daha sonrasında tekrar karanlığa alınmıştır. Absorbans değerindeki değişim spektrofotometrede 560 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Hesaplamalar protein miktarının fotoredüksiyon inhibisyonunun % 50’si olarak yapılmıştır.

3.2.6.3.4 Katalaz Aktivitesinin Belirlenmesi (CAT; E.C. 1.11.1.6)

CAT aktivitesi H₂O₂ içeriğinin azalması ölçülerek Bergmeyer (1970) yöntemine göre belirlenmiştir.

Denemede küvetlere sırası ile 1mM EDTA içeren 0.05 M K fosfat tampon (pH 7.0), bitkilerden elde edilen enzim ekstresinden 0.2 mL ve %3 H₂O₂ eklenmiştir. Körde

ise H_2O_2 yerine deiyonize saf su kullanılmıştır. Reaksiyon son olarak eklenen H_2O_2 ile başlatılarak spektrofotometrede 240 nm dalga boyunda absorbans değişimi takip edilmiştir. Hesaplamalar bir ünite CAT 1 dakikada yıkılan $\mu\text{mol } H_2O_2$ miktarı olarak belirlenmiştir ve H_2O_2 molar yok olma katsayısı (40) baz alınarak yapılmıştır.

3.2.6.3.5 Peroksidaz Aktivitesinin Belirlenmesi (POX; E.C. 1.11.1.7)

Herzog and Fahimi (1973) yöntemine göre 3,3'- diaminobenzidin tetrahidrokloridin oksidasyonunun sonucu olan kahverengi-kırmızı oksidasyon ürününün ölçülmesi ile belirlenmiştir.

Denemede; hazırlanan enzim ekstreleri, DAB solüsyonu ve H_2O_2 kullanılmıştır. Reaksiyon karışımında küvetlere sırasıyla DAB solüsyonu, 0.2 mL enzim ekstresi, %0.6 H_2O_2 eklenmiştir. Kördde ise H_2O_2 yerine deiyonize su kullanılmıştır. H_2O_2 eklenmesiyle başlatılan enzim reaksiyonu 465 nm dalga boyunda spektrofotometrede absorbans değeri değişiminin takip edilmesi ile belirlenmiştir. Hesaplamalarda spesifik POX aktivitesi kullanılmıştır.

3.2.6.3.6 Askorbat Peroksidaz Aktivitesinin Belirlenmesi (APX; E.C. 1.11.1.11)

Gonzales et al (1998), yöntemine göre, APX kinetiklerinin ölçümü askorbatın dehidroaskorbata oksidasyonunun belirlenmesi ile yapılmıştır.

Reaksiyon karışımının içeriği sırasıyla 1mM EDTA içeren 0.05 M K fosfat tamponu (pH 7.8), 0.03 M askorbik asit, 0.1 mL bitki ekstresi, %0.03 H_2O_2 olacak şekilde hazırlanmıştır. Reaksiyon H_2O_2 eklenmesi ile başlatılmış ve 290 nm dalga boyunda absorbans değerindeki azalma 1 dakika boyunca takip edilmiştir. Kördde H_2O_2 yerine deiyonize su kullanılarak ölçümler köre karşı okunmuştur. Hesaplamalar için ise askorbatın molar absorbans katsayısı kullanılmıştır ($\epsilon = 2.8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

3.2.6.3.7 Glutatyon Redüktaz Aktivitesinin Belirlenmesi (GR; E.C. 1.6.4.2)

Oksidize glutatyonun NADP(H)'ı indirgemesi kinetiğine bağlı olarak Carlberg and Mannervik (1985) yöntemine göre yapılmıştır.

Yapılan denemede aktivite, 30 °C sıcaklıkta belirlenmiştir. 3 mL'lik küvetlere 0.06 M K- PO_4 tamponu (pH 7.4), 20 mM okside glutatyon 2mM NADP(H) eklenmiştir.

Üzerlerine 0.2 mL bitki enzim ekstresi eklenerek reaksiyon başlatılmıştır. Reaksiyon kinetikleri spektrofotometrede 340 nm dalga boyunda takip yapılarak belirlenmiştir. Ölçümler köre karşı yapılmıştır. Hesaplamalar spesifik GR aktivitesi olarak yapılmıştır.

3.2.6.3.8 DPPH Antioksidan Kapasite Tayini

Antioksidan kapasite tayininde Brand ve arkadaşlarının yöntemi kullanılmıştır. DPPH 0.5 gram kallus 10 mL %80'lik etanolde homojenize hale getirilmiştir. Homojenatın süpernatantından 0.05 ml alınıp üstüne 2,2 difenil-1-pikril-hidrazil (DPPH) çözeltisinden 1.95 ml eklenerek 2 mL'ye tamamlanmıştır. 515 nm'de absorbans azalışı gözlemlenmiştir. Kör olarak metanol kullanılmıştır. Kontrol olarak ise 1.95 mL DPPH çözeltisinin 0.05 Ml su ile 2 mL'ye tamamlanması ile elde edilen çözelti kullanılmıştır. % Scavange miktarları aşağıdaki eşitliğe göre hesaplanmıştır.

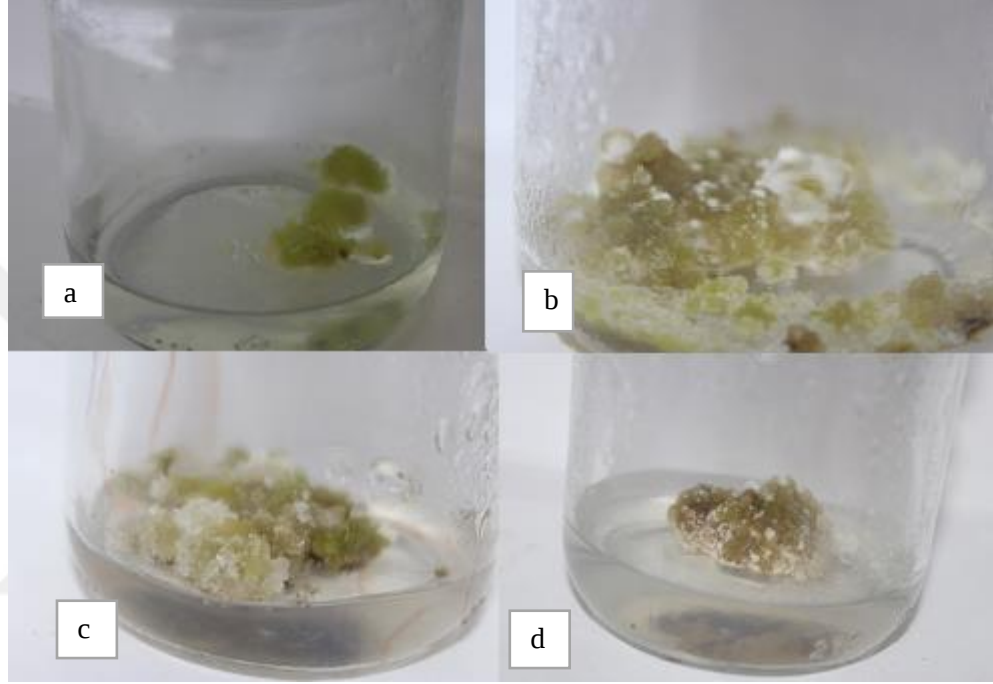
$$\% \text{ Scavenging} = (1 - (\text{Abs}_{(\text{Örnek})} / \text{Abs}_{(\text{Kontrol})})) * 100$$

4. BULGULAR

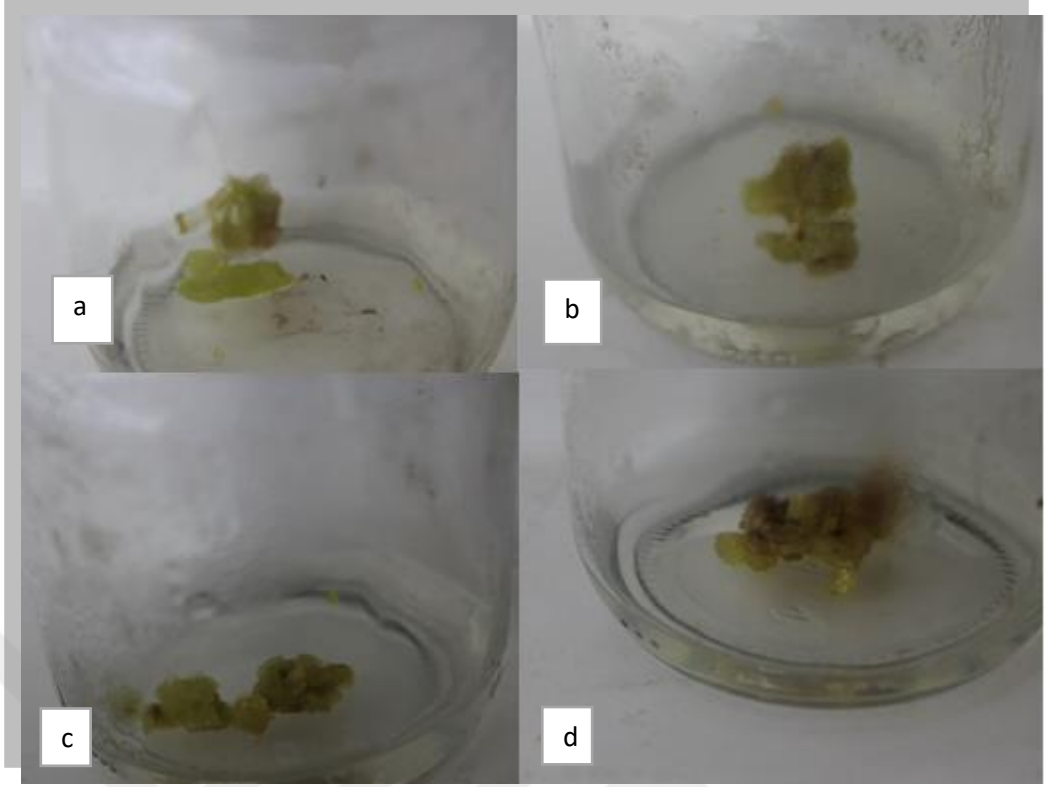
4.1 Morfolojik Gözlem Parametreleri

4.1.1 Kallus Rengi

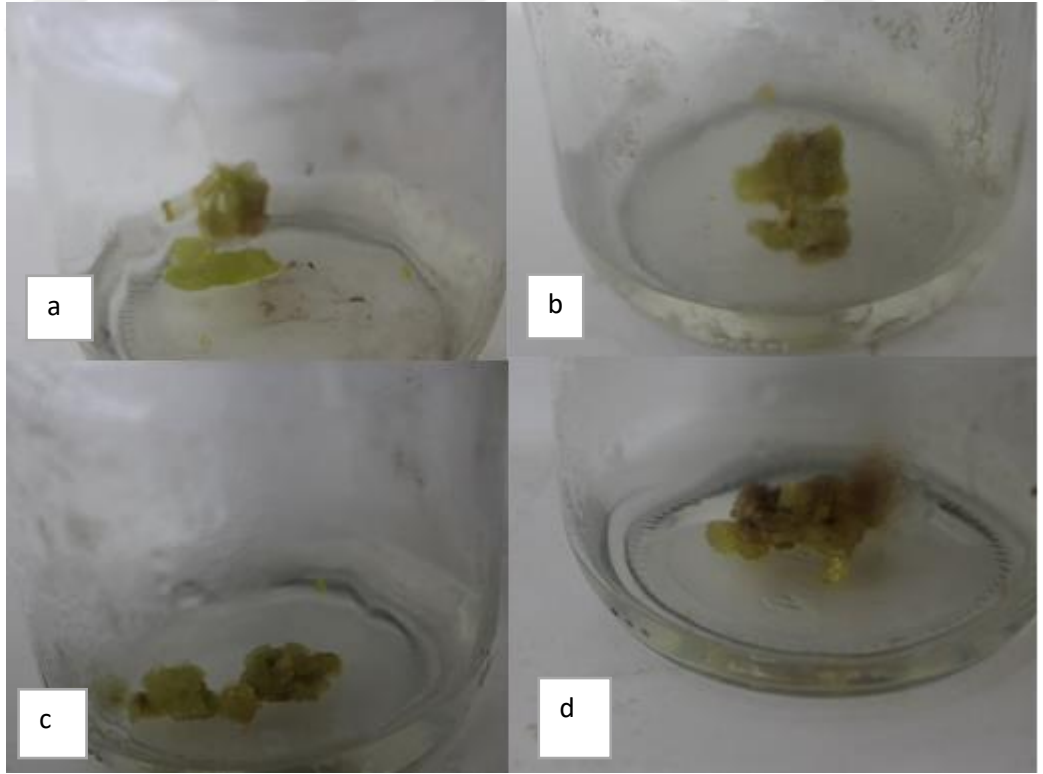
Şekil 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8,'da Carmen ve NM-503 çeşitlerinin artan tuz konsantrasyonuna bağlı olarak 4 hafta içerisindeki renk değişimleri verilmiştir.



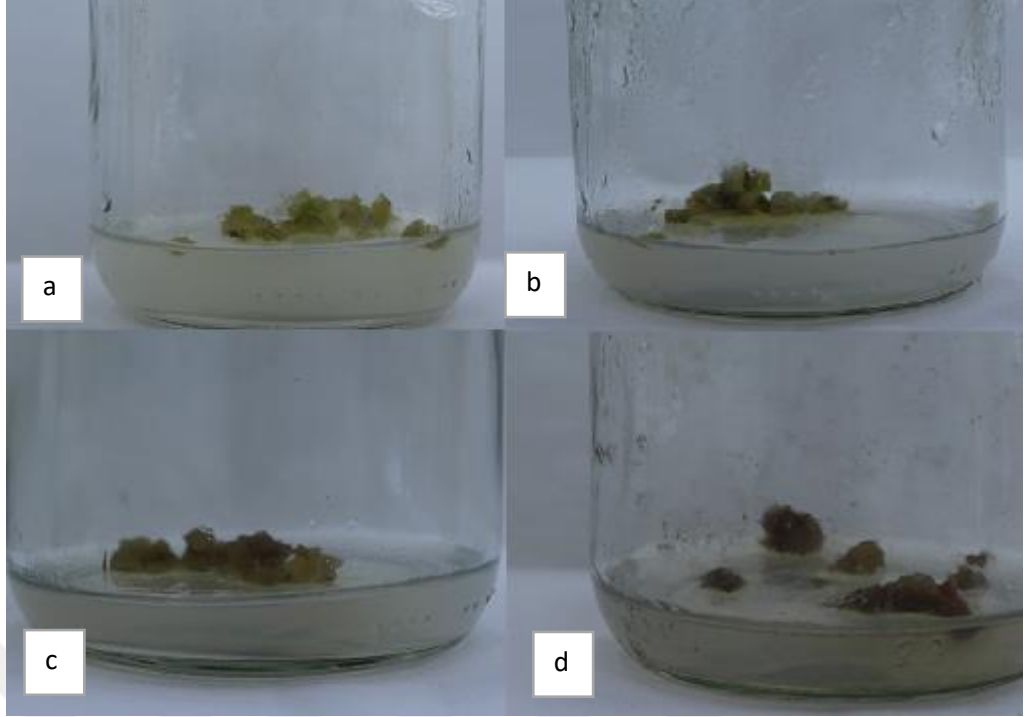
Şekil 4.1: NM-503 çeşidine ait kallusların kontrol grubunun 4 haftalık gözlemde görüntüleri ((a): 1.hafta (b): 2.hafta (c): 3.hafta (d) : 4 hafta)



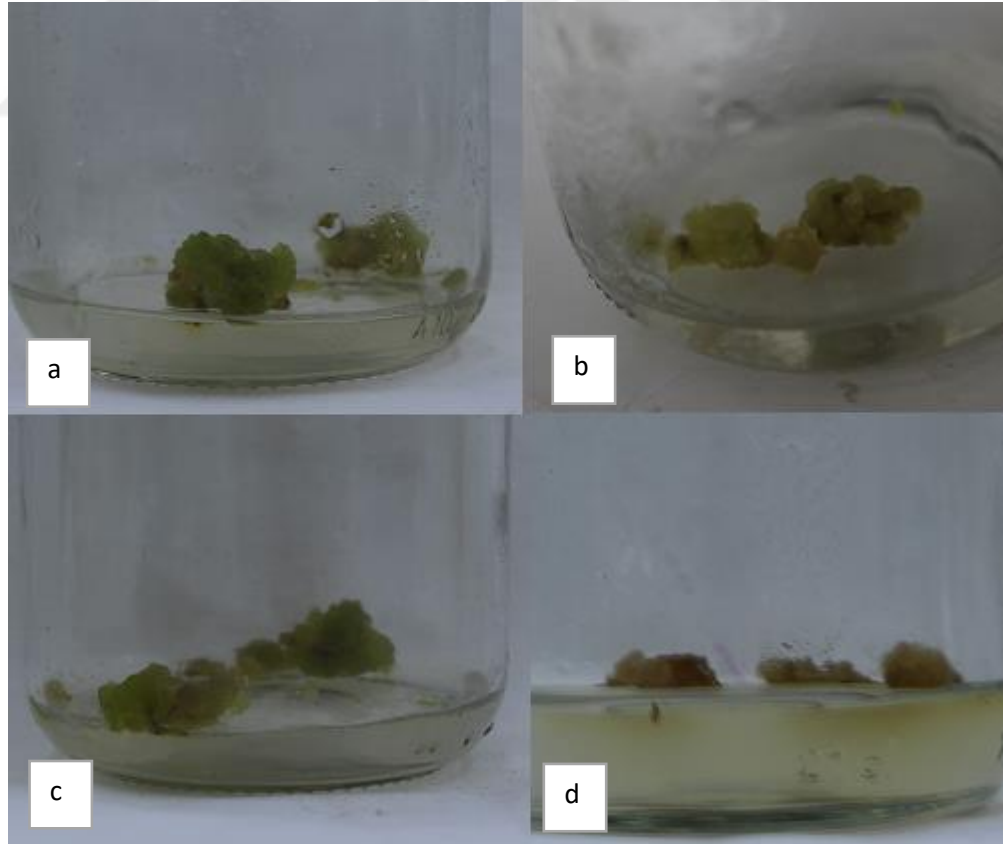
Şekil 4.2: NM-503 çeşidine ait kallusların 100 mM NaCl uygulanan grubun 4 haftalık gözlemden görüntüleri ((a): 1.hafta (b): 2.hafta (c): 3.hafta (d) : 4 hafta)



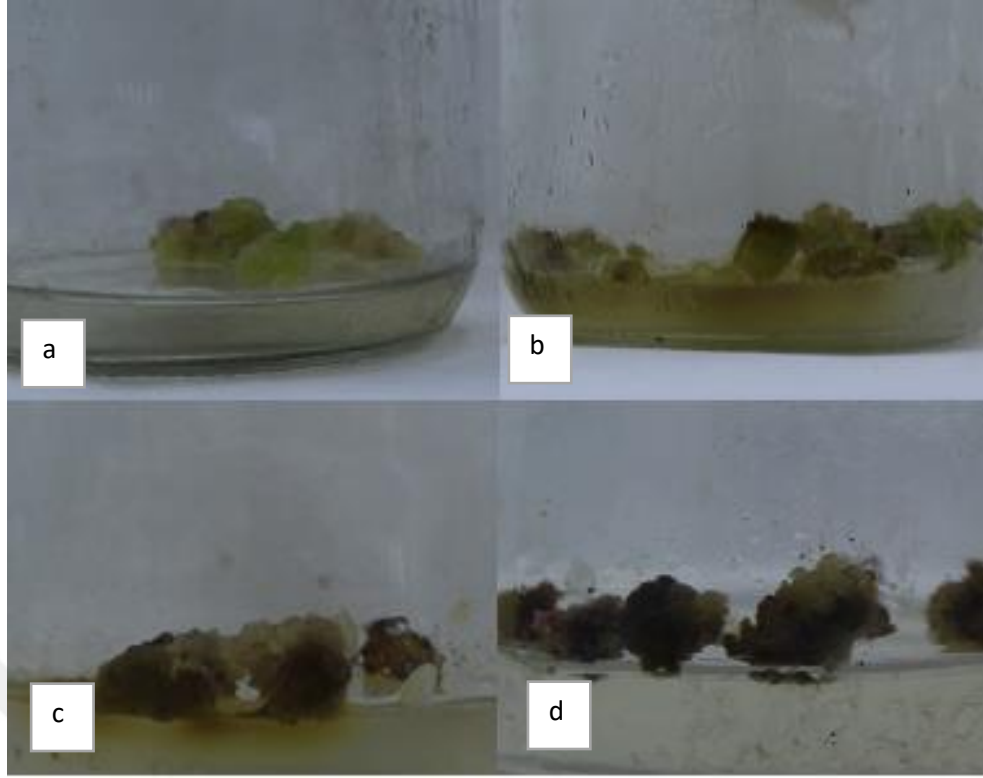
Şekil 4.3: NM-503 çeşidine ait kallusların 200 mM NaCl uygulanan grubun 4 haftalık gözlemden görüntüleri ((a): 1.hafta (b): 2.hafta (c): 3.hafta (d) : 4 hafta)



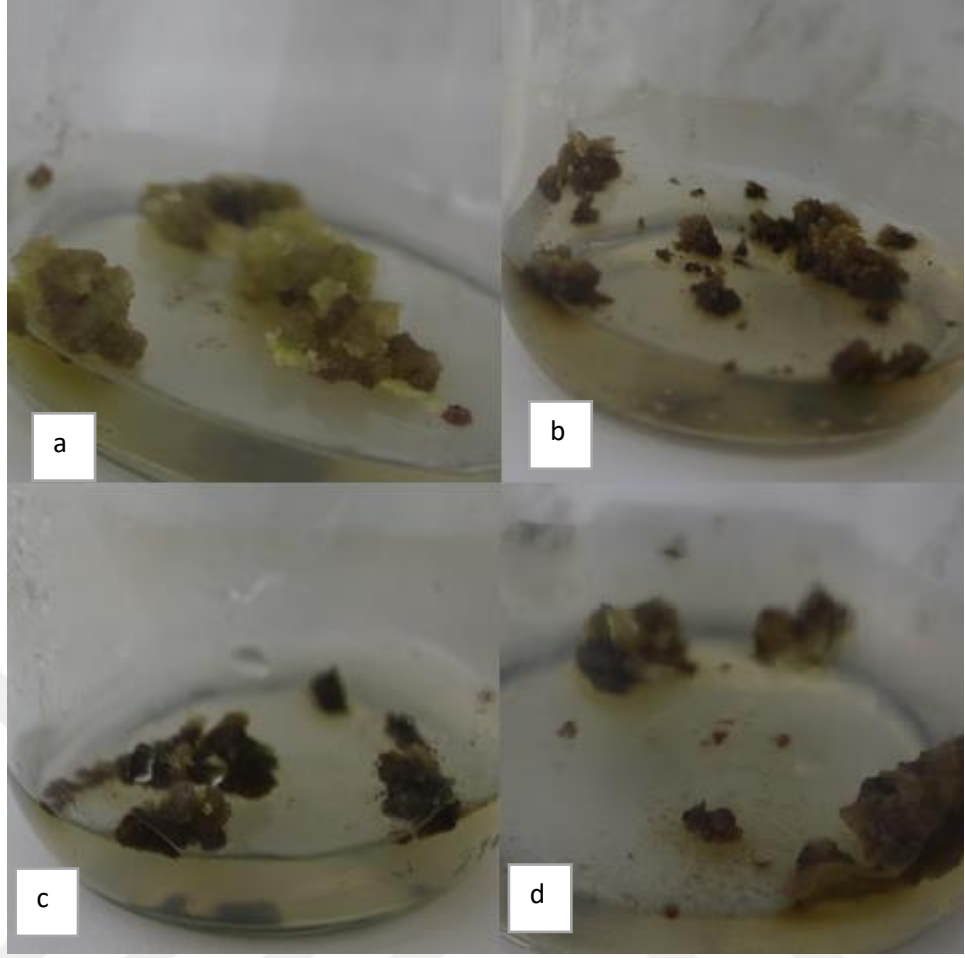
Şekil 4.4: NM-503 çeşidine ait kallusların 400 mM NaCl uygulanan grubun 4 haftalık gözlemden görüntüleri ((a): 1.hafta (b): 2.hafta (c): 3.hafta (d) : 4 hafta)



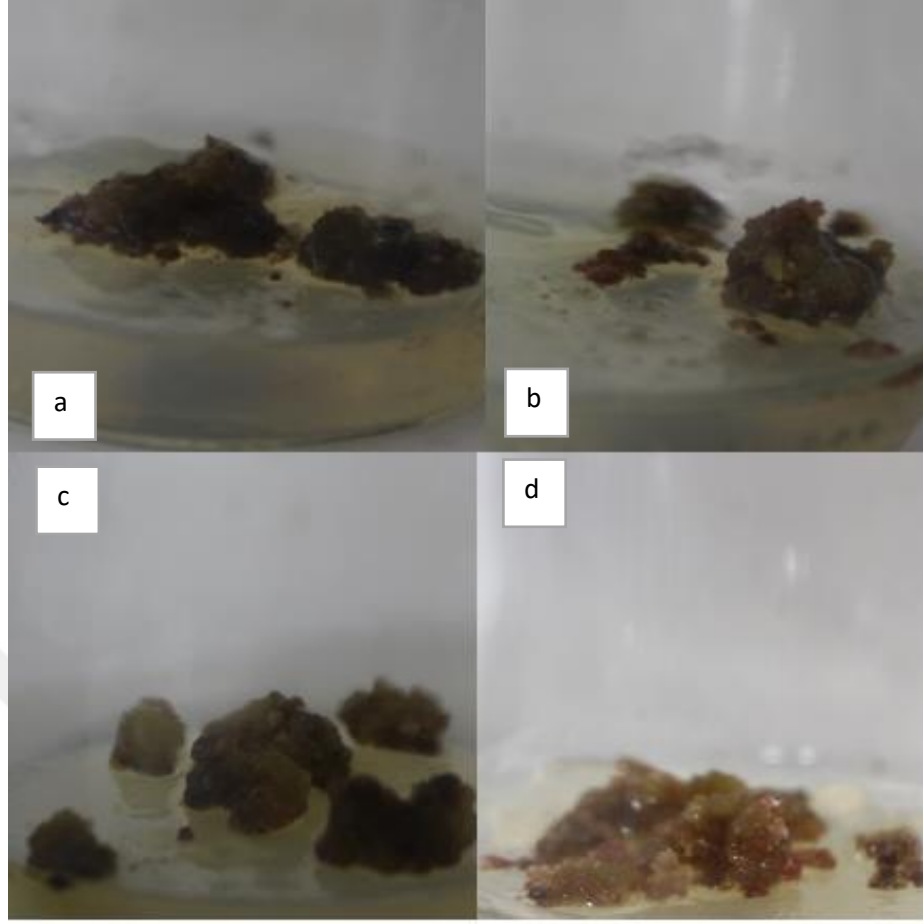
Şekil 4.5: Carmen çeşidine ait kallusların kontrol grubunun 4 haftalık gözlemden görüntüleri ((a): 1.hafta (b): 2.hafta (c): 3.hafta (d) : 4 hafta)



Şekil 4.6: Carmen çeşidine ait kallusların 100 mM NaCl uygulanan grubun 4 haftalık gözlemden görüntüleri ((a): 1.hafta (b): 2.hafta (c): 3.hafta (d) : 4 hafta)

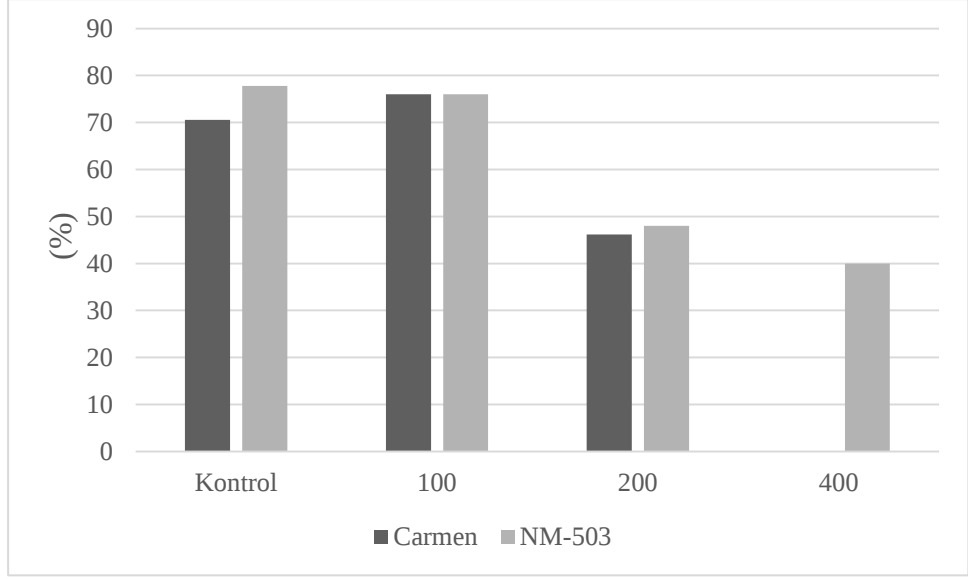


Şekil 4.7: Carmen çeşidine ait kallusların 200 mM NaCl uygulanan grubun 4 haftalık gözlemden görüntüleri ((a): 1.hafta (b): 2.hafta (c): 3.hafta (d) : 4 hafta)



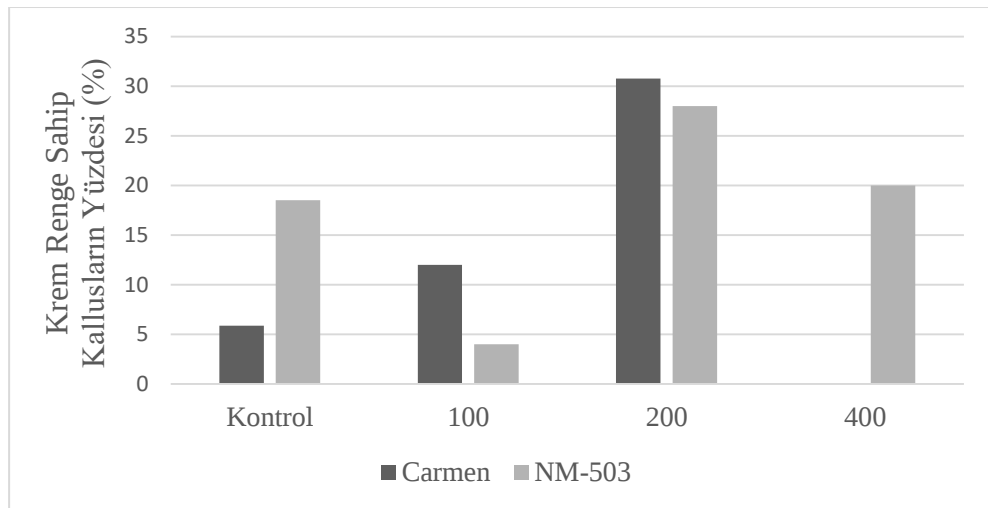
Şekil 4.8: Carmen çeşidine ait kallusların 400 mM NaCl uygulanan grubun 4 haftalık gözlemden görüntüleri ((a): 1.hafta (b): 2.hafta (c): 3.hafta (d) : 4 hafta)

Şekil 4.9’da görüldüğü üzere, yapılan çalışmada tuz stresi uygulanan çeşitlerde Carmen çeşidi için en fazla yeşil renk yüzdesine sahip konsantrasyon % 76 ile 100 mM tuz uygulanan grup iken, NM-503 çeşidi için ise en fazla yeşil renk yüzdesine sahip grup %77.77 ile kontrol grubu olarak gözlemlenmiştir. Her iki çeşit için de kontrol grubu ve 100 mM tuz uygulanan grupların yeşil renge sahip kallusların sayısı birbirlerine yakinken uygulanan tuzun konsantrasyonu arttıkça yeşil renge sahip kallusların yüzdesinde azalma gözlemlenmiştir. En yüksek konsantrasyon olan 400 mM tuz konsantrasyonunun uygulandığı Carmen çeşidinde ise hiç yeşil renge sahip kallus oluşmazken aynı konsantrasyonda NM-503 çeşidinde % 40 miktarda yeşil renge sahip kallus gözlemlenmiştir.



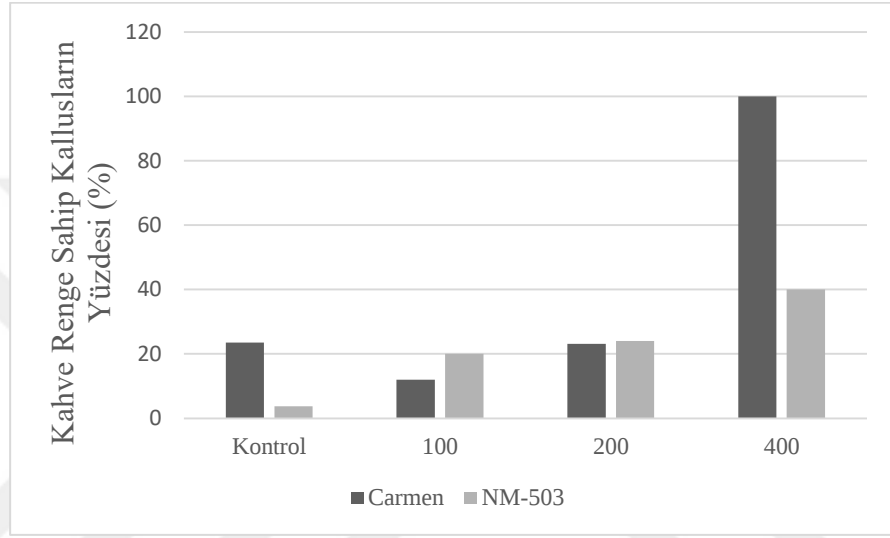
Şekil 4.9: Tuz stresi uygulanan her iki çeşitte değişen konsantrasyonlara bağlı olarak büyüyen kalluslarda yeşil renge sahip kallusların yüzde olarak dağılımı.

Yapılan çalışmada Şekil 4.10'daki verilerde tuz stresi uygulanan çeşitlerin her ikisinde de (Carmen ve NM-503) en fazla krem rengi yüzdesine sahip konsantrasyon, % 30.76 ile 200 mM olarak gözlemlenmiştir. Carmen çeşidi için 400 mM tuz uygulanan grupta hiç krem rengi gözlemlenmezken rengin bu çeşitte yükselen konsantrasyonla beraber yeşilden kreme korelasyonlu bir şekilde arttığı görülmüştür. NM-503 çeşidinde ise en az krem renge sahip kallus grubunun % 4 ile 100 mM tuz uygulanan grup olduğu gözlemlenmiştir.



Şekil 4.10: Tuz stresi uygulanan her iki çeşitte değişen konsantrasyonlara bağlı olarak büyüyen kalluslarda krem renge sahip kallusların yüzde olarak dağılımı.

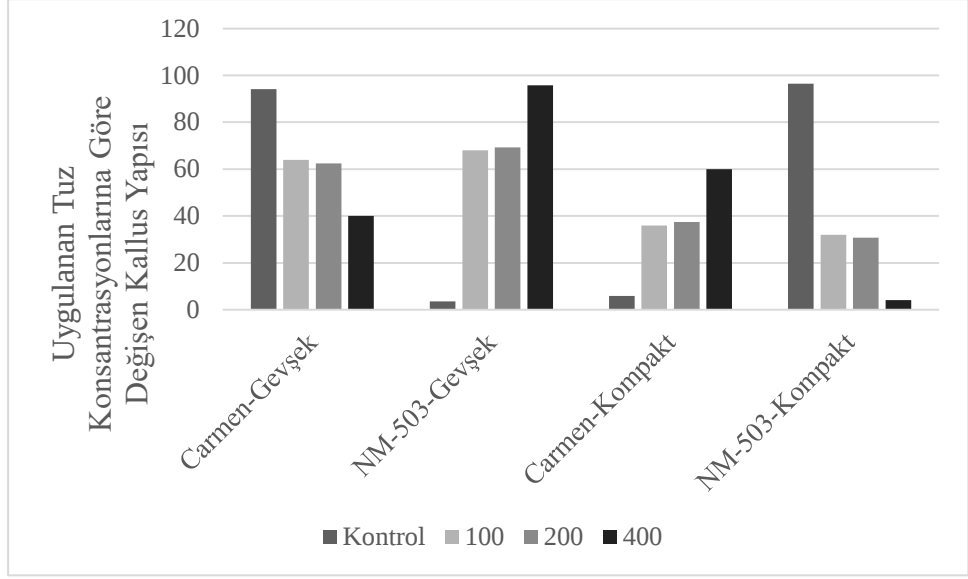
Şekil 4.11'deki verilere göre kahverengine ait kallusların iki çeşitte de grafiklerine baktığımızda ise uygulanan konsantrasyon arttıkça kahverengine sahip kallusların yüzdesinin arttığı görülmüştür. Bu yüzden miktarlarının Carmen çeşidindeki tüm gruplarda NM-503 çeşidine kıyasla çok daha fazla arttığı gözlemlenmiştir. Carmen çeşidinde en düşük miktarda kahverengi kallusa sahip konsantrasyon % 12 ile 100 mM iken, en yüksek kahve rengi kallus grubuna sahip konsantrasyonun ise % 100 ile 400 mM olduğu görülmüştür.



Şekil 4.11: Tuz stresi uygulanan her iki çeşitte değişen konsantrasyonlara bağlı olarak büyüyen kalluslarda kahve rengine sahip kallusların yüzde olarak dağılımı.

4.1.2 Kallus Yapısı

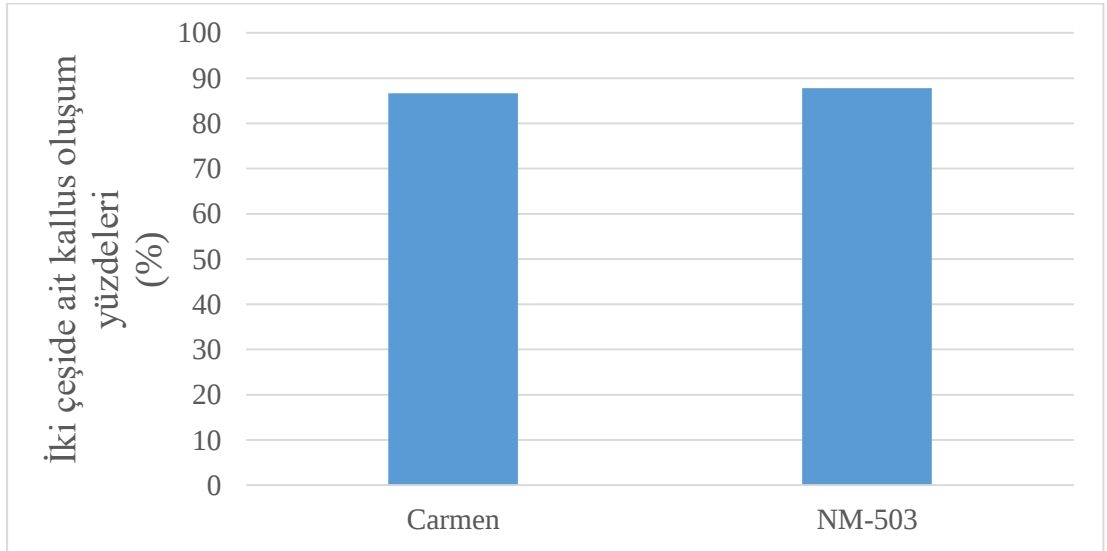
Şekil 4.12'deki verilere göre, Carmen çeşidinde tuz uygulanan konsantrasyon arttıkça değişen kallus yapısına bakıldığında, başlangıçta tuz uygulanmayan kontrol grubunda kallusların yumuşak/gevşek yapıda olduğu fakat artan konsantrasyonla birlikte uygulanan en yüksek konsantrasyon olan 400 mM grubunda kompakt kallusların yüzdesinin % 60 oran ile en yüksek olduğu görülmüştür. NM-503 çeşidinde ise başlangıçtan itibaren kontrol gruplarındaki gevşek/yumuşak kallusların yüzdesinin Carmen çeşidine oranla çok daha düşük, kompakt kallusların yüzdesinin ise daha yüksek olduğu görülmektedir. Uygulanan tuz konsantrasyonu arttıkça bu çeşitte yumuşak kallusların yüzdesinin arttığı, kompakt kallus yüzdesinin ise azaldığı gözlemlenmiştir.



Şekil 4.12: Tuz stresi uygulanan her iki çeşitte değişen konsantrasyonlara bağlı olarak büyüyen kallusların yapısının yüzde olarak dağılımı.

4.1.3 Kallus Oluşum Yüzdesi

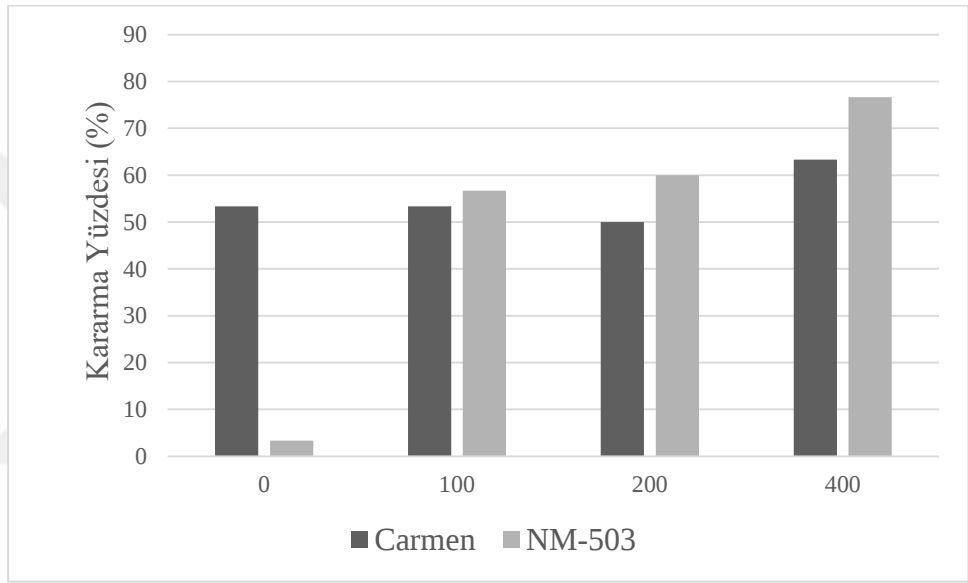
Şekil 4.13'te görüldüğü üzere başlangıçta kallus oluşum yüzdelerinin her iki çeşitte de birbirine yakın aralıktaki olduğu gözlemlenmiştir. Carmen çeşidinin kallus oluşturma yüzdesi % 86.66 iken NM-503 çeşidinin kallus oluşturma yüzdesi % 87.77 olduğu görülmüştür.



Şekil 4.13: Carmen ve NM-503 çeşitlerine ait kallus oluşum yüzdeleri.

4.1.4 Kallusların Kararma Yüzdesi

Şekil 4.14'e göre her iki çeşide ait kararan kallusun yüzdesi tuz uygulanan konsantrasyonun miktarı arttıkça artmıştır. Carmen çeşidinde bu artış kontrol grubu dahil uygulanan tuz konsantrasyonu arttıkça azar azar artarken, NM-503 çeşidinde 100 mM'deki kararma kontrole göre daha fazla ve uygulanan tuzun konsantrasyonu arttıkça Carmen çeşidine göre daha fazla artış gösterdiği gözlemlenmiştir. Kararma yüzdesi Carmen çeşidindeki gruplarda sırasıyla (0, 100, 200, 400) % 53.33, % 53.33, % 50, % 63.33 iken NM-503 çeşidinde ise % 3.33, % 56.66, % 60, % 76.66 olarak görülmüştür.

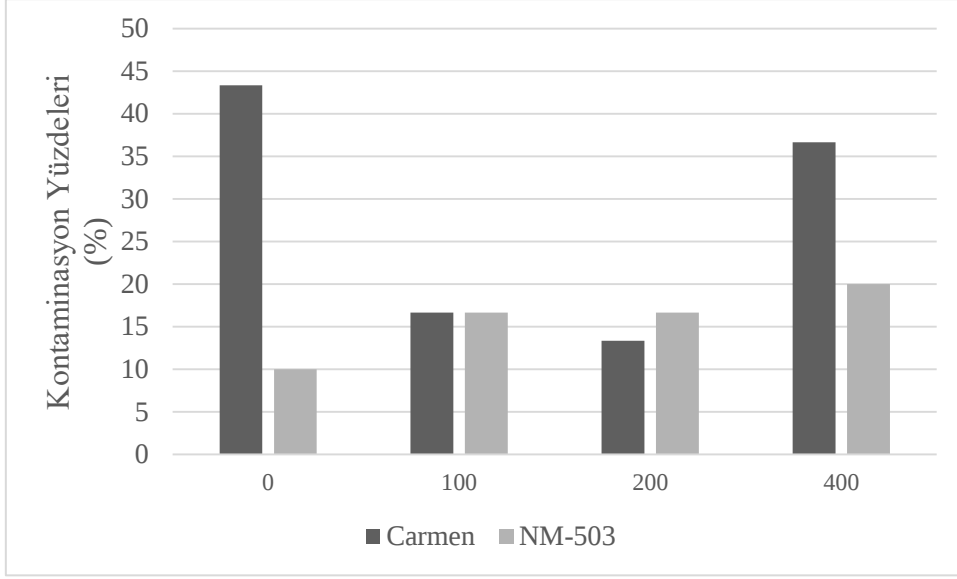


Şekil 4.14: Carmen ve NM-503 çeşitlerine ait kararan kallusların yüzde olarak gösterimi.

4.1.5 Kallusların Kontaminasyon Yüzdeleri

Carmen ve NM-503 çeşitlerinde tuz uygulanan konsantrasyonların kontaminasyona uğrama yüzdeleri Şekil 4.15'te gösterilmektedir. Carmen çeşidinde kontaminasyon yüzdesinin kontrol ve 400 mM tuz uygulanan gruplar ile 100 ve 200 mM tuz uygulanan gruplar arasında yakın olduğu, NM-503 çeşidinde ise tüm konsantrasyonlarda yüzde olarak neredeyse aynı olduğu görülmektedir.

Kontaminasyon yüzdesi Carmen çeşidindeki gruplarda sırasıyla (0, 100, 200, 400) % 43.33, % 16.66, % 13.33, % 36.66 iken NM-503 çeşidinde ise % 10, % 16.66, % 16.66, % 20 olarak görülmüştür.



Şekil 4.15: Tuz stresi uygulanan her iki çeşide ait değişen konsantrasyonlara bağlı olarak büyüyen kalluslarda kontaminasyona uğrayan kallusların yüzde olarak dağılımı.

4.2 Fizyolojik Parametreler

4.2.1 Kallusların Yaş Ağırlıkları

Her tekrürde iki çeşit için de kalluslar başlangıçta kavanoz başına 1 g koyularak toplamda 7 g olarak büyümeye bırakılmıştır. Tuza dayanıklı olarak bilinen Carmen çeşidinde kontrol grubunda ölçülen ortalama yaş kallus ağırlığı toplamda 17.18 g, 100 mM tuz uygulanan grupta biraz artış göstererek 20.64 g olarak ölçülmüştür. Kallus büyümesinin 200 mM tuz uygulanan konsantrasyonda bir önceki konsantrasyon olan 100 mM'ye göre yarı yarıya düşüş göstererek 10.92 g olduğu görülmüş ve en yüksek konsantrasyon olan 400 mM tuz uygulanan grupta 7.39 g olarak ölçülen kalluslarda neredeyse büyüme görülmemiştir (Çizelge 4.2).

Tuza duyarlı olarak bilinen NM-503 çeşidinde ise kontrol grubunda kallus yaş ağırlığı 39.93 g olarak ölçülmüş. Tuz uygulanan ilk konsantrasyon olan 100 mM grubunda yaş kallus ağırlığı 22.85 g olarak belirlenmiştir. 200 mM tuz grubundaki toplam ağırlığın bir önceki gruba göre düştüğü ve en yüksek konsantrasyon olan 400 mM uygulanan grupta neredeyse hiç büyümediği gözlemlenmiştir (Çizelge 4.2).

Carmen çeşidine ait tekrür başına elde edilen toplam kallus ağırlığının iki yönlü varyans analizi Çizelge 4.1'de, tablosu ise Çizelge 4.2.'de gösterilmiştir. Şekil 4.16'da ise artan konsantrasyonda uygulanan tuz stresi sonucunda Carmen çeşidine ait,

Şekil 4.17’de ise NM-503 çeşidine ait tekerrür başına elde edilen toplam yaş kallus ağırlıkları grafik olarak gösterilmiştir. Şekil 4.18’deki grafiğe göre en fazla artış 200 mM, en az gelişim ise 400 mM tuz uygulanan konsantrasyonda görülmüştür. İstatistiksel olarak gruplar arasında arasında anlamlı bir farklılık görülmüştür.

Şekil 4.18’da Carmen ve NM-503 çeşidinin ilk ve son ağırlıklarının birlikte verildiği grafikte, NM-503 çeşidinin kontrol grubunun Carmen çeşidine göre daha fazla büyüme gösterdiği, tuz uygulanan konsantrasyon arttıkça toplam büyümelerin iki çeşitte de gerilediği gözlemlenmiştir.

Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	Önem düzeyi (P)
Çeşit	1	222.9	222.94	32.53	0.000
Konsantrasyon	8	3636.4	454.55	66.32	0.000
Çeşit * Konsantrasyon	8	842.7	105.34	15.37	0.000
Hata	36	246.7	6.85		
Genel	53	4948.8			

Çizelge 4.1: Carmen ve NM-503 pamuk (*Gossypium hirsutum* L.) çeşitlerine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda (0, 100, 200, 400 mM) NaCl uygulanması sonucu tekerrür başına elde edilen toplam yaş kallus ağırlığı (g)

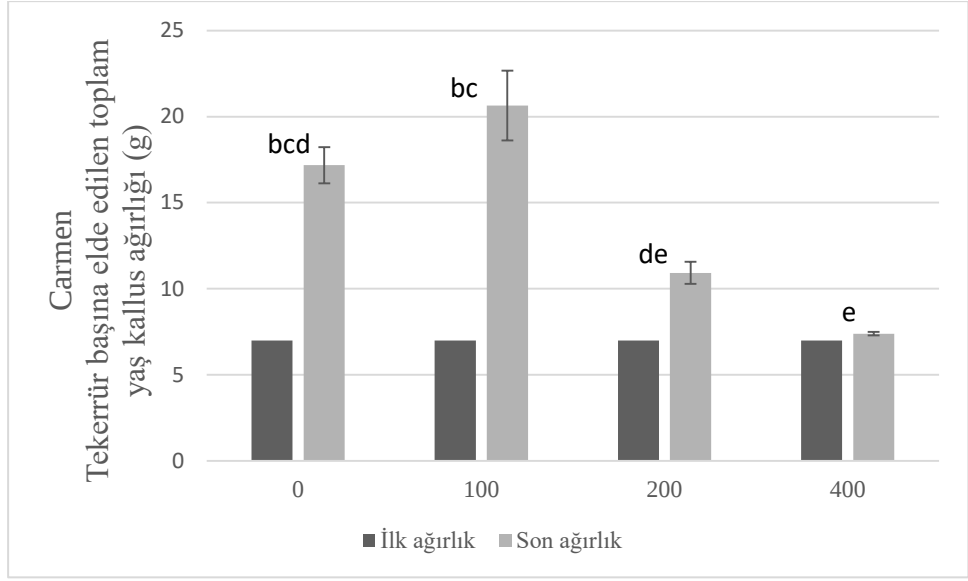
Çeşit	NaCl Konsantrasyonu (mM)	Tekerrür başına elde edilen toplam kallus ağırlığı (g) (Ortalama ± S.H.)
Carmen	0	17.18 ± 1.05 bcd
	100	20.64 ± 2.03 bc
	200	10.92 ± 0.64 de
	400	7.39 ± 0.10 e
NM-503	0	39.93 ± 2.48 a
	100	22.85 ± 2.98 b
	200	11.41 ± 0.33 de
	400	7.45 ± 0.23 e

Çizelge 4.2: Carmen ve NM-503 pamuk (*Gossypium hirsutum* L.) çeşitlerine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda (0, 100, 200, 400 mM) 0 mM) NaCl uygulanması sonucu tekerrür başına elde edilen toplam yaş kallus ağırlığı (g)

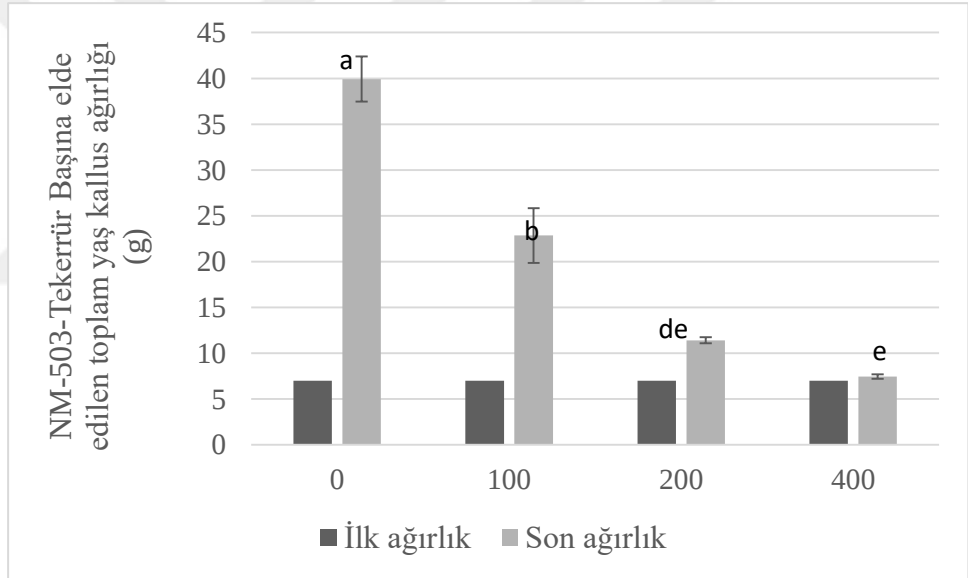
Denemeler üç tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiş ve her bir deneme için içerisinde 1'er gramlık kallus eksplantı bulunan 7 adet kültür kabı kullanılmıştır.

Aynı sütunda yer alan farklı harfler, Tukey Metoduna göre belirgin bir fark ($P \leq 0.05$) oluşturmaktadır.

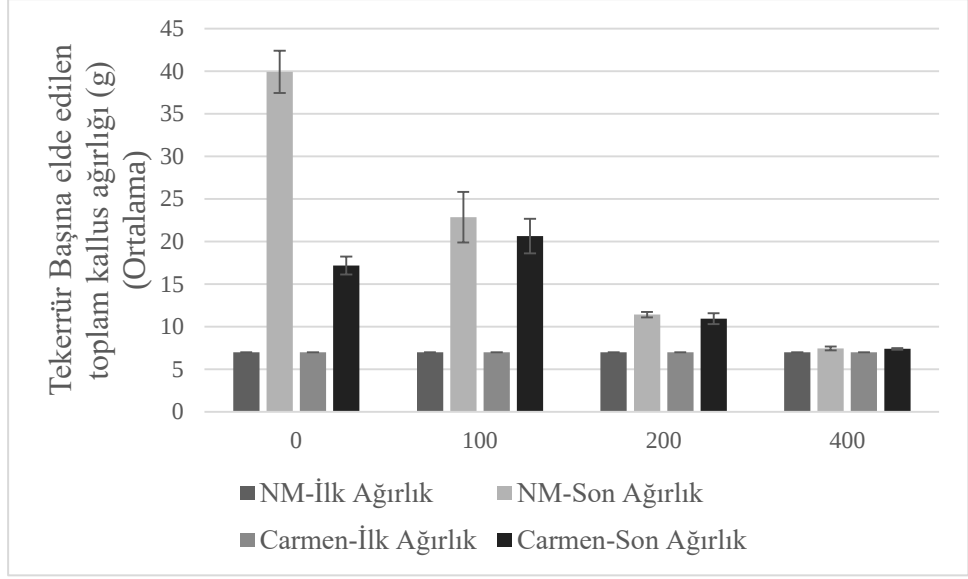
SH: Standart hata.



Şekil 4.16: Carmen çeşidine ait tekerrürlerden elde edilen toplam yaş kallus ağırlığı (g).



Şekil 4.17: NM-503 çeşidine ait tekerrürlerden elde edilen toplam yaş kallus ağırlığı (g).



Şekil 4.18: NM-503&Carmen çeşidine ait tekerrürlerden elde edilen toplam yaş kallus ağırlığı (g).

Aşağıda Çizelge 4.3'te Carmen ve NM-503 pamuk (*Gossypium hirsutum* L.) çeşitlerine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda NaCl uygulanması sonucu kültüre alınan 1 gr kallus başına elde edilen toplam yaş kallus ağırlığı (g)'nın iki yönlü varyans analizi, aşağıda Çizelge 4.4'te ise değerleri gösterilmiştir. Şekil 4.19 ve Şekil 4.20'de ise bu değerler grafik halinde gösterilmiştir.

Carmen çeşidi için 1 gram kallustan elde edilen kallus ağırlığının ortalaması en yüksek 100 mM tuz uygulanan konsantrasyonda gözlemlenmiştir. Şekil 4.11'da görüldüğü üzere kontrol grubu ile 100 mM tuz uygulanan grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon varken 200 mM tuz uygulanan grupta da 400 mM tuz uygulanan grup arasında benzer ve yakın bir korelasyon gözlemlenmiştir. Her tekerrür için kültüre alınan 1 g kallus başına elde edilen ortalama yaş kallus ağırlığı, tuza dayanıklı olarak bilinen Carmen çeşidi için kontrol grubunda 2.45 g, ilk uygulanan 100 mM tuz grubunda 2.95 g olarak ölçülmüştür. Daha sonra 200 mM tuz uygulanan grupta ise bu miktarın yarı yarıya azalarak 1.56 g olduğu ve en yüksek konsantrasyon olan 400 mM tuz uygulanan grupta ise 1.06 g ölçümle büyüme görülmemiştir.

Şekil 4.20'de NM-503 çeşidine ait kültüre alınan 1 g kallus başına elde edilen ortalama kallus ağırlığı grafiğinde ise en fazla artışın kontrol grubunda olduğu, uygulanan tuz konsantrasyonu arttıkça ise ağırlık artışının azaldığı gözlemlenmiştir. Gruplar arasında istatistiki olarak farklılık göstermiştir. Fakat her iki çeşidin de artan tuz

konsantrasyonuna bağılı olarak aynı doz grupları istatistiki olarak aynı gruplarda yer almışlardır

Her tekerrür için kültüre alınan 1 gram kallus başına elde edilen ortalama yaş kallus ağırlığı, tuza duyarlı olarak bilinen NM-503 çeşidi için kontrol grubunda 5.70 g, ilk konsantrasyon olan 100 mM tuz uygulanan grupta 3.27g olarak ölçülmüştür. 200 mM tuz uygulanan grupta yaş ağırlık miktarı 100 mM tuz uygulanan gruba göre yarı yarıya azalarak 1.63 g ölçülürken en yüksek konsantrasyon olan 400 mM tuz grubunda neredeyse hiç büyüme gözlemlenmemiştir.

İki çeşidin yaş ağırlıklarında 100 mM ile 200 mM arasında % 50 düşüş görülmüş ve her iki çeşit için de 400 mM tuz uygulanan grup, büyümenin olmadığı grup olarak gözlemlenmiştir. Tuza dayanıklı olduğu bilinen Carmen çeşidinde kontrol grubuna göre en yüksek konsantrasyon olan 400 mM konsantrasyondaki yaş kallus ağırlıklarında yarı yarıya bir azalma varken, tuza duyarlı olduğu bilinen NM-503 çeşidinde 400 mM tuz uygulanan konsantrasyondaki yaş kallus ağırlıklarında kontrol grubuna göre 5 katı kadar azalma görülmüştür.

Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	Önem düzeyi (P)
Çeşit	1	31.85	31.85	38.29	0.000
Konsantrasyon	8	519.49	64.94	78.06	0.000
Çeşit *	8	120.39	15.05	18.09	0.000
Konsantrasyon					
Hata	360	299.46	0.83		
Genel	377	971.19			

Çizelge 4.3: Carmen ve NM-503 pamuk (*Gossypium hirsutum* L.) çeşitlerine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda (0, 100, 200, 400 mM) NaCl uygulanması sonucu kültüre alınan 1 gr kallus başına elde edilen ortalama kallus ağırlığı varyans analizi (g).

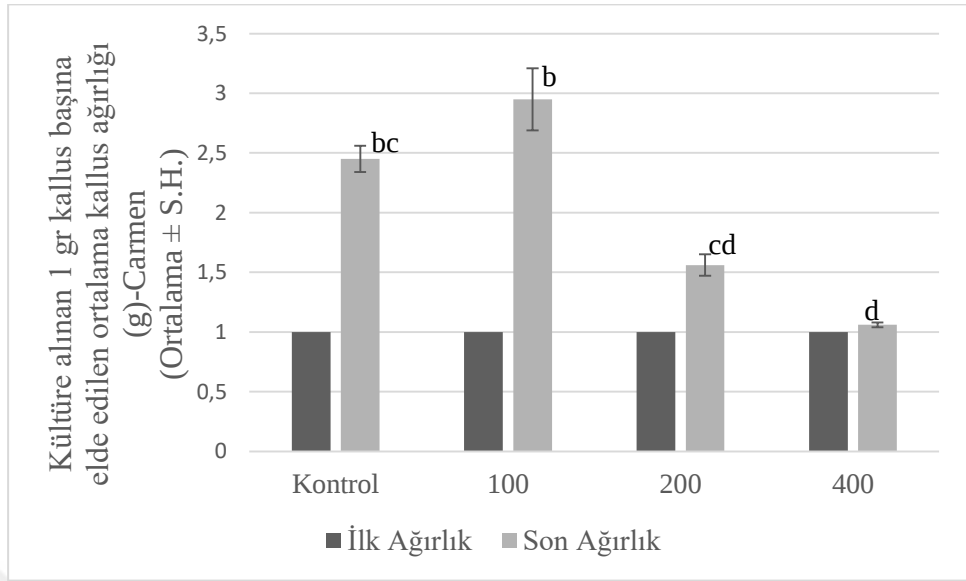
Çeşit	NaCl Konsantrasyonu (mM)	Kültüre alınan 1 gr kallus başına elde edilen ortalama kallus ağırlığı (g) (Ortalama ± S.H.)
Carmen	0	2.45 ± 0.11 bc
	100	2.95 ± 0.25 b
	200	1.56 ± 0.09 cd
	400	1.06 ± 0.02 d
NM-503	0	5.70 ± 0.31 a
	100	3.27 ± 0.33 b
	200	1.63 ± 0.15 cd
	400	1.07 ± 0.02 d

Çizelge 4.4: Carmen ve NM-503 pamuk (*Gossypium hirsutum* L.) çeşitlerine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda NaCl uygulanması sonucu kültüre alınan 1 gr kallus başına elde edilen ortalama kallus ağırlığı (g).

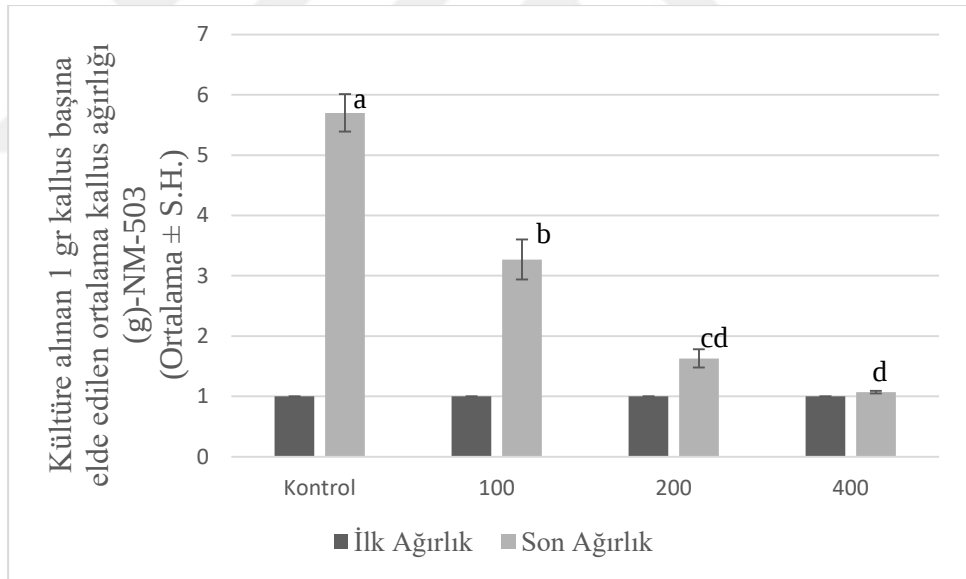
Denemeler üç tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiş ve her bir deneme için içerisinde 1'er gramlık kallus eksplantı bulunan 7 adet kültür kabı kullanılmıştır.

Aynı sütunda yer alan farklı harfler, Tukey Metoduna göre belirgin bir fark ($P \leq 0.05$) oluşturmaktadır.

SH: Standart hata.



Şekil 4.19: Carmen çeşidine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda tuz uygulanması sonucu kültüre alınan 1 gr kallus başına elde edilen ortalama kallus ağırlığı (g).



Şekil 4.20: NM-503 çeşidine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda tuz uygulanması sonucu kültüre alınan 1 gr kallus başına elde edilen ortalama kallus ağırlığı (g).

4.2.2 Kallus Kuru Ağırlıkları

Çizelge 4.5'te iki çeşide ait iki yönlü varyans analizi Çizelge 4.6'de 1 gram kallusun kuru ağırlık miktarlarının ortalaması standart hataları ile birlikte verilmiştir. Bu bilgiler doğrultusunda Şekil 4.21'deki grafik verilerine göre Carmen çeşidinde 1 gram kallus başına elde edilen kuru ağırlık en fazla 200 mM tuz uygulanan, en az ise 100 mM tuz uygulanan grupta gözlemlenmiştir. Kuru ağırlık miktarları için istatistiksel olarak hepsinin arasında anlamlı bir korelasyon gözlemlenmiştir. Tuzluluğa dayanıklı olduğu bilinen Carmen çeşidinde kuru ağırlık miktarı kontrol grubunda 0.1181 gram olarak ölçülmüş ve 100 mM tuz uygulanan konsantrasyondaki kuru ağırlık miktarı, kontrole göre 0.0385 gram ölçülerek azalma gözlemlenmiştir. Diğer konsantrasyonlardaki kuru ağırlık miktarında kontrole göre anlamlı bir azalma görülmemiştir.

Şekil 4.22'de NM-503 çeşidine artan konsantrasyonda uygulanan tuz gruplarına ait 1 gram kallusun kuru ağırlık miktarlarına göre 4 grup arasında birbirine yakın sonuçlar gözlemlenmiştir. İstatistiksel olarak gruplar arasında farklılık görülmüştür.

NM-503 çeşidinde 1 gram yaş kallustan elde edilen kuru ağırlık miktarı kontrol grubunda 0.16 gramken iki çeşit için de konsantrasyona bağlı olarak kuru ağırlıklarında istatistiki olarak farklılık görülmüştür.

Şekil 4.23'te Carmen ve NM-503 çeşitlerine ait 1 gram kallusun kuru ağırlık miktarları birlikte gösterilmiştir. İki çeşidin kontrol grupları ve uygulanan tuz konsantrasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlemlenmezken, kuru ağırlık miktarlarının iki çeşit arasında ise NM-503 çeşidinde daha fazla olduğu gözlemlenmiştir.

Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	Önem düzeyi (P)
Çeşit	1	20.15	20.1506	81.11	0.000
Konsantrasyon	3	75.92	25.3083	101.87	0.000
Çeşit * Konsantrasyon	163	40.49	0.2484	75.00	
Hata	3	23.67	7.8885		0.000
Genel	160	16.83	0.1052		
	167	136.57			

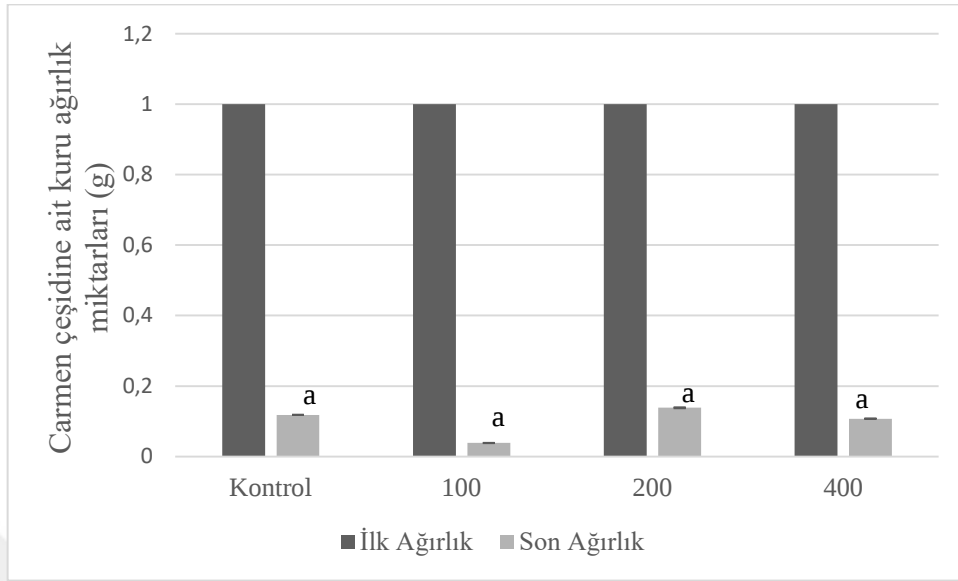
Çizelge 4.5: Carmen ve NM-503 pamuk (*Gossypium hirsutum* L.) çeşitlerine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda (0, 100, 200, 400 mM) NaCl uygulanması sonucu 1 gram kallusun kuru ağırlık miktarlarının iki yönlü varyans analizi.

Çeşit	NaCl Konsantrasyonu (mM)	1 gram kallusun kuru ağırlık miktarı (Ortalama±S.H)
Carmen	0	0.12±0.00032 a
	100	0.039 ± 0.00051 a
	200	0.14 ± 0.00135 a
	400	0.11± 0.00058 a
NM-503	0	0.16 ± 0.00065 a
	100	0.16 ± 0.00131 a
	200	0.16 ± 0.00353 a
	400	0.12 ± 0.00104 a

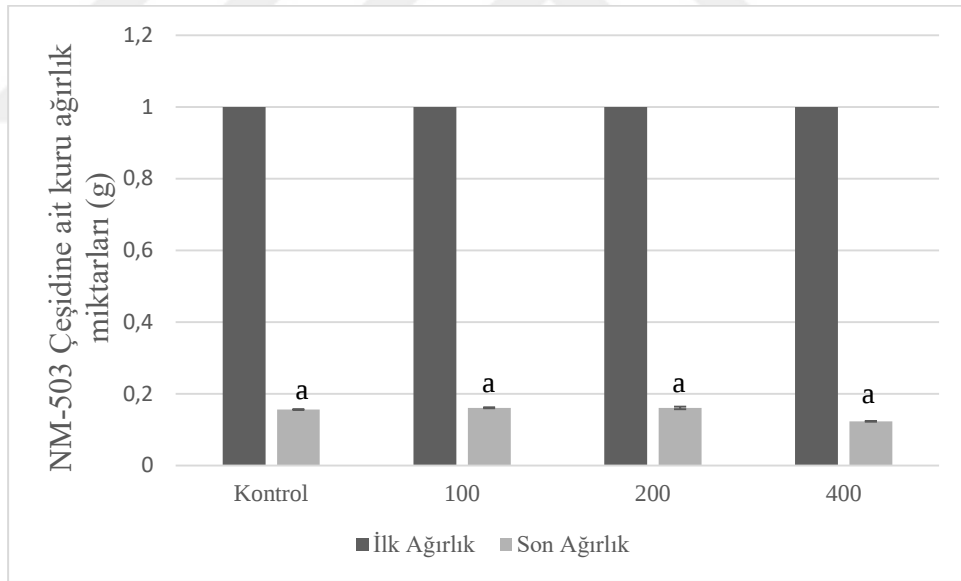
Çizelge 4.6: Carmen ve NM-503 pamuk (*Gossypium hirsutum* L.) çeşitlerine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda (0, 100, 200, 400 mM) NaCl uygulanması sonucu 1 gram kallusun kuru ağırlık miktarları (g).

Aynı sütunda yer alan farklı harfler, Tukey Metoduna göre belirgin bir fark ($P \leq 0.05$) oluşturmaktadır.

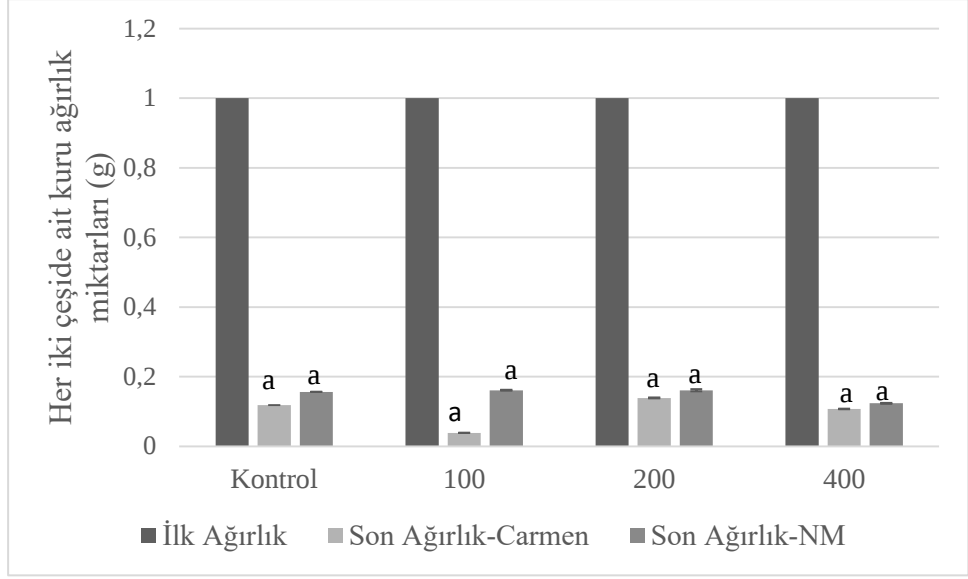
SH: Standart hata.



Şekil 4.21: Carmen çeşidine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda (0, 100, 200 ve 400 mM) tuz uygulanması sonucu analizlenen 1 gram kallusun kuru ağırlık miktarı.



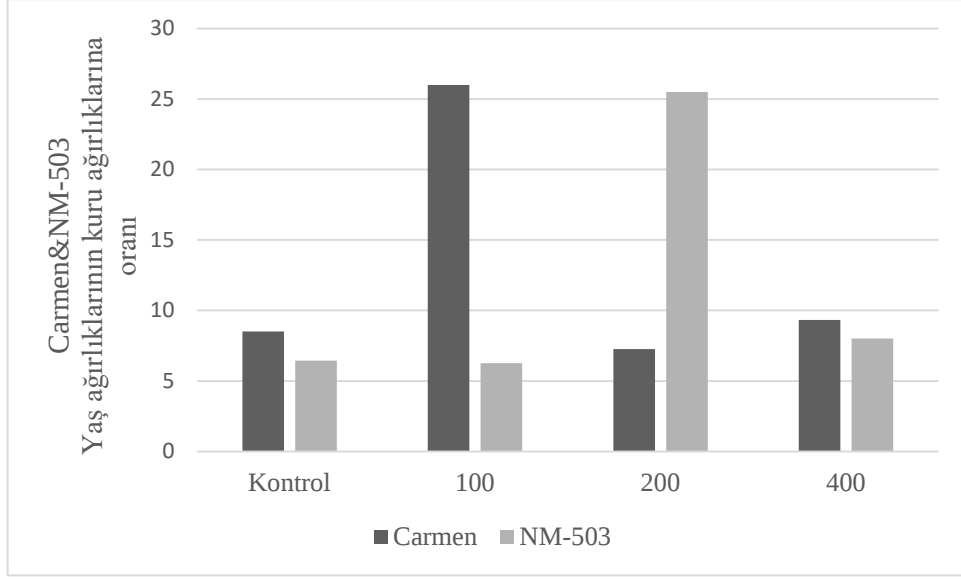
Şekil 4.22: NM-503 çeşidine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda (0, 100, 200 ve 400 mM) tuz uygulanması sonucu analizlenen 1 gram kallusun kuru ağırlık miktarı.



Şekil 4.23: Carmen ve NM-503 pamuk çeşidine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda (0, 100, 200 ve 400 mM) tuz uygulanması sonucu analizlenen 1 gram kallusun kuru ağırlık miktarı.

4.2.3 Kuru Ağırlığın Yaş Ağırlığa Oranı

Şekil 4.24’de çeşitlerin yaş ağırlıklarının kuru ağırlıklarına gram olarak karşılaştırıldığı grafik verilmiştir. İki çeşitin de kontrol ve uygulanan en yüksek tuz grubu olan 400 mM konsantrasyonlarında yaş ağırlıklarının kuru ağırlıklarına oranı birbirine yakın (8.5, 6.44 ve 9.33, 8) çıkmıştır. Carmen çeşidinde 100 mM tuz konsantrasyonu uygulanan grubun yaş ağırlığının kuru ağırlığa oranı, NM-503 çeşidinde 100 mM tuz konsantrasyonu uygulanan grubun yaş ağırlığının kuru ağırlığa oranına göre 4 kat daha fazla olarak hesaplanmıştır. Carmen çeşidinde 200 mM tuz konsantrasyonu uygulanan grubun yaş ağırlığının kuru ağırlığa oranı ise, NM-503 çeşidinde 200 mM tuz konsantrasyonu uygulanan grubun yaş ağırlığının kuru ağırlığa oranına göre 3.5 kat daha az olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.24:Çeşitlerin kuru ağırlıklarının ortalamalarının tekerrür başına ortalama yaş ağırlıkları ile karşılaştırılması.

4.3 Biyokimyasal Parametreler

4.3.1 Protein Tayini

Çizelge 4.7’de Carmen ve NM-503 pamuk (*Gossypium hirsutum* L.) çeşitlerine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda NaCl uygulanması sonucu analizlenen kallusların proteinlerin mg/mL cinsinden değerlerinin iki yönlü varyans analizi, Çizelge 4.8’de ise onlara ait değerler görülmektedir.

Çizelge 4.7’e göre iki çeşide ait kontrol ve artan konsantrasyonlarda tuz uygulanan gruplarda protein miktarlarının birbirinden farklı olmadığı ve istatistiksel olarak aralarında anlamlı bir fark olmadığı gözlemlenmiştir.

Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	Önem düzeyi (P)
Çeşit	1	0.000001	0.000001	0.03	0.863
Konsantrasyon	3	0.000044	0.000015	0.35	0.793
Çeşit * Konsantrasyon	3	0.000299	0.000100	2.35	0.097
Hata	24	0.001016	0.000042		
Genel	31	0.001359			

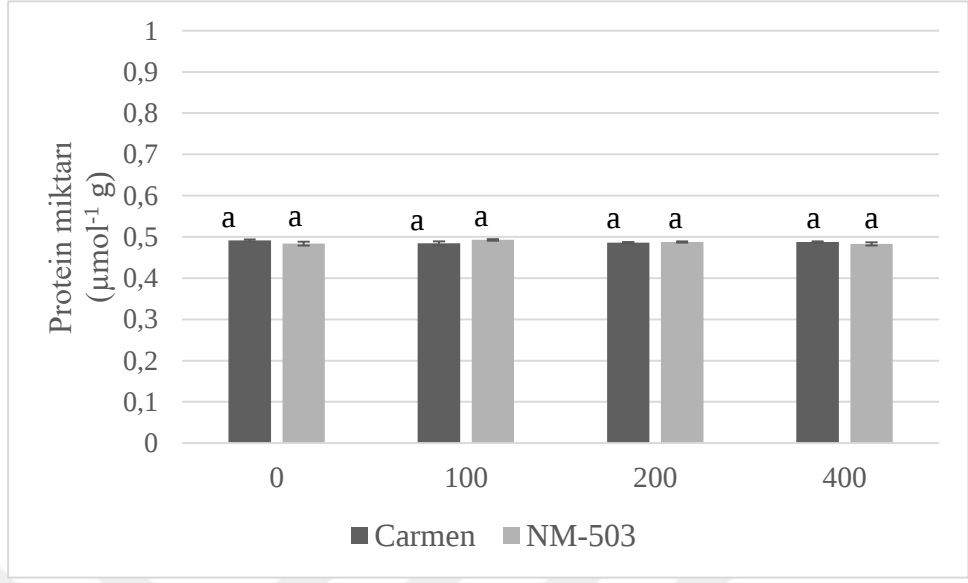
Çizelge 4.7: Carmen ve NM-503 pamuk (*Gossypium hirsutum* L.) çeşitlerine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda (0, 100, 200 ve 400 mM) NaCl uygulanması sonucu analizlenen kallusların proteinlerim μmol^{-1} g cinsinden değerlerinin iki yönlü varyasyon analizi.

Çeşit	NaCl Konsantrasyonu (mM)	Protein Miktarı (μmol^{-1} g) Ortalama $\pm$ SH
Carmen	0	0.49 $\pm$ 0.003 a
	100	0.48 $\pm$ 0.005 a
	200	0.49 $\pm$ 0.002 a
	400	0.49 $\pm$ 0.002 a
NM-503	0	0.49 $\pm$ 0.0048 a
	100	0.49 $\pm$ 0.00205 a
	200	0.49 $\pm$ 0.0018 a
	400	0.48 $\pm$ 0.004 a

Çizelge 4.8: Carmen ve NM-503 pamuk (*Gossypium hirsutum* L.) çeşitlerine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda (0, 100, 200 ve 400 mM) NaCl uygulanması sonucu analizlenen kallusların proteinlerim μmol^{-1} g cinsinden miktarları.

Aynı sütunda yer alan farklı harfler, Tukey Metoduna göre belirgin bir fark ($P \leq 0.05$) oluşturmaktadır.

SH: Standart hata.



Şekil 4.25: İki çeşide ait, $\mu\text{mol}^{-1}\text{ g}$ cinsinden çözülebilir protein miktarı.

4.3.2 Klorofil Miktarı

4.3.2.1 Klorofil a miktarı

Çizelge 4.9’da Carmen ve NM-503 pamuk (*Gossypium hirsutum* L.) çeşitlerine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda (0, 100, 200, 400 mM) NaCl uygulanması sonucu elde edilen klorofil a miktarı ile ilgili iki yönlü varyans analiz sonuçları, Çizelge 4.10’da ise bu miktarların verileri verilmiştir. Şekil 4.26’da ise bu verilerle elde edilen grafiğe göre, Carmen çeşidinde, en fazla klorofil a miktarının kontrol grubunda en az ise 400 mM tuz uygulanan grupta olduğu görülmüştür. Kontrol grubunda ve 100 mM ile 200 mM tuz uygulanan gruplarda sonuçlar birbirine yakın gözlemlenmiştir. Carmen çeşidine ait kontrol grubunun klorofil a miktarı 0.02258 mg/g olarak belirlenmiştir. 100 mM ve 200 mM tuz uygulanan grupta kontrol grubuna göre çok fazla azalma görülmezken 400 mM tuz uygulanan grupta kontrole göre neredeyse yarı yarıya azalma görülmüştür.

NM-503 çeşidinde ise kontrol grubunun klorofil a miktarı 0.06178 mg/g olarak bulunmuş ve artan tuz konsantrasyonu ile birlikte 400 mM konsantrasyonda 6 kat azalma gözlemlenmiştir. NM-503 çeşidinde ise en fazla klorofil a miktarı kontrol grubunda, en az ise 100 mM tuz uygulanan grupta olduğu görülmüştür. Miktarların, kontrol grubundan sonra tuz uygulanan ilk konsantrasyon olan 100 mM itibaren kayda

değer bir şekilde düştüğü ve daha sonra artan konsantrasyonlardaki (200 ve 400 mM) klorofil a miktarlarının birbirlerine yakın olduğu gözlemlenmiştir. İstatistiksel olarak tüm gruplar arasında anlamlı bir korelasyon olduğu görülmüştür. İki çeşit kıyaslandığında NM-503 çeşidinde kontrol grubu ve tuz uygulanan gruplar arasında 400 mM' da klorofil a miktarının Carmen'e göre daha yüksek olduğu ve istatistiksel olarak aralarında anlamlı bir farklılık olduğu görülürken, iki çeşide ait 100 ve 200 mM tuz uygulanan gruplardaki klorofil a miktarı birbirine yakın ve istatistiksel olarak da aralarında anlamlı bir farklılık görülmüştür.

Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	Önem düzeyi (P)
Çeşit	1	0.001057	0.001057	50.86	0.000
Konsantrasyon	3	0.004495	0.001498	72.12	0.000
Çeşit *	3	0.002203	0.000734	35.35	0.000
Konsantrasyon					
Hata	24	0.000499	0.000021		
Genel	31	0.008253			

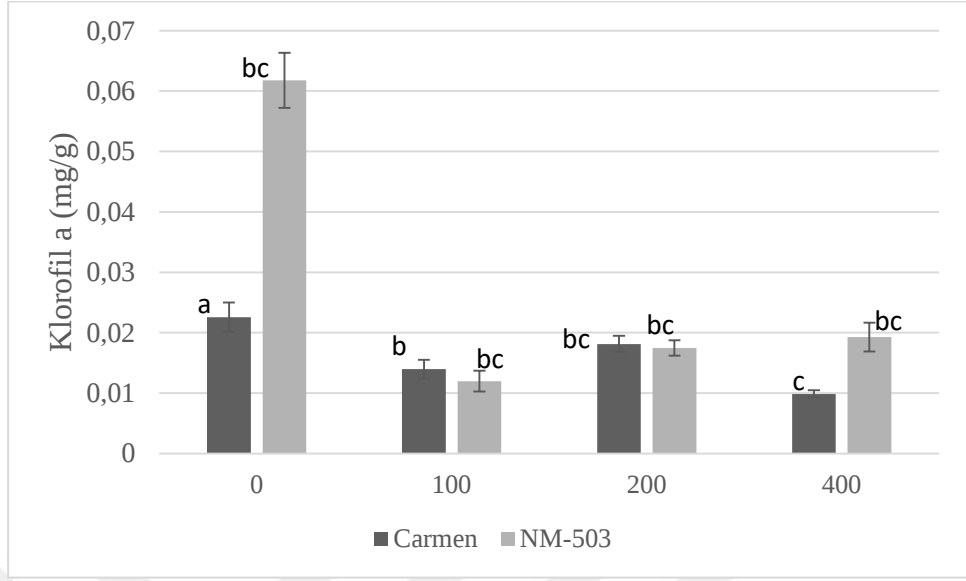
Çizelge 4.9: Carmen ve NM-503 pamuk (*Gossypium hirsutum* L.) çeşitlerine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda (0, 100, 200, 400 mM) NaCl uygulanması sonucu elde edilen klorofil a miktarı ile ilgili iki yönlü varyans analiz sonuçları.

	NaCl Konsantrasyonu (mM)	0.1 gram kallusta bulunan klorofil a miktarı (mg/g) Ortalama±SH
Carmen	0	0.023±0.002 a
	100	0.014±0.002 b
	200	0.018±0.001 bc
	400	0.01±0.0006 c
NM-503	0	0.06±0.005 bc
	100	0.012±0.002 bc
	200	0.017±0.001 bc
	400	0.019±0.002 bc

Çizelge 4.10: Carmen ve NM-503 pamuk (*Gossypium hirsutum* L.) çeşitlerine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda (0, 100, 200 ve 400 mM) NaCl uygulanması sonucu analizlenen 0.1 gram kallusun mg/g cinsinden klorofil a miktarı.

Aynı sütunda yer alan farklı harfler, Tukey Metoduna göre belirgin bir fark ($P \leq 0.05$) oluşturmaktadır.

SH: Standart hata.



Şekil 4.26: Carmen ve NM-503 çeşitlerine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda (0, 100, 200 ve 400 mM) tuz uygulanması sonucu analizlenen 0.1 gram kallusun mg/g cinsinden klorofil a miktarı.

4.3.2.2 Klorofil b Miktarı

Çizelge 4.11’de, Carmen ve NM-503 pamuk (*Gossypium hirsutum* L.) çeşitlerine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda (0, 100, 200, 400 mM) NaCl uygulanması sonucu elde edilen klorofil b miktarı ile ilgili iki yönlü varyans analiz sonuçları, çizelge 4.12’de ise elde edilen bu veriler verilmiştir. Bu veriler doğrultusunda elde edilen grafik Şekil 4.27’e göre Carmen çeşidinde en fazla klorofil b miktarı kontrol grubunda görülmüştür. Tuz uygulanan ilk konsantrasyon olan 100 mM tuz uygulanan kallus grubunda önemli bir düşüş yaşandığı, 200 mM tuz uygulanan gruptaki kallusların klorofil b miktarının 100 mM tuz uygulanan gruptaki kallusların klorofil b miktarıyla neredeyse aynı olduğu ve 400 mM tuz uygulanan gruptaki kallusların klorofil b miktarının tekrar artarak kontrole yaklaştığı gözlemlenmiştir.

Carmen çeşidinde, uygulanan tuz konsantrasyonu arttıkça azalan klorofil b miktarının kontrol grubunda 0.03043 mg/g ile en yüksek miktarda olduğu görülmüştür. 400 mM tuz uygulanan gruptaki klorofil b miktarında başlangıçtaki klorofil b miktarına göre yaklaşık 3 kat azalmıştır. NM-503 çeşidinde ise klorofil b miktarı kontrol grubunda 0.1 mg/g olarak belirlenirken uygulanan tuz konsantrasyonu arttıkça 400 mM’a kadar

azalma görülmüştür. 200 mM tuz konsantrasyonundan sonra klorofil b miktarı 6 kat artarak 0.0903 mg/g olarak gözlemlenmiştir.

Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	Önem düzeyi (P)
Çeşit	1	0.011910	0.011910	5.92	0.023
Konsantrasyon	3	0.015305	0.005102	2.54	0.081
Çeşit * Konsantrasyon	3	0.009915	0.003305	1.64	0.206
Hata	24	0.048272	0.002011		
Genel	31	0.085401			

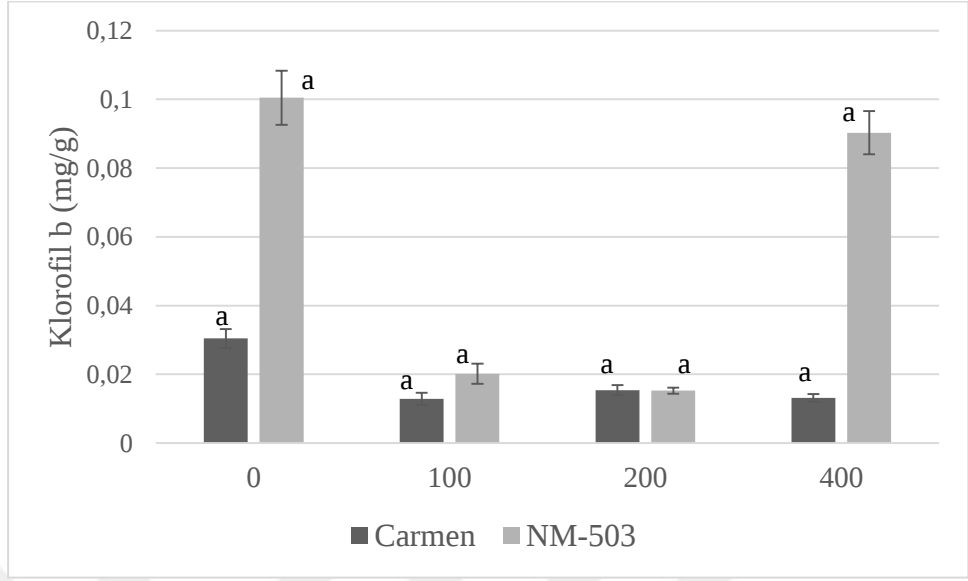
Çizelge 4.11: Carmen ve NM-503 pamuk (*Gossypium hirsutum* L.) çeşitlerine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda (0, 100, 200, 400 mM) NaCl uygulanması sonucu elde edilen klorofil b miktarı ile ilgili iki yönlü varyans analiz sonuçları.

Çeşit	NaCl Konsantrasyonu (mM)	0.1 gram kallusta bulunan klorofil b miktarı (mg/g) Ortalama $\pm$ SH
Carmen	0	0.03043 $\pm$ 0.00279 a
	100	0.01288 $\pm$ 0.00181a
	200	0.01542 $\pm$ 0.00149a
	400	0.01313 $\pm$ 0.00110a
NM-503	0	0.10046 $\pm$ 0.00787 a
	100	0.02018 $\pm$ 0.00297 a
	200	0.015267 $\pm$ 0.000888 a
	400	0.0903 $\pm$ 0.0627 a

Çizelge 4.12: Carmen ve NM-503 pamuk (*Gossypium hirsutum* L.) çeşitlerine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda (0, 100, 200, 400 mM) NaCl uygulanması sonucu elde edilen klorofil b miktarları ve standart hataları.

Aynı sütunda yer alan farklı harfler, Tukey Metoduna göre belirgin bir fark ($P \leq 0.05$) oluşturmaktadır.

SH: Standart hata.



Şekil 4.27: Carmen ve NM-503 pamuk (*Gossypium hirsutum* L.) çeşitlerine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda (0, 100, 200 ve 400 mM) NaCl uygulanması sonucu analizlenen 0.1 gram kallusun mg/g cinsinden klorofil b miktarı.

4.3.2.3 Total Klorofil Miktarı

Çizelge 4.13’de Carmen ve NM-503 çeşitlerine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda (0, 100, 200, 400 mM) NaCl uygulanması sonucu elde edilen total klorofil miktarları ile ilgili iki yönlü varyans analiz sonuçları ile total klorofil miktarları ile alakalı veriler ise Çizelge 4.14’te verilmiştir.

Şekil 4.28’deki verilere göre Carmen çeşidindeki total klorofil miktarı en yüksek kontrol grubundayken en düşük 400 mM tuz uygulanan gruptadır. Carmen ve NM-503 çeşitlerinin 100 ve 200 mM grupları ve NM-503 çeşidinin 400 mM konsantrasyonları arasında istatistiksel olarak farklılık görülmemiştir.

Carmen çeşidi için kontrol grubunda 0.051 mg/g olarak belirlenen total klorofil miktarları, uygulanan ilk tuz konsantrasyonu olan 100 mM ile 0.024 mg/g’a düşmüştür. 200 mM tuz uygulaması ile total klorofil miktarı 0.032 mg/g’a yükselmiş fakat en yüksek olan 400 mM tuz uygulamasıyla en düşük total klorofil miktarına ulaştığı ve kontrole göre yarı yarıya azaldığı gözlemlenmiştir.

NM-503 çeşidinde ise kontrol grubunun 0.16 mg/g ile en yüksek total klorofil miktarına sahip olduğu, uygulanan ilk konsantrasyon olan 100 mM tuz ile 6 kat azalarak

0.025 mg/g olduğu görülmüştür. Ardından uygulanan 200 mM tuz uygulaması ile 0.037 mg/g klorofil miktarına yükseldiği 400 mM tuz uygulamasıyla 0.041 total klorofil miktarının tuz konsantrasyonları arttıkça arttığı fakat en yüksek tuz konsantrasyonunun kontrol grubuna göre yaklaşık 4 kat daha düşük olduğu gözlemlenmiştir.

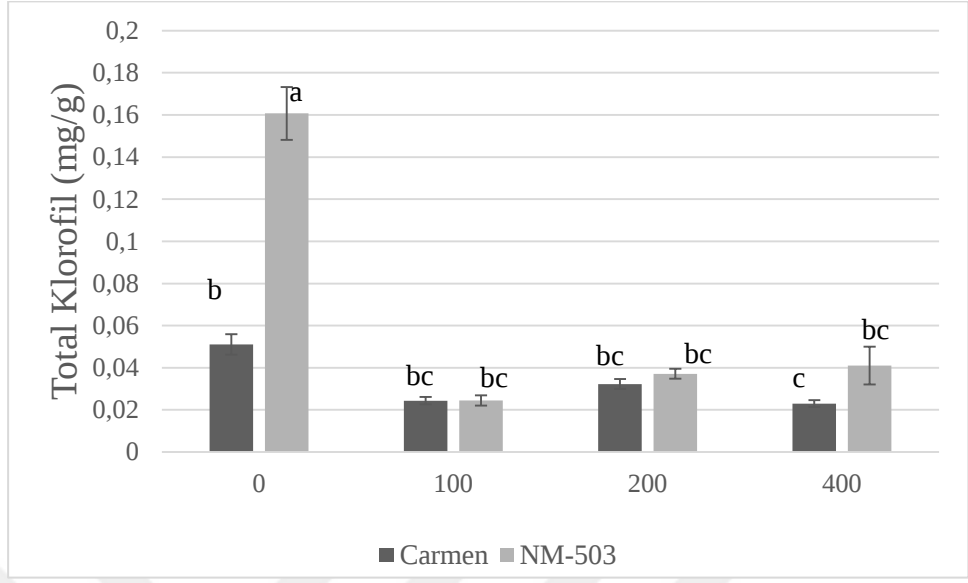
Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	Önem düzeyi (P)
Çeşit	1	0.008790	0.008790	62.52	0.000
Konsantrasyon	3	0.034663	0.011554	82.18	0.000
Çeşit * Konsantrasyon	3	0.015930	0.005310	37.77	0.000
Hata	24	0.003374	0.000141		
Genel	31	0.062757			

Çizelge 4.13: Carmen ve NM-503 çeşitlerine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda (0, 100, 200, 400 mM) NaCl uygulanması sonucu elde edilen total klorofil miktarları ile ilgili iki yönlü varyans analiz sonuçları.

Çeşit	NaCl Konsantrasyonu (mM)	Total klorofil miktarı (mg/g) Ortalama $\pm$ SH
Carmen	0	0.051 $\pm$ 0.005 b
	100	0.024 $\pm$ 0.002 bc
	200	0.032 $\pm$ 0.002 bc
	400	0.023 $\pm$ 0.002 c
NM-503	0	0.16 $\pm$ 0.01 a
	100	0.024 $\pm$ 0.003 bc
	200	0.037 $\pm$ 0.002 bc
	400	0.041 $\pm$ 0.009 bc

Çizelge 4.14: Carmen ve NM-503 çeşitlerine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda (0, 100, 200, 400 mM) NaCl uygulanması sonucu elde edilen total klorofil miktarları ve standart hataları.

Aynı sütunda yer alan farklı harfler, Tukey Metoduna göre belirgin bir fark ($P \leq 0.05$) oluşturmaktadır. SH: Standart hata.



Şekil 4.28: Carmen ve NM-503 pamuk (*Gossypium hirsutum* L.) çeşitlerine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda (0, 100, 200, 400 mM) NaCl uygulanması sonucu elde edilen total klorofil grafiği.

4.3.2.4 Total Karotenoid Miktarı

Çizelge 4.15'te Carmen ve NM-503 pamuk (*Gossypium hirsutum* L.) çeşitlerine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda (0, 100, 200 ve 400 mM) NaCl uygulanması sonucu analizlenen 0.1 gram kallusun mg/g cinsinden total karotenoid miktarının iki yönlü varyans analizi ve Çizelge 4.16'da ise total karotenoid analizlerinden elde edilen veriler verilmiştir. Bu verilerle Şekil 4.29'da elde edilen grafikte Carmen çeşidinde total karotenoid miktarının en fazla olduğu grup kontrol grubu, en az olduğu grup ise 400 mM tuz uygulanan grup olduğu gözlemlenmiş ve aralarında istatistiksel olarak farklılık gözlemlenmiştir. NM-503 çeşidinde ise en yüksek total karotenoid miktarı kontrol grubunda, en düşük miktar ise 100 mM tuz uygulanan grupta gözlemlenmiştir. Kontrol grubu ile tuz uygulanan diğer 3 grup arasında istatistiksel olarak farklılık gözlemlenirken, 100 mM tuz uygulanan grup ile 400 mM tuz uygulanan grup arasında istatistiksel ve miktar olarak bir farklılık gözlemlenmemiştir.

Total karotenoid miktarının Carmen çeşidi için kontrol grubunda 0.019 mg/g ile en yüksek olduğu tuz uygulamasıyla birlikte uygulanan tuz konsantrasyonu arttıkça total karotenoid miktarının da azaldığı en düşük total karotenoid miktarının 0.011 mg/g ile

400 mM tuz uygulanan konsantrasyonda olduğu ve kontrole göre yaklaşık 4 kat azaldığı görülmüştür. NM-503 çeşidinde ise 0.041 mg/g ile yine en yüksek konsantrasyonun kontrol grubunda olduğu ve ilk uygulanan uygulanan tuz konsantrasyonu olan 100 mM tuz konsantrasyonu ile 3 kat azalarak 0.012 mg/g olduğu, artan tuz konsantrasyonu uygulaması ile 0.019 mg/g'a az miktarda yükselmiştir. Uygulanan en yüksek konsantrasyon olan 400 mM tuz uygulamasında tekrar 0.014 mg/g'a düştüğü görülmüştür.

İki çeşidin total karotenoid miktarları kıyaslandığında Carmen çeşidinde artan tuz konsantrasyonu ile azalan total karotenoid miktarının NM-503 çeşidindeki azalmaya göre daha az miktarda olduğu ve Carmen'in 200 mM konsantrasyonundaki total karotenoid miktarının NM-503 çeşidindeki 400 mM tuz uygulanan gruptaki total karotenoid miktarına eş olduğu görülmektedir.

İki çeşit arasında, kontrol grupları arasında NM-503 çeşidinin daha fazla total karotenoid miktarına sahip olduğu ve istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğu görülmüştür. 100 mM tuz uygulanan grupta Carmen çeşidine ait total karotenoid miktarının NM-503 çeşidine ait total karotenoid miktarından daha fazla olduğu gözlemlenmiştir. 200 mM ve 400 mM tuz uygulanan gruplarda ise NM-503 çeşidine ait total karotenoid miktarlarının Carmen çeşidine ait total karotenoid miktarlarına göre daha fazla olduğu gözlemlenirken bu gruplar aralarında istatistiksel olarak farklılık görülmemiştir.

Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	Önem düzeyi (P)
Çeşit	1	0.000431	0.000431	46.01	0.000
Konsantrasyon	3	0.001613	0.000538	57.34	0.000
Çeşit * Konsantrasyon	3	0.000677	0.000226	24.07	0.000
Hata	24	0.000225	0.000009		
Genel	31	0.002946			

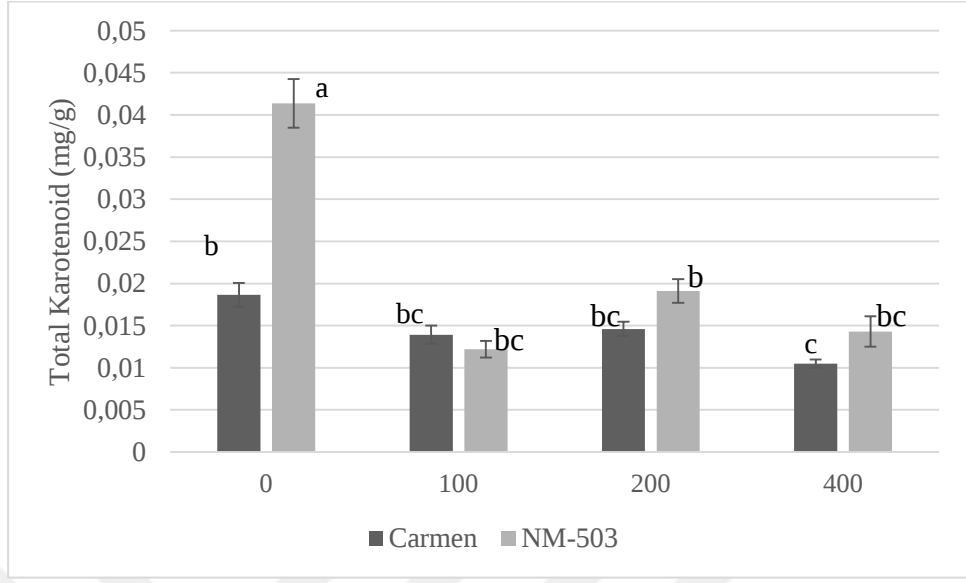
Çizelge 4.15: Carmen ve NM-503 pamuk (*Gossypium hirsutum* L.) çeşitlerine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda (0, 100, 200 ve 400 mM) NaCl uygulanması sonucu analizlenen 0.1 gram kallusun mg/g cinsinden total karotenoid miktarlarının varyans analizi.

Çeşit	NaCl Konsantrasyonu (mM)	Total karotenoid miktarı (mg/g)
		Ortalama±SH
Carmen	0	0.019±0.001 b
	100	0.014±0.001 bc
	200	0.015±0.0009 bc
	400	0.011±0.0005 c
NM-503	0	0.041±0.003 a
	100	0.012±0.00100 bc
	200	0.019±0.0010 b
	400	0.014±0.002 bc

Çizelge 4.16: Carmen ve NM-503 pamuk (*Gossypium hirsutum* L.) çeşitlerine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda (0, 100, 200 ve 400 mM) NaCl uygulanması sonucu analizlenen 0.1 gram kallusun mg/g cinsinden total karotenoid miktarları ve standart hataları.

Aynı sütunda yer alan farklı harfler, Tukey Metoduna göre belirgin bir fark ($P \leq 0.05$) oluşturmaktadır.

SH: Standart hata.



Şekil 4.29: Carmen ve NM-503 çeşitlerine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda (0, 100, 200 ve 400 mM) NaCl uygulanması sonucu analizlenen 0.1 gram kallusun mg/g cinsinden total karotenoid miktarı.

4.3.3 Hidrojen Peroksit (H₂O₂) Miktarı

Çizelge 4.17’de Carmen ve NM-503 pamuk (*Gossypium hirsutum* L.) çeşitlerine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda (0, 100, 200, 400 mM) NaCl uygulanması sonucu elde edilen hidrojen peroksit miktarı ile ilgili iki yönlü varyans analiz sonuçları ve Çizelge 4.18’de ise hidrojen peroksit analizinden elde edilen veriler verilmiştir. Bu verilerden elde edilen grafiğin verileri Şekil 4.30’daki bilgilere göre Carmen çeşidinde en yüksek hidrojen peroksit miktarı 5.9 mikromol/gram ile kontrol grubunda görülmüş ve uygulanan tuz konsantrasyonu arttıkça hidrojen peroksit miktarı azalarak en düşük miktar 400 mM tuz konsantrasyonu uygulanan grupta 2.19 mikromol/gram olduğu görülmüştür. Kontrol grubuna göre tuz uygulanan diğer grupların arasında istatistiksel olarak bir farklılık gözlemlenmezken kontrol grubunda gözlemlenmiştir.

NM-503 çeşidinde ise kontrol grubuna göre, tuz uygulanan konsantrasyonu arttıkça kalluslardaki hidrojen peroksit miktarı artmıştır. İstatistiksel ve miktar olarak ise 100 mM tuz uygulanan grup ile 200 mM tuz uygulanan grup arasında fark görülmezken bu gruplara göre diğerleri arasında fark gözlemlenmiştir.

Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	Önem düzeyi (P)
Çeşit	1	89.626	89.6261	422.15	0.000
Konsantrasyon	3	5.857	1.9523	9.20	0.000
Çeşit * Konsantrasyon	3	29.858	9.9526	46.88	0.000
Hata	24	5.095	0.2123		
Genel	31	130.436			

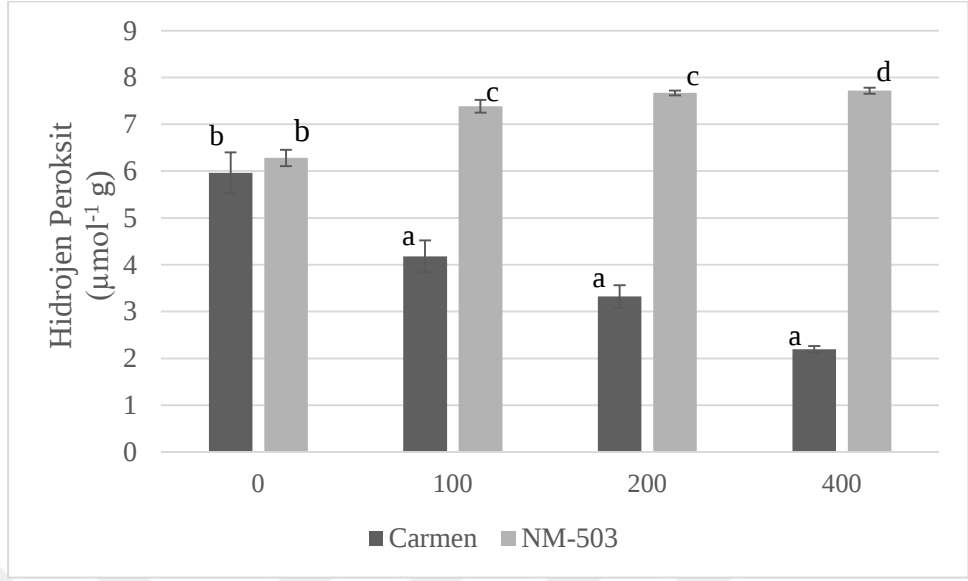
Çizelge 4.17: Carmen ve NM-503 pamuk (*Gossypium hirsutum* L.) çeşitlerine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda (0, 100, 200, 400 mM) NaCl uygulanması sonucu elde edilen hidrojen peroksit miktarı ile ilgili iki yönlü varyans analiz sonuçları.

Çeşit	NaCl Konsantrasyonu (mM)	Hidrojen peroksit miktarı ($\mu\text{mol}^{-1} \text{g}$) Ortalama $\pm$ SH
Carmen	0	5.9 $\pm$ 0.4 b
	100	4.2 $\pm$ 0.3 a
	200	3.3 $\pm$ 0.2 a
	400	2.2 $\pm$ 0.068 a
NM-503	0	6.3 $\pm$ 0.2 b
	100	7.4 $\pm$ 0.14 c
	200	7.7 $\pm$ 0.05 c
	400	7.7 $\pm$ 0.07 d

Çizelge 4.18: Carmen ve NM-503 pamuk (*Gossypium hirsutum* L.) çeşitlerine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda (0, 100, 200 ve 400 mM) NaCl uygulanması sonucu analizlenen hidrojen peroksitin mikromol/mol cinsinden miktarı ve standart hataları.

Aynı sütunda yer alan farklı harfler, Tukey Metoduna göre belirgin bir fark ($P \leq 0.05$) oluşturmaktadır.

SH: Standart hata.



Şekil 4.30: Carmen ve NM-503 pamuk (*Gossypium hirsutum* L.) çeşitlerine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda (0, 100, 200 ve 400 mM) NaCl uygulanması sonucu analizlenen hidrojen peroksitin mikromol-1 g cinsinden miktarlarının grafikte standart hatalarının gösterimi.

4.3.4 Malondialdehit (MDA) Miktarı

Çizelge 4.19’da Carmen ve NM-503 pamuk (*Gossypium hirsutum* L.) çeşitlerine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda (0, 100, 200, 400 mM) tuz uygulanması sonucu MDA miktarlarının iki yönlü varyans analizi, Çizelge 4.20’de ise analiz sonucu elde edilen MDA miktarları verilmiştir. Bu miktarlardan elde edilen grafiğin görüldüğü Şekil 4.31’de Carmen çeşidi için, en yüksek MDA miktarının kontrol grubunda olduğu gözlemlenmektedir. 100 mM tuz uygulanan deneme istatistiksel olarak kontrol grubuyla aynı grupta yer almıştır. Bu çeşidin kontrol grubunda 0.0051 mikromol/gramın, ilk tuz uygulaması olan 100 mM’da 0.0051 mikromol/g’a düştüğünü fakat aralarında belirgin bir fark olmadığı görülmüştür. 200 mM tuz uygulamasında MDA miktarının 0.0042 mikromol/g’a düştüğünü, uygulanan en yüksek tuz konsantrasyonu olan 400 mM’da bu miktarın 0.002 mikromol/g’a düştüğü gözlemlenmiştir.

NM-503 çeşidi için ise kontrol grubu ile birlikte 100 mM ve 200 mM tuz uygulanan grupta miktar ve istatistiksel olarak bir fark gözlemlenmeyip 400 mM tuz uygulanan grupta en yüksek MDA miktarı ile birlikte diğer gruplara göre istatistiksel olarak bir farklılık gözlemlenmiştir. Bu çeşidin kontrol grubunda 0.0013 mikromol/g

olan MDA miktarı, tuz stresine maruz kaldığı ilk konsantrasyon olan 100 mM konsantrasyonda düşüş göstererek 0.0011 mikromol/g'a düştüğü, 200 mM tuz uygulaması sonrasında miktarın 0.0012 mikromol/g'a yükselerek kontrole yaklaştığı ve en yüksek konsantrasyon olan 400 mM tuz uygulaması ile artarak 0.0024 mikromol/g olduğu gözlemlenmiştir.

Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	Önem düzeyi (P)
Çeşit	1	0.000337	0.000337	652.80	0.000
Konsantrasyon	3	0.000031	0.000010	20.00	0.000
Çeşit * Konsantrasyon	3	0.000153	0.000051	99.15	0.000
Hata	187	0.000096	0.000001		
Genel	194	0.000627			

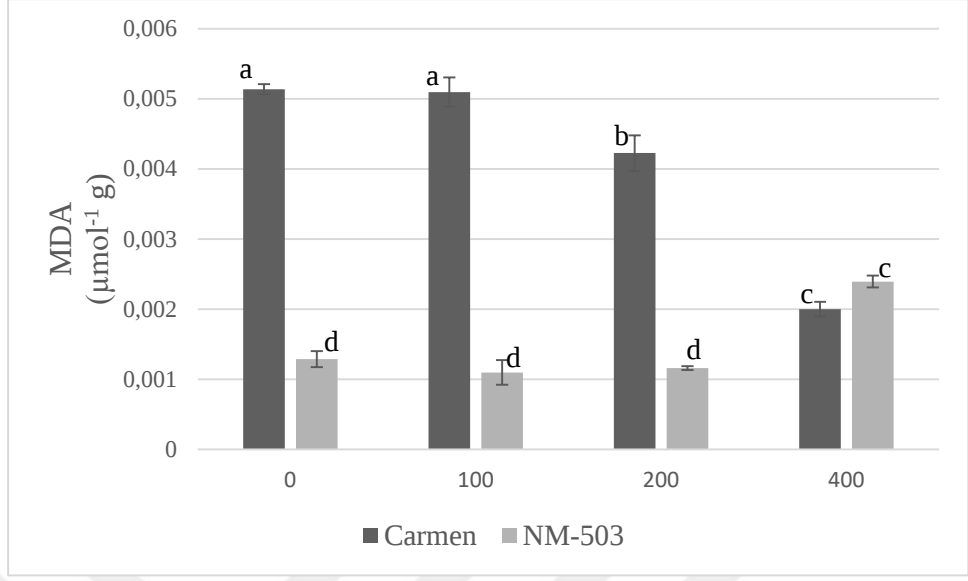
Çizelge 4.19: Carmen ve NM-503 pamuk (*Gossypium hirsutum* L.) çeşitlerine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda (0, 100, 200, 400 mM) tuz uygulanması sonucu MDA miktarlarının iki yönlü varyans analizi.

Çeşit	NaCl Konsantrasyonu (mM)	MDA Miktarı ($\mu\text{mol}^{-1} \text{ g}$) Ortalama $\pm$ SH
Carmen	0	0.005 $\pm$ 0.00007 a
	100	0.005 $\pm$ 0.0002 a
	200	0.004 $\pm$ 0.0003 b
	400	0.002 $\pm$ 0.0001 c
NM-503	0	0.001 $\pm$ 0.0001d
	100	0.001 $\pm$ 0.0002 d
	200	0.001 $\pm$ 0.00003d
	400	0.002 $\pm$ 0.00008 c

Çizelge 4.20: Carmen ve NM-503 pamuk (*Gossypium hirsutum* L.) çeşitlerine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda (0, 100, 200 ve 400 mM) tuz uygulanması sonucu analizlenen kalluslardaki MDA miktarları ve standart hataları.

Aynı sütunda yer alan farklı harfler, Tukey Metoduna göre belirgin bir fark ($P \leq 0.05$) oluşturmaktadır.

SH: Standart hata.



Şekil 4.31: Carmen ve NM-503 pamuk (*Gossypium hirsutum* L.) çeşitlerine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda (0, 100, 200 ve 400 mM) tuz uygulanması sonucu analizlenen kalluslardaki MDA miktarının grafik üzerinde standart hataları ile birlikte gösterimi

4.3.5 Prolin Miktarı

Yapılan çalışmada prolin düzeylerini incelediğimiz artan konsantrasyonlarda tuz stresine maruz bırakılan iki çeşidin iki yönlü varyans analizi Çizelge 4.21, bu veriler Çizelge 4.22’de, bu verilerle oluşan Şekil 4.32’de verilmiştir. Dayanıklı olan Carmen çeşidinde kontrol grubunda 0.30686 mikromol/g olan prolin miktarı, uygulanan tuz konsantrasyonu arttıkça artmış ve en yüksek olan 400 mM tuz konsantrasyonunda 3.10 mikromol/g olarak gözlemlenmiştir. Duyarlı çeşit NM-503’te ise kontrol grubunda 0.37 mikromol/g olan prolin miktarı 100 mM grubunda 0.56 mikromol/g’a yükselmiş ve 200 mM tuz uygulamasıyla azalarak 0.22 mikromol/g’a olmuştur. En az olduğu düzeyin en yüksek konsantrasyon olan 400 mM’da 0.21 mikromol/g olarak gözlemlenmiştir. İstatistiksel olarak ise Carmen ve NM-503 çeşitlerinde Carmen çeşidinin bütün dozların birbirinden farklı olduğu görülmüştür. NM-503 çeşidinde ise 200 ve 400 mM konsantrasyonlarının istatistiksel olarak farklı olmadığı görülmüştür.

Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	Önem düzeyi (P)
Çeşit	1	14.8628	14.8628	56600.42	0.000
Konsantrasyon	3	9.3735	3.1245	11898.69	0.000
Çeşit * Konsantrasyon	3	13.7939	4.5980	17509.90	0.000
Hata	24	0.0063	0.0003		
Genel	31	38.0366			

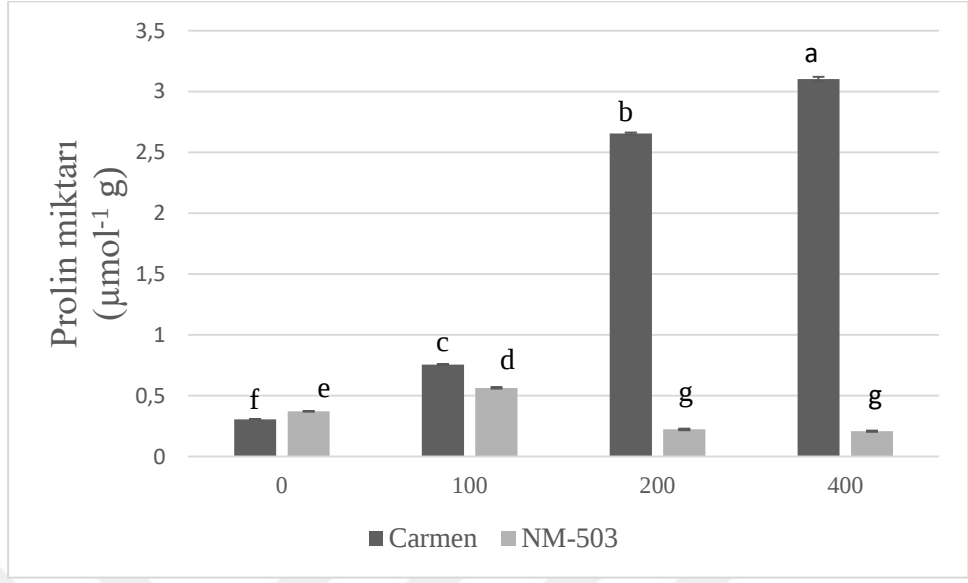
Çizelge 4.21: Carmen ve NM-503 pamuk (*Gossypium hirsutum* L.) çeşitlerine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda (0, 100, 200, 400 mM) NaCl uygulanması sonucu prolin miktarlarının iki yönlü varyans analizi.

Çeşit	NaCl Konsantrasyonu (mM)	Prolin miktarları $\pm$ SH (μmol^{-1} g)
Carmen	0	0.31 $\pm$ 0.001 f
	100	0.76 $\pm$ 0.006 c
	200	2.65 $\pm$ 0.01 b
	400	3.10 $\pm$ 0.0163 a
NM-503	0	0.37 $\pm$ 0.003 e
	100	0.56 $\pm$ 0.007 d
	200	0.22 $\pm$ 0.007 g
	400	0.21 $\pm$ 0.005 g

Çizelge 4.22: Carmen ve NM-503 pamuk (*Gossypium hirsutum* L.) çeşitlerine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda (0, 100, 200 ve 400 mM) NaCl uygulanması sonucu analizlenen kallusların mikromol/g prolin cinsinden miktarları ve standart hataları.

Aynı sütunda yer alan farklı harfler, Tukey Metoduna göre belirgin bir fark ($P \leq 0.05$) oluşturmaktadır.

SH: Standart hata.



Şekil 4.32: Carmen ve NM-503 pamuk (*Gossypium hirsutum* L.) çeşitlerine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda (0, 100, 200 ve 400 mM) NaCl uygulanması sonucu analizlenen kallusların mikromol/g prolin cinsinden miktarı ve standart hatalarının gösterimi.

4.3.6 Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi

Çizelge 4.23'te Carmen ve NM-503 pamuk (*Gossypium hirsutum* L.) çeşitlerine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda (0, 100, 200, e 400 mM) NaCl uygulanması sonucu elde edilen kallusların SOD analizinin iki yönlü varyans analiz sonuçları, çizelge 4.24'te ise SOD analizinden elde edilen miktarlar ve standart hataları verilmiştir. Bu sonuçlarla elde edilen grafik Şekil 4.33'te verilmiştir. Bu grafiğe göre Carmen çeşidinde kontrole göre, ilk uygulanan tuz konsantrasyonu olan 100 mM uygulandığında SOD aktivitesi hemen artmış 200 mM'da da sabit kalmıştır. 400 mM tuz uygulamasıyla 10 kata kadar azalma gösterdiği görülmüştür. İstatistiksel olarak ise 400 mM tuz uygulanan grupta diğer gruplarla arasında anlamlı bir farklılık olduğu görülmüştür.

NM-503 çeşidinde ise, en yüksek SOD aktivitesi kontrol grubunda, en az ise 100 mM tuz uygulanan grupta görülmüştür. İstatistiksel olarak kontrol grubu ile 100 mM tuz uygulanan grup arasında anlamlı bir farklılık görülürken, 100 mM tuz uygulanan grup ile kontrol grubu teker teker diğer gruplar ile değerlendirildiğinde farklılık görülmemiştir.

Çalışmada SOD aktivitesinin belirlemek için yapılan analizlerde, tuza dayanıklı olduğu bilinen Carmen çeşidinde kontrol grubunun SOD aktivite miktarı 227.28 ünite mg^{-1} proteinken, tuz uygulanan ilk konsantrasyon olan 100 mM muamelesi ile 258.0 ünite mg^{-1} protein'e yükselmiştir. 200 mM tuz muamelesi ile 259.0 ünite mg^{-1} protein olarak çok yükselmediği görülen SOD enzimi, en yüksek doz olan 400 mM tuz uygulaması ile 19.790 ünite mg^{-1} protein ile en düşük aktiviteyi göstermiştir.

Tuza duyarlı olduğu bilinen NM-503 çeşidinin SOD aktivitesi kontrol grubunda, 272.0 ünite mg^{-1} proteinken, tuz uygulanan ilk kontrol olan 100 mM'da 184.09 ünite mg^{-1} protein'e düştüğü gözlemlenmiştir. 200 mM tuz konsantrasyonu uygulanan grupta 265.63 ünite mg^{-1} protein'e yükselmiş, 400 mM tuz konsantrasyonu uygulanan grupta ise 232.0 ünite mg^{-1} protein'e düştüğü gözlemlenmiştir.

Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	Önem düzeyi (P)
Çeşit	1	13392	13391.3	14.33	0.002
Konsantrasyon	3	68668	22889.3	24.50	0.000
Çeşit * Konsantrasyon	3	14949	21800.1	23.33	0.000
Hata	16	162409	934.3		
Genel	23	41480.2			

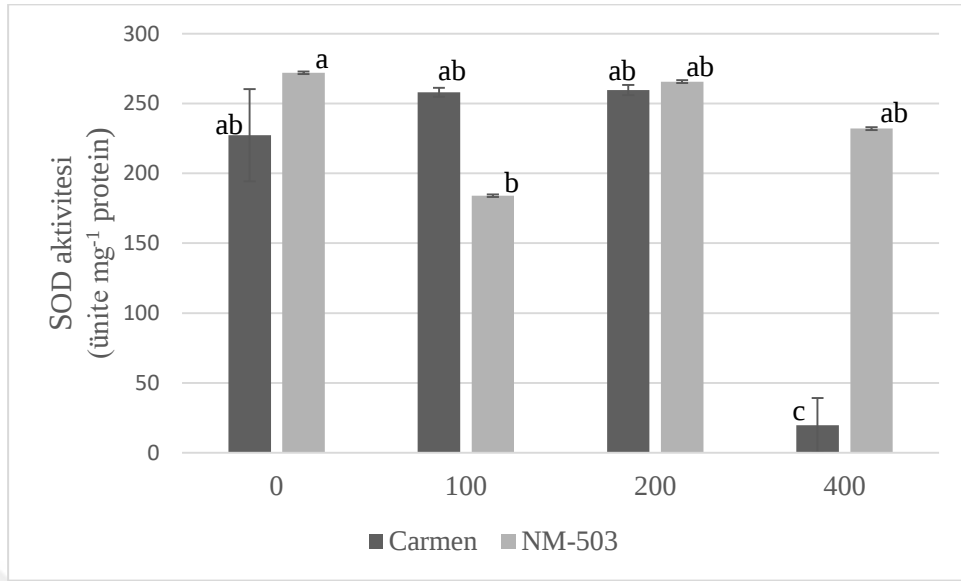
Çizelge 4.23: Carmen ve NM-503 pamuk (*Gossypium hirsutum* L.) çeşitlerine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda (0, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 ve 400 mM) NaCl uygulanması sonucu elde edilen kallusların SOD analizinin iki yönlü varyans analizi.

Çeşit	NaCl Konsantrasyonu (mM)	SOD Aktivitesi (ünite mg ⁻¹ protein) Ortalama ± S.H.
Carmen	0	227.28±8.77 ab
	100	258.0±10.6 ab
	200	259.6±28.6 ab
	400	19.790±0.724 c
NM-503	0	272.0±32.9 a
	100	184.09±3.24 b
	200	265.63±3.66 ab
	400	232.0±19.5 ab

Çizelge 4.24: Carmen ve NM-503 pamuk (*Gossypium hirsutum* L.) çeşitlerine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda (0, 100, 200,400) NaCl uygulanması sonucu elde edilen kalluslarda SOD analizinden elde edilen sonuçlar.

Aynı sütunda yer alan farklı harfler, Tukey Metoduna göre belirgin bir fark ($P \leq 0.05$) oluşturmaktadır.

SH: Standart hata.



Şekil 4.33: Carmen ve NM-503 pamuk (*Gossypium hirsutum* L.) çeşitlerine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda (0, 100, 200 ve 400 mM) NaCl uygulanması sonucu analizlenen kallusların süperoksit dismutaz aktivitelerinin ünite mg⁻¹ protein cinsinden gösterimi.

4.3.7 Katalaz (CAT) Aktivitesi

Çizelge 4.25'te Carmen ve NM-503 pamuk (*Gossypium hirsutum* L.) çeşitlerine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda (0, 100, 200, 400 mM) NaCl uygulanması sonucu unit cinsinden katalaz aktivitelerinin iki yönlü varyans analizi, Çizelge 4.26'te ise CAT aktivitelerinin ünite mg⁻¹ protein cinsinden miktarları ve standart hataları, Şekil 4.34'de ise bu verilerin grafik üzerinde gösterimi verilmiştir.

Bu verilere göre Carmen'in CAT aktivitesi kontrol grubunda düşükken 100 mM tuz uygulanan kallusta yükselmiş ve en yüksek aktivitesini 400 mM tuz uygulanan grupta göstermiştir. İstatistiksel olarak gruplar arasında anlamlı bir farklılık gözlemlenmemiştir.

CAT aktivitesi Carmen çeşidine ait kontrol grubundaki katalaz aktivitesi 1.34 ünite mg⁻¹ protein olarak ölçülmüştür. İlk tuz uygulaması olan 100 mM konsantrasyonun uygulandığı grupta aktivite, 1.87 ünite mg⁻¹ protein'e yükselmiştir. 200 mM tuz konsantrasyonunda 1.54 ünite mg⁻¹ protein düşen aktivite, en yüksek miktarını en yüksek tuz konsantrasyonu olan 400 mM grubunda göstererek 3.59 ünite mg⁻¹ protein olarak belirlenmiştir.

Tuza duyarlı olarak bilinen NM-503 eşidinin kontrol grubundaki katalaz enzim aktivite miktarı, 8.87 ünite mg^{-1} protein ile en yüksekken tuz uygulanan ilk konsantrasyon olan 100 mM grubunda 2.45 ünite mg^{-1} protein olarak ölçölerek düşüş olduğu gözlemlenmiştir. 200 mM tuz uygulanan, kontrole göre düşüş bir önceki tuz konsantrasyonu grubuna göre yükselme göstermiştir ve katalaz aktivitesi 3.93 ünite mg^{-1} protein olarak ölçölmüştür. En yüksek konsantrasyon olan, 400 mM tuzun uygulandığı grupta ise katalaz aktivitesi 2.46 ünite mg^{-1} protein olarak ölçölmüştür.

İstatistiksel olarak kontrol grubu ile diğler tuz uygulanan gruplar arasında anlamlı bir farklılık gözlemlenmiştir.



Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	Önem düzeyi (P)
Çeşit	1	43.98	43.983	17.30	0.000
Konsantrasyon	3	39.52	13.172	5.18	0.007
Çeşit * Konsantrasyon	3	84.34	28.113	11.06	0.000
Hata	24	61.03	2.543		
Genel	31	228.86			

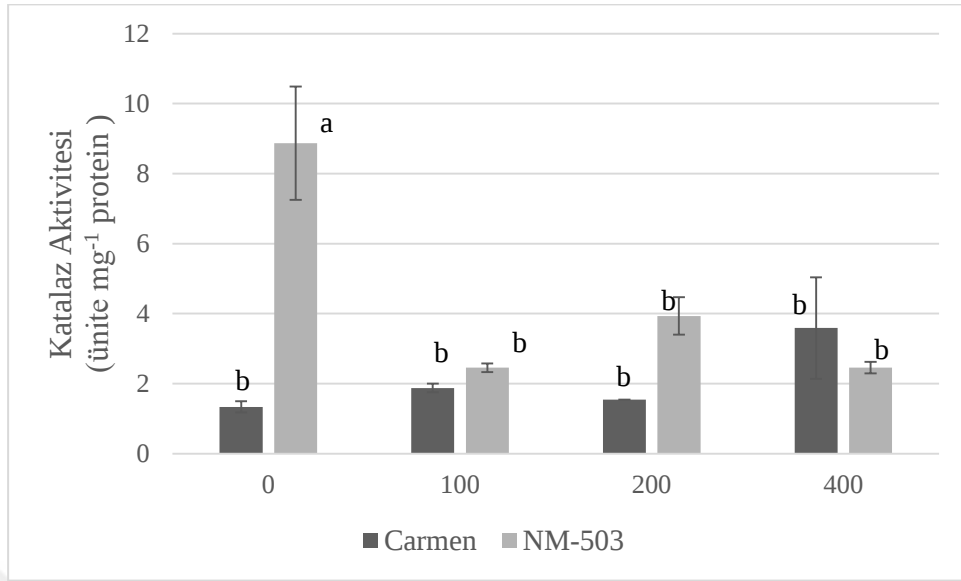
Çizelge 4.25: Carmen ve NM-503 pamuk (*Gossypium hirsutum* L.) çeşitlerine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda (0, 100, 200, 400 mM) NaCl uygulanması sonucu unit cinsinden katalaz miktarlarının iki yönlü varyans analizi.

Çeşit	NaCl Konsantrasyonu (mM)	Katalaz Miktarları (ünite mg ⁻¹ protein) Ortalama±SH
Carmen	0	1.3±0.16 b
	100	1.9±0.12 b
	200	1.5±0.001 b
	400	3.6±1.45 b
NM-503	0	8.9±1.62 a
	100	2.5±0.12 b
	200	3.9±0.54 b
	400	2.46±0.17 b

Çizelge 4.26: Carmen ve NM-503 pamuk (*Gossypium hirsutum* L.) çeşitlerine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda (0, 100, 200 ve 400 mM) NaCl uygulanması sonucu analizlenen 0.1 gram kallusun unit cinsinden katalaz aktivitesi ve standart hataları.

Aynı sütunda yer alan farklı harfler, Tukey Metoduna göre belirgin bir fark ($P \leq 0.05$) oluşturmaktadır.

SH: Standart hata.



Şekil 4.34: Carmen ve NM-503 pamuk (*Gossypium hirsutum* L.) çeşitlerine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda (0, 100, 200 ve 400 mM) NaCl uygulanması sonucu analizlenen kallusun ünite mg⁻¹ protein cinsinden CAT aktivitesi.

4.3.8 Peroksidaz (POX) Aktivitesi

Peroksidaz (POX) aktivitesi analizi için daha önceki çalışmalarda da olduğu gibi iki çeşit için de kontrol grubu ile 3 farklı konsantrasyonda tuz stresi uygulaması yapılan kallus kültürleri kullanılmıştır. Elde edilen sonuçların iki yönlü varyans analizi, Çizelge 4.27'deki gibi gösterilmiştir. İki farklı pamuk çeşidine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda tuz stresi uygulandıktan sonra elde edilen POX enziminin aktivitesinin sonuçları Çizelge 4.28'de gösterilmiştir.

Carmen çeşidine ait kallus kültürlerinde uygulanan NaCl miktarının kontrollü artışı POX enziminin aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı olarak artışına neden olmaktadır. Carmen çeşidine ait kallus kültürlerinde kontrol grubu ile 400 mM NaCl stresi uygulanmış deney grubunun POX aktivitesinde oldukça önemli oranda farklılık göstermektedir.

NM-503 çeşidinin de ait kallus kültürlerine uygulanan NaCl miktarının artışı POX enziminin aktivitesindeki artışa neden olmuş ve bu artış istatistiksel olarak anlamlılık göstermektedir. NM-503 çeşidinin kontrol grubu ile 400mM NaCl uygulanan

deney grubu POX enzim aktivitesi açısından anlamlı farklılık göstermektedir. POX enzimi miktarı her iki çeşit için de tuzluluğa bağlı olarak artmakta (Şekil 4.28) en yüksek farklılık NM-503 çeşidinde görülmektedir.

Artan tuzluluk stresine bağlı olarak, NM-503 çeşidinin kallus kültürleri Carmen çeşidi kallus kültürlerine oranla daha fazla POX aktivitesinde farklılık göstermiştir. Carmen ve NM-503 çeşitlerinin kontrol grubunun POX aktivitesi önemli ölçüde farklılık göstermekte ve bu farklılık 400 mM'lık NaCl konsantrasyonunda da görülmektedir (Şekil 4.35).

Carmen çeşidinin kontrol grubuna ait peroksidaz aktivitesi, 10.19 ünite mg^{-1} protein görülürken 100 mM tuz konsantrasyonu uygulanan grupta aktivitenin 10.46 ünite mg^{-1} protein ile çok yükselmediği gözlemlenmiştir. 200 mM tuz konsantrasyonu uygulanan grupta peroksidaz aktivitesinin 15.60 ünite mg^{-1} protein'e yükseldiği, 400 mM tuz konsantrasyonu uygulanan grupta ise 18.39 ünite mg^{-1} protein'le en yüksek miktara ulaştığı görülmüştür (Çizelge 4.28)

Tuza duyarlı olduğu bilinen NM-503 çeşidinde ise, kontrol grubunun peroksidaz aktivitesi 4.28 ünite mg^{-1} protein, tuz uygulanan ilk konsantrasyon olan 100 mM'da 12.43 ünite mg^{-1} protein'e yükseldiği görülmüştür. Sonraki konsantrasyonlarda ise (200 ve 400 mM) aktivitelerin bu konsantrasyona göre çok yükselmediği görülmüştür (13.99 ve 13.50 ünite mg^{-1} protein).

Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	Önem düzeyi (P)
Çeşit	1	54.39	54.395	22.89	0.000
Konsantrasyon	3	367.12	122.374	51.50	0.000
Çeşit * Konsantrasyon	3	76.04	25.348	10.67	0.000
Hata	24	57.03	2.376		
Genel	31	554.59			

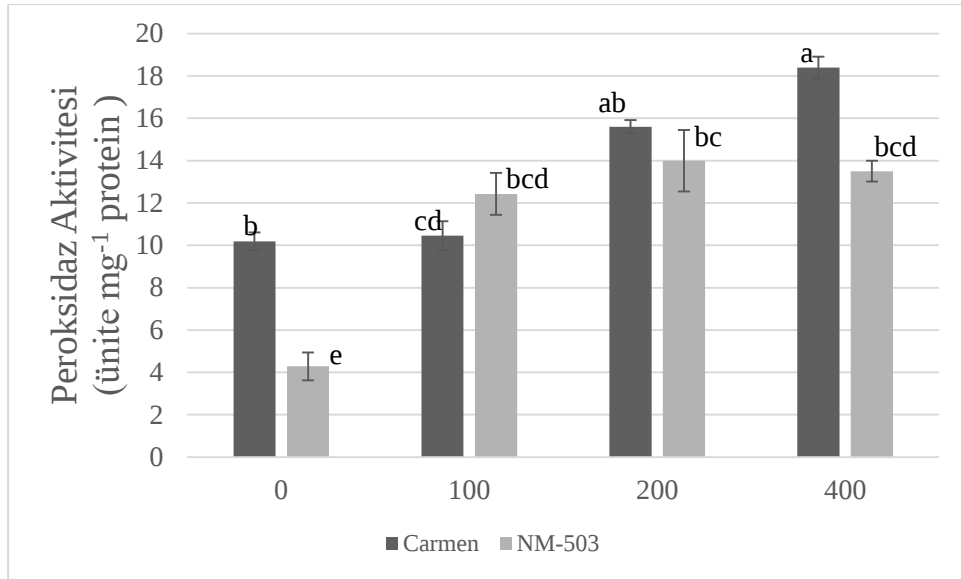
Çizelge 4.27: Carmen ve NM-503 pamuk (*Gossypium hirsutum* L.) çeşitlerine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda (0, 100, 200, 400 mM) NaCl uygulanması sonucu peroksidaz aktivitesinin unit cinsinden miktarının iki yönlü varyans analizi.

Çeşit	NaCl Konsantrasyonu (mM)	Peroksidaz Aktivitesi Ortalama±SH (ünite mg⁻¹ protein)
Carmen	0	10.19±0.42d
	100	10.46±0.68 cd
	200	15.6±0.31 ab
	400	18.39±0.52 a
NM-503	0	4.28±0.66 e
	100	12.43±0.99 bcd
	200	13.99±1.45 bc
	400	13.50±0.49 bcd

Çizelge 4.28: Carmen ve NM-503 pamuk (*Gossypium hirsutum* L.) çeşitlerine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda (0, 100, 200 ve 400 mM) NaCl uygulanması sonucu analizlenen kallusun peroksidaz aktivitesinin ünite mg⁻¹ protein cinsinden miktarları

Aynı sütunda yer alan farklı harfler, Tukey Metoduna göre belirgin bir fark ($P \leq 0.05$) oluşturmaktadır.

SH: Standart hata.



Şekil 4.35: Carmen ve NM-503 pamuk (*Gossypium hirsutum* L.) çeşitlerine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda (0, 100, 200 ve 400 mM) NaCl uygulanması sonucu analizlenen kallusun peroksidaz aktivitesinin ünite mg⁻¹ protein cinsinden aktivites

4.3.9 Askorbat Peroksidaz (APX) Aktivitesi

Askorbat peroksidaz aktivitesi analizinde her iki grup (Carmen ve NM-503) için de 3 farklı konsantrasyonda tuz stresi uygulaması yapılan kallus kültürleri kullanılmıştır. Elde edilen sonuçların iki yönlü varyans analizi Çizelge 4.29'da gösterilmiştir. İki farklı pamuk çeşidine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda tuz stresi uygulandıktan sonra askorbat peroksidaz enziminin aktivitesinin sonuçları Çizelge 4.30'de gösterilmiştir. Bu sonuçların grafiklendirilmiş hali ise Şekil 4.36'da gösterilmiştir. Her iki çeşidin de kontrol grupları karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan bir farklılık görülmemektedir. 100 mM NaCl uygulanan Carmen ve NM-503 çeşitleri arasında çok büyük bir farklılık olmamak ile birlikte her iki çeşidin de en yüksek askorbat peroksidaz aktivitesi gösterdiği konsantrasyon 400 mM NaCl kullanıldığında elde edilmiştir. Bu durumda anlamlı fakat büyük bir farklılık bulunmamaktadır.

Carmen çeşidi için kontrol grubunda aktivite, 0.0014 unit/mg proteinken, ilk konsantrasyon olan 100 mM tuz uygulamasında aktivitenin neredeyse değişmeden 0.00134 olduğu görülmüştür. 200 Mm konsantrasyonu ile 0.0027 ünite mg⁻¹ protein olan aktivite miktarı en yüksek konsantrasyon olan tuz uygulamasında 0.0030 ünite mg⁻¹ protein olarak belirlenmiş ve Carmen çeşidi için en yüksek aktiviteyi göstermiştir.

NM-503 eşidi içinse askorbat peroksidaz aktivitesi kontrol grubunda 0.001460 ünite mg^{-1} protein olarak belirlenirken, uygulanan 100 mM ve 200 mM tuz konsantrasyonunda aktiviter 0.0016 ve 0.0018 ünite mg^{-1} protein olarak belirlenmiştir. Bu konsantrasyonlarda aktivitenin fazla yükselmediği gözlemlenirken 400 mM tuz konsantrasyonu olan uygulamada 0.0039 ünite mg^{-1} protein ile en yüksek aktivitenin bu konsantrasyonda olduğu belirlenmiştir.

İki çeşit birbirlerine göre kıyaslandığında artan tuz konsantrasyonlarında askorbat peroksidaz aktivitesinin de doğru orantılı olarak arttığı gözlemlenmiştir.



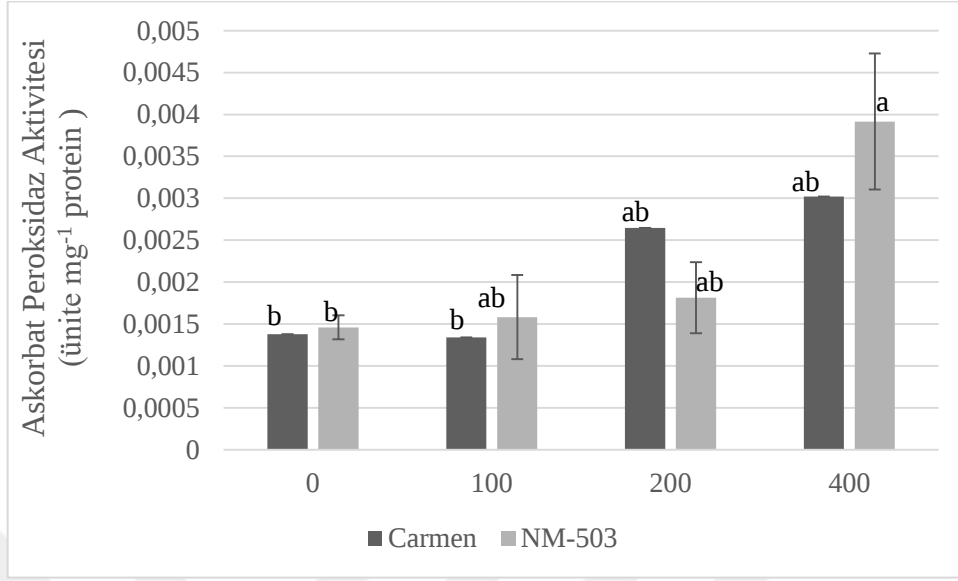
Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	Önem düzeyi (P)
Çeşit	1	700	700.0	0.07	0.799
Konsantrasyon	3	220012	73337.5	6.92	0.002
Çeşit * Konsantrasyon	3	30166	10055.2	0.95	0.433
Hata	24	254468	10602.9		
Genel	31	505347			

Çizelge 4.29: Carmen ve NM-503 pamuk (*Gossypium hirsutum* L.) çeşitlerine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda (0, 100, 200, 400 mM) NaCl uygulanması sonucu askorbat peroksidaz aktivitesinin miktarlarının iki yönlü varyans analizi.

Çeşit	NaCl Konsantrasyonu (mM)	Askorbat Peroksidaz Aktivitesi (ünite mg ⁻¹ protein) Ortalama±SH
Carmen	0	0.0014±0.0001 b
	100	0.0014±0.0004 b
	200	0.0027 ±0.0004 ab
	400	0.0030±0.001 ab
NM-503	0	0.0015±0.0001 b
	100	0.0016 ±0.0005 ab
	200	0.0018 ±0.0004 ab
	400	0.004 ±0.0008 a

Çizelge 4.30: Carmen ve NM-503 pamuk (*Gossypium hirsutum* L.) çeşitlerine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda (0, 100, 200 ve 400 mM) NaCl uygulanması sonucu analizlenen kallusların askorbat peroksidaz miktarları ve standart hataları.

Aynı sütunda yer alan farklı harfler, Tukey Metoduna göre belirgin bir fark ($P \leq 0.05$) oluşturmaktadır. SH: Standart hata.



Şekil 4.36: Carmen ve NM-503 pamuk (*Gossypium hirsutum* L.) çeşitlerine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda (0, 100, 200 ve 400 mM) NaCl uygulanması sonucu analizlenen kallusların askorbat peroksidaz aktivitesinin ünite mg⁻¹ protein cinsinden aktivitesi.

4.3.10 Glutasyon Redüktaz (GR) Aktivitesi

Glutasyon redüktaz (GR) aktivitesinin hesaplanmasında iki çeşit (Carmen ve NM-503) pamuk bitkisinden elde edilen kallus kültürlerine 3 farklı tuzluluk stresi uygulanmış ve bu kültürler kullanılmıştır. Yapılan varyans analizi elde edilen sonuçların anlam düzeyleri çizelge 4.31’de, verilerin tablosu ise çizelge 4.32’de gösterilmiştir. İki çeşide ait verilerin grafikleri Şekil 4.37’de gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda anlamlı bir farklılık elde edilmemiştir.

Glutasyon redüktaz aktivitesi Carmen çeşidinde kontrol grubunda 0.0159 ünite mg⁻¹ protein bulunurken, uygulanan ilk tuz konsantrasyonundan sonra (100 mM) aktivite 2 katına çıkarak 0.031 ünite mg⁻¹ protein olmuştur. Daha sonra uygulanan konsantrasyonlarda (200, 400 mM) artan konsantrasyonlara bağlı olarak azalma gözlemlendiği halde (0.00663, 0.00706) bu iki konsantrasyon arasında anlamlı bir fark görülmemiştir.

NM-503 çeşidinde ise kontrol grubunda 0.0072 unit/mg protein olan glutasyon redüktaz aktivitesi, uygulanan ilk konsantrasyon olan 100 mM tuz ile iki katına çıkarak

0.01200 ünite mg^{-1} protein olarak ölçülmüştür. Daha sonra 200 mM tuz konsantrasyonunda 0.014 ünite mg^{-1} protein olan aktivite en yüksek konsantrasyon olan 400 mM tuz uygulamasında NM-503 çeşidi için en yüksek miktar olan 0.016 ünite mg^{-1} protein'e ulaşmasına rağmen bir önceki konsantrasyonla arasında çok bir farklılık olmadığı gözlemlenmiştir.

İki çeşit kıyaslandığında Carmen çeşidi için tuz konsantrasyonu arttıkça glutatyon redüktaz aktivitesi azalırken, NM-503 uygulanan tuz konsantrasyonu arttıkça glutatyon redüktaz aktivitesi artmasına rağmen en yüksek glutatyon redüktaz aktivitesinin gözlemlendiği 400 mM tuz uygulanan konsantrasyondaki aktivite Carmen çeşidinin kontrol grubundaki aktivitesiyle aynı olduğu görülmüştür.

Carmen ve NM-503 çeşitlerinin tüm gruplarında GR enzim aktivitesi genel olarak düşük olmak ile birlikte tuz oranının artışı ile Carmen grubunun GR aktivitesi daha da azalma göstermektedir (Çizelge 4.32). Carmen ve NM-503 çeşitlerine tuz uygulanan her bir grubunun GR enzim aktivitesinin Şekil 4.30'daki gibi grafikte gösterilmiştir.

Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	Önem düzeyi (P)
Çeşit	1	0.000003	0.000003	0.01	0.912
Konsantrasyon	3	0.000581	0.000194	0.80	0.508
Çeşit * Konsantrasyon	3	0.001550	0.000517	2.13	0.123
Hata	24	0.005828	0.000243		
Genel	31	0.007962			

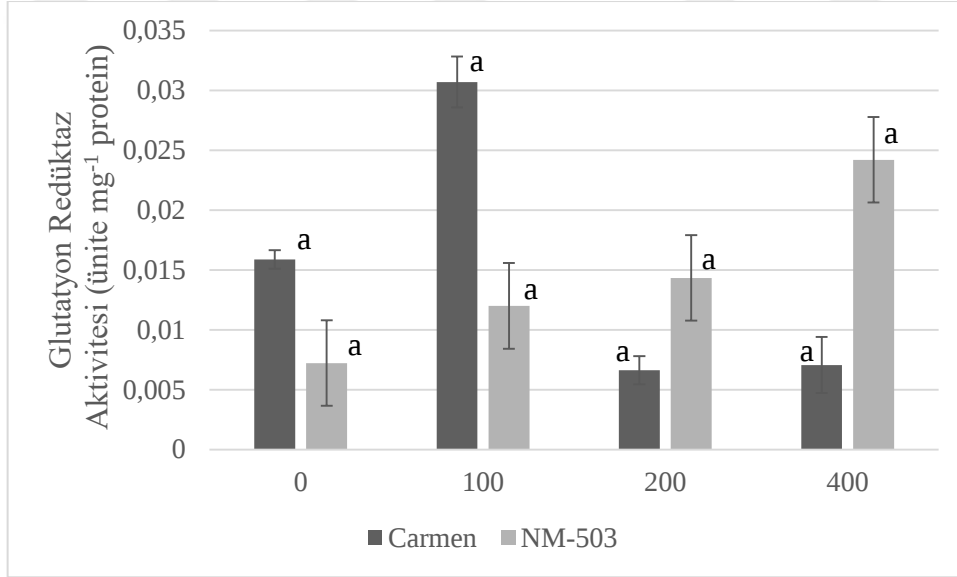
Çizelge 4.31: Carmen ve NM-503 pamuk (*Gossypium hirsutum* L.) çeşitlerine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda (0, 100, 200, 400 mM) NaCl uygulanması sonucu glutatyon redüktazın unit (U) cinsinden spesifik aktivitelerinin iki yönlü varyans analizi.

Çeşit	NaCl Konsantrasyonu (mM)	Glutasyon Redüktaz Aktivitesi (ünite mg ⁻¹ protein) Ortalama±SH
Carmen	0	0.0158±0.0008 a
	100	0.0307±0.02 a
	200	0.00663±0.001 a
	400	0.00706±0.002 a
NM-503	0	0.007226±0.0004 a
	100	0.01200±0.001 a
	200	0.014340±0.0008 a
	400	0.015873±0.0008 a

Çizelge 4.32: Carmen ve NM-503 pamuk (*Gossypium hirsutum* L.) çeşitlerine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda (0, 100, 200, 400 mM) NaCl uygulanması sonucu glutasyon redüktazın unit (U) cinsinden aktiviteleri ve standart hataları.

Aynı sütunda yer alan farklı harfler, Tukey Metoduna göre belirgin bir fark ($P \leq 0.05$) oluşturmaktadır.

SH: Standart hata.



Şekil 4.37: Carmen ve NM-503 pamuk (*Gossypium hirsutum* L.) çeşitlerine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda (0, 100, 200, 400 mM) NaCl uygulanması sonucu glutasyon redüktazın ünite mg⁻¹ protein cinsinden normal aktiviteleri.

4.3.11 DPPH (% İnhibisyon)

Çizelge 4.33’de Carmen ve NM-503 pamuk (*Gossypium hirsutum* L.) çeşitlerine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda (0, 100, 200, 400 mM) NaCl uygulanması sonucu DPPH miktarlarının iki yönlü varyans analizi, Çizelge 4.34’de ise DPPH analizi sonucunda elde edilen % inhibisyon oranları verilmiştir. Bu verilerle elde edilen Şekil 4.38’deki grafiğe göre Carmen çeşidi için en fazla % inhibisyon oranı kontrol grubunda, en az ise 100 mM uygulanan grupta gözlemlenmiştir. 4 grup arasında (kontrol, 100, 200, 400 mM) istatistiksel olarak farklılık olduğu görülmüştür.

Carmen çeşidinin kontrol grubunda DPPH radikalinin % inhibisyon değeri 362 iken, uygulanan en yüksek konsantrasyon olan 400 mM grubunda 169 ile en düşük olduğu bildirilmiştir. İlk uygulanan konsantrasyon olan 100 mM tuz konsantrasyonunda en yüksek % inhibisyon değeri, 200 mM tuz uygulamasıyla 270.21’e yükselmiş fakat daha sonra en yüksek konsantrasyonda kontrol grubuna göre düşüş olduğu gözlemlenmiştir.

NM-503 çeşidi için ise kontrol grubunda en fazla %inhibisyon oranı gözlemlenirken bu oran en az % inhibisyon oranı gözlemlenilen 100 mM tuz konsantrasyonu uygulanan grupta azalmış ve bu konsantrasyondan sonra tekrar arttığı gözlemlenmiştir. Tuz uygulanan 3 konsantrasyon arasında istatistiksel olarak farklılık gözlemlenmezken kontrol grubunda bu 3 gruba göre istatistiksel olarak farklılık gözlemlenmiştir.

NM-503 çeşidinde ise başlangıçta 248.3 ile en yüksek olduğu gözlemlenen % inhibisyon değeri en düşük, ilk tuz uygulaması olan 100 mM konsantrasyonunda 58.36 olarak ölçülmüştür. 200 mM tuz konsantrasyonu uygulamasında 98.68 olan % inhibisyon değeri 400 mM tuz konsantrasyonunda 114.61’dir.

Varyasyon kaynağı	Serbestlik derecesi	Kareler toplamı	Kareler ortalaması	F değeri	Önem düzeyi (P)
Çeşit	1	73896	73896.0	110.27	0.000
Konsantrasyon	3	199495	66498.2	99.23	0.000
Çeşit * Konsantrasyon	3	18514	6171.4	9.21	0.000
Hata	24	16083	670.1		
Genel	31	307988			

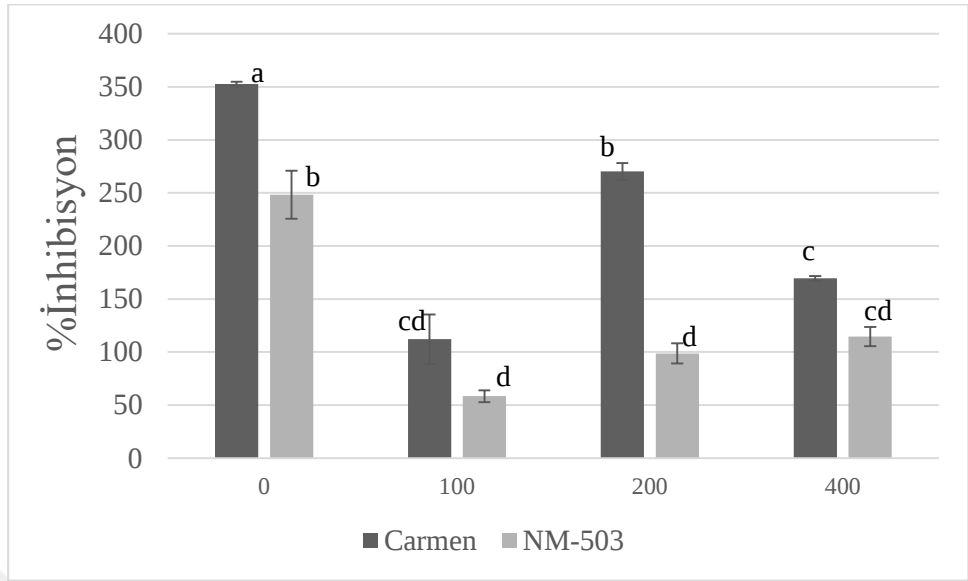
Çizelge 4.33: Carmen ve NM-503 pamuk (*Gossypium hirsutum* L.) çeşitlerine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda (0, 100, 200, 400 mM) NaCl uygulanması sonucu DPPH miktarlarının iki yönlü varyans analizi.

Çeşit	NaCl Konsantrasyonu (mM)	% İnhibisyon Ortalama±SH
Carmen	0	352.6±2.14 a
	100	112.1±23.4 cd
	200	270.21±8.05 b
	400	169.41±2.14 c
NM-503	0	248.3±22.7 b
	100	58.36±5.63 d
	200	98.68±9.50 d
	400	114.61±9.10 cd

Çizelge 4.34: Carmen ve NM-503 pamuk (*Gossypium hirsutum* L.) çeşitlerine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda (0, 100, 200 ve 400 mM) NaCl uygulanması sonucu analizlenen kallusların % inhibisyon oranları ve standart hataları.

Aynı sütunda yer alan farklı harfler, Tukey Metoduna göre belirgin bir fark ($P \leq 0.05$) oluşturmaktadır.

SH: Standart hata



Şekil 4.38: Carmen ve NM-503 pamuk (*Gossypium hirsutum* L.) çeşitlerine ait kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda (0, 100, 200 ve 400 mM) NaCl uygulanması sonucu analizlenen kallusların % inhibisyon oranları.

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada tuzluluğa dayanıklı (Carmen) ve duyarlı (NM-503) olduğu bilinen iki pamuk (*Gossypium hirsutum* L.) çeşidinin tohumları *in vitro*da yarı katı besin ortamında çimlendirilmiştir. Elde edilen steril fidelerden elde edilen kalluslar, 4 hafta boyunca farklı konsantrasyonlarda (0, 100, 200, 400 mM) tuza maruz bırakıldıktan sonra fizyolojik, morfolojik, biyokimyasal parametreleri incelenmiştir.

Tuzluluğun dünyada insanlık tarihi boyunca tarım için büyük bir problem olduğu bilinmektedir (Ma et al., 2011). Bu yüzden tuz stresi ile ilgili yapılan çalışmaların asıl amacı, tuzlu koşullarda kültür bitkilerinin veriminin artırılması için tolerans mekanizmalarının geliştirilmesine yöneliktir.

Pamuk, dünya çapında önemli bir tarım ürünüdür. Her ne kadar tuza tolerant kültür bitkilerinden biri olarak sınıflandırılrsa da büyüme ve gelişmesinin tuzluluktan olumsuz yönde etkilendiği bilinmektedir (Maas, 1990; Maas and Hoffman, 1977; Qadir and Shams, 1997; Higbie et al., 2010).

Yapılan çalışmalarda pamuk bitkisi, halofit olmayan fakat orta derecede tuza toleranslı bitki türü olarak bildirilmiştir (Tei&Zeiger, 2008; Maas, 1990). Halofit olmayan pamuk bitkisinin tolere edebildiği tuzluluk miktarı 200-300 mM aralığı olarak bilinmektedir (Greenway&Munns, 1980). Bu bilgiler ışığında elde ettiğimiz sonuçlara göre sınırlayıcı doz 400 mM olarak belirlenmiştir. Çalışmada fizyolojik ve morfolojik parametreler incelenerek, 200 mM tuz konsantrasyonu uygulanan kallus grubunun en son büyüme ve gelişme gösterdiği grup olduğu ve uygulanan en yüksek konsantrasyon olan 400 mM tuz konsantrasyonunun olduğu kallus grubunda her iki çeşidin de büyüme ve gelişmesinin durduğu gözlemlenmiştir.

Çalışmada kallus yapısı, kallus rengi, kallus oluşum oranı, yaş ağırlık, kuru ağırlık miktarı, yaş ağırlığın kuru ağırlığa oranı, kararma yüzdesi büyüme ve gelişme parametreleri olarak incelenmiştir.

In vitro'da tuz stresi ile yapılan çalışmalarda kallus rengi ve yapısının da büyümeye etki eden önemli parametreler olduğu belirtilmiştir (Ganesan&Jayabalan, 2005).

Dayanıklı olduğu bilinen Carmen çeşidine ait kallusların, kontrol ve tuz ortamına maruz bırakıldıkları andan itibaren duyarlı olduğu bilinen NM-503 çeşidine oranla daha fazla karardıkları ve NM-503 çeşidinde yeşil renge ait kallusların daha

yüksek oranda olduğu gözlemlenmiştir. Pamuk bitkisinde tuz stresine maruz bırakılan kallusların kontrol grubunun yeşil ve canlı renklerde olduğu, tuz stresine maruz bırakıldıktan sonra renklerinin kreme/kahverengiye döndüğü gözlemlenmiştir (Ganesan&Jayabalan, 2005). Tuza maruz bırakılan pamuk kalluslarının renk skalası belirlendiği başka bir çalışmada kontrol grubunda açık gri, tuz uygulanan düşük dozlarda sarı/krem rengi, yüksek dozlarda ise kahve rengine sahip olduğu gözlemlenmiştir (Zhang&Zhou, 1999). Tuz uygulamasına maruz kalmadan önce kararma oranları birbirine yakın olan kallusların, tuz stresi konsantrasyonu varlığında renklerinin farklı skalada ve farklı oranlarda olması tuz stresine verdikleri tepkinin çeşide bağlı olarak değişmesi ile açıklanabilmektedir.

Çalışmamızda iki çeşidin de kontrol grubunda kompakt yapıya sahip kallus oranı yüksekken uygulanan tuz konsantrasyonu arttıkça bu oran yerini gevşek kallus yapısına bırakmıştır. Bitki doku kültüründe, bitki üretimi ve rejenerasyonu için somaklonal varyasyon oldukça önemlidir. Varyasyon sıklığı hangi doku kültürü tekniğinin kullanıldığına bağlı olarak değişir. Kallus kültürlerinde ve hücre süspansiyon kültüründe somaklonal varyasyon daha sık görülür. Bu nedenle, tuz toleransı üzerine yapılan *in vitro* seleksiyon çalışmalarında diğer kültürlerden ziyade kallus kültürleri kullanılmaktadır (Chandler and Thorpe, 1986; Dijilianov et al., 2003; Liua et al., 1998; Nabors et al., 1975). Tuz stresine bağlı olarak değişen kallus rengi ve yapısının, somatik embriyo oluşumu ve bitki rejenerasyonunu açıklamada da önemli bir parametre olduğu belirtilmektedir. Embriyogenik kalluslar, parlak ve sarı rengine sahip bir görünüm, kompakt ve küresel yapıları ile karakterize edilirken, embriyogenik olmayan kallus yarı saydam ve daha kahverengimsi renkte olduğu bildirilmiştir (Gandonou et al., 2005). Kontrol grubunda en fazla kompakt kallus oranına sahip olan NM-503 çeşidinin *in vitro* seleksiyon için daha uygun bir çeşit olduğunu söyleyebiliriz.

Yaş ve kuru ağırlık, bitkide tuz stresi etkisinin incelendiği çalışmalarda önemli bir parametre olarak kabul edilmektedir (Pessaraklı, 2014). Tuz stresinin pamuk bitkisinde büyümeyi etkilediğini ve doz arttıkça büyümenin gerilediğini bildirilen çalışmalar bulunmaktadır (İzci, 2009; Oliveira et al.,1998). Kuru ağırlık, ozmotik stres uygulanan bitkiler için ayırt edici bir parametre olarak bilinmektedir ve ozmotik stres altındaki bitkilerin yaş ağırlık maddelerinde azalma olurken, çözülebilir madde birikiminden ötürü kuru ağırlık maddelerinin arttığı görülmüştür (Javed and İkram, 2008). Çalışmamızda kuru ağırlık miktarlarının tüm çeşit ve dozlarda neredeyse aynı

olduğu görülürken kuru ağırlıkların belirgin farklılıkları, yaş ağırlıklarının kuru ağırlıklarına oranlanmasıyla elde edilmiştir. Elde edilen bilgilere göre prolin miktarı ile yaş kuru ağırlıkları oranı birbirleriyle kıyaslandığında yaş ağırlık/ kuru ağırlık miktarının artışının çözünebilir madde miktarıyla doğru orantılı olmadığı görülmektedir. Pamukta 3 farklı çeşitte (Tuza tolerant, orta tolerant ve duyarlı) tuz konsantrasyonuna bağlı olarak yaş ağırlık/kuru ağırlık oranını inceleyen Garratt et al., (2002), bu oranın çeşitlerde doza bağlı olarak korelasyonlu bir şekilde artıp azalmadığını bildirmişlerdir. Bu bilgiler ve veriler ışığında yaş ağırlık/kuru ağırlık oranının, çeşide ve doza bağlı olarak kallusun içerisindeki su miktarının farklı olmasıyla değişebileceği şeklinde açıklanabilir. Çalışmada kontrol ve artan tuz konsantrasyon gruplarında yaş ağırlıkları belirlenen kalluslarda, tuza dayanıklı olduğu bilinen Carmen çeşidinin, kontrol ortamında duyarlı olduğu bilinen NM-503 çeşidine göre daha az büyüme gösterdiği görülmüştür ve tuz ortamındaki artan konsantrasyona bağlı olarak gelişimindeki gerilemesinin ise daha az olduğu gözlemlenmiştir. Bu bilgiler doğrultusunda arazi koşullarında tuzluluğa dayanıklı olduğu bilinen Carmen çeşidinin *in vitro*'da büyüme ve gelişme parametrelerinden elde ettiğimiz sonuçlara göre bitki doku kültürü çalışmalarında uygunluğunun NM-503 çeşidine nazaran daha az olduğunu fakat tuz stresine karşı dayanıklı olmasına bağlı olarak fizyolojik büyüme ve gelişmesinin daha az etkilendiğini söyleyebiliriz.

Bitki büyümesi entegre bir fizyolojik sürecin sonucudur. Fizyolojik süreçler çevresel faktörlerden etkilenir ve bitkilerin strese verdiği cevabı belirler. Fotosentez, fizyolojik sürecin en belirgin özelliğidir. Bitki büyümesine bağlı olan biyokütle üretimi, fotosentezin ölçüsüdür ve dolayısıyla büyümeyi etkileyen çevresel faktörler fotosentezi etkiler. Tuz stresine maruz kalma sonucu bitkinin verdiği yanıt önemlidir. Fotosentetik verim, tuz stresine maruz kalan bitkilerde daha düşüktür, ancak klorofil oranı bakımından ifade edildiğinde fotosentetik potansiyelin tuz stresinden büyük ölçüde etkilenmediği görülmüştür (Parida&Das, 2005). Klorofillerdeki pigment içeriği, bitkinin büyümesi ve verimliliği ile doğrudan ilgilidir (Sabir et al., 2012). Karotenoidler, enerji transferine katılırlar ve reaksiyon merkezini otooksidasyondan korurlar (Duran et al., 2010). Çalışmamızda, tuzluluğa dayanıklı olduğu bilinen Carmen çeşidinde klorofil a ve b miktarı kontrol grubuna göre tuz uygulanan gruplarda azalmış fakat duyarlı olduğu bilinen NM-503 çeşidinde anlamlı bir değişiklik gözlemlenmemiştir. Klorofil b'nin kimyasal yapısında, klorofil a'ninkinden farklı olarak 2. pirol halkasındaki 3. karbon

atomunda aldehit grubu barındırmaktadır. Dekarboksilasyon ve metilasyon tepkimelerinin sonucunda klorofil b, klorofil a'ya dönüşür (Ito et al., 1996). 400 mM tuz uygulanan grupta Carmen çeşidinin klorofil a miktarı azalırken, klorofil b miktarının yükselmesi bununla açıklanabilir. Total klorofil miktarında her iki çeşit için de bir değişiklik olmadığı ve total karotenoid miktarının iki çeşitte de artan tuz konsantrasyonuna bağlı olarak azaldığı görülmüştür. Tuz stresinin pamuk bitkisindeki etkisinin araştırıldığı çalışmalarda, uygulanan tuz konsantrasyonunun miktarı arttıkça klorofil miktarında anlamlı değişmelerin meydana gelmediği, fakat bitkilerde tuz stresinin karotenoid miktarını azalttığına dair sonuçlar bildirilmiştir. Bu sonuçlar kloroplastların pamuktaki süperoksit radikallerine karşı korunmasında savunma hattın oluşturduğunu doğrulamaktadır (Meloni, 2003; Zhang, 2014; Duran et al., 2010). Bu bilgiler doğrultusunda çalışmamızdaki sonuçlar tuz stresine maruz kalan pamuk bitkisinin artan tuz konsantrasyonlarına karşın fotosentetik aktivitesinin etkilenmediğini göstermektedir.

Tuz stresinde, zararlı iyonların düşük konsantrasyonunu korumak ve gerekli iyonların konsantrasyonunu stabil düzeyde tutmak için iyon akışının düzenlenmesi gereklidir. Normal şartlar altında bitki hücresinin sitozolünde, K^+ derişimi yüksek ve Na^+ derişimi seviyeleri düşük tutularak yüksek K^+/Na^+ oranı korunur (Higinbotham.,1973). Tuzlu koşullarda, bitki köklerinde Na^+/K^+ oranı ve Na^+ konsantrasyonu artması hiperozmotik stres, iyon dengesizliği ve toksisite ile sonuçlanır. Bu iyonik dengesizliğin arkasındaki neden, tuzlu koşullarda, Na^+ ve K^+ iyonlarının hidrat formunun benzer hale gelmesi ve K^+ giriş yolunun Na^+ ve K^+ arasında ayırım yapmasını zorlaştırmasıdır. Na^+/K^+ oranını korumak için, tuza toleranslı bitkiler Na^+ 'nın köklerinden akışını azaltır, sitozolde mevcut olan Na^+ 'nın vakuole bölünmesini ve Na^+ 'nın kök hücrelerden akmasını sağlar (Keisham et al. 2018). Uyumlu çözünürler (ozmolitler) gibi davranan metabolitlerin birikimi, bitkilerin ozmotik potansiyelindeki değişikliklere verilen çevresel tepkilerinden biridir. Çözünebilir şeker, kompleks şekerler gibi ozmolit işlevine sahip metabolitler, olumsuz koşullar altında bitkilerde sıklıkla gözlenir. Prolin ve glisin betain gibi uyumlu ozmolitler, makromoleküllerin koruyucuları ve ayrıca stresli koşullar altında ROS temizleyicileri olarak görev yaptığı bilinmektedir (Desingh&Kanagaraj, 2007). Ozmolitlerin, protein yapısını stabilize ederek ya da stres koşullarında üretilen ROS'u temizleyerek makromoleküllerin korunmasında işlev gördüğü bilinmektedir (Mitysik et al., 2002). Prolin, tuzluluk stresi

altında ozmotik bir regülatör ve stres ile ilgili bir sinyal olarak görev yapan baskın bir organik moleküldür. Aynı zamanda hücre ozmoregülasyonunda, dehidrasyon sırasında proteinlerin korunmasında rol oynar ve stres koşullarında enzimatik bir regülatör görevi de görebilir (Rontein ve ark. 2002). Çalışmamızda prolin miktarının tuza dayanıklı olduğu bilinen Carmen çeşidinde, uygulanan tuz dozu arttıkça kontrole göre arttığı görülmüştür. Tuza duyarlı olduğu bilinen NM-503 çeşidinde ise prolin miktarının uygulanan tuz konsantrasyonu artışı ile birlikte azaldığı görülmüştür. Sonuçlarımız pamuk bitkisinin tuza karşı toleransını ozmotik regülasyonlarla sağladığı bilgisiyle paralellik göstermiştir. Tuz stresi uygulanan pamuk bitkisinde tuz düzeyi arttıkça bitkinin tolerans mekanizmasını, antioksidan ve fotosentetik enzimlerle karşılaştırıldığında ozmoprotektanların birikimiyle sağlandığı görülmüştür.

Bitkilerin, tuzluluk stresine maruz kaldıklarında ozmolitler sayesinde protein yapısını stabilize ederek kendini ROS'dan koruduğu bilinmektedir. (Zhu, 2001). Çözülebilir proteinlerin tuz stresi varlığında azaldığı bildirilmiştir (Parida et al., 2005). Fakat pamuk bitkisinde tuzluluğun proteinlere etkisinin çeşide bağlı olarak değiştiği bildirilmiştir (Garratt et al., 2002). Çalışmamızda çözülebilir protein miktarının çeşide ve uygulanan doza bağlı olarak değişmediği görülmüştür. Bu bilgiler ve sonuçlarımız doğrultusunda tuza tolerant olduğu bilinen pamuk bitkisinin tuz stresi varlığında protein yapısının stabil kaldığı ve etkilenmediği görülmektedir.

Reaktif oksijen türlerinin bir formu olan hidrojen peroksit (H_2O_2) oksidatif stresin ürünüdür. Bitkilerde, kloroplastlarda Mehler reaksiyonu ile oluşan süperoksit, SOD enzimi tarafından H_2O_2 'ye dönüştürülür. Mitokondride elektron taşınımı sırasında, peroksizomlarda ise fotorespirasyon sırasında oluşur. H_2O_2 molekülü zardan kolaylıkla geçebilen bir moleküldür (Özdamar ve ark., 2016; Mittler, 2002).

Bitkilerin temel fizyolojik ve hücrel metabolik süreçler esnasında reaktif oksijen türlerini sinyal iletim molekülü olarak kullandıkları bilinmektedir (Blokhina and Fagerstedt 2010). Tuzluluk, bitkiyi ozmotik olarak strese maruz bırakır ve iyon dengesini bozarak çeşitli metabolik olayları etkiler (Abogadallah, 2010). Tuz stresinin, hücrelerde genellikle içinde H_2O_2 'nin de olduğu ROS üretimine sebep olduğu bilinmektedir. H_2O_2 üretiminin regüle edilmesi, bitkinin tuz stresine karşı adaptasyon sağladığı mekanizmalardandır (Avsian-Kretchmer et al. 2004; Zhang et al. 2006; Zhao et al. 2007). Hidrojen peroksit düşük konsantrasyonlarda sinyal molekülü olarak görev

alırken, yüksek konsantrasyonları hücreye hasar verecek ROS oluşumunu tetiklediği için o molekülleri süpürecek etkinlikte olan antioksidanların aktifleştirilmesinde de önemli görev oynar (Ercan, 2008). Çalışmamızda hidrojen peroksit miktarının tuza dayanıklı olduğu bilinen Carmen çeşitinde kontrol grubuna göre tuz uygulanan doz arttıkça azaldığı, tuza duyarlı olduğu bilinen çeşitte ise tuz uygulanan ilk dozdan sonra kontrole göre artış olduğu fakat gruplar arasında önemli bir fark bulunmadığı görülmüştür. Tuz stresi uygulanan pamuk bitkisinde hidrojen peroksit miktarının türlere ve uygulanan doza bağlı olarak değişkenlik gösterdiği ve en fazla değişimin dayanıklı çeşitte olduğu görülmüştür (Garratt et al., 2002). Pamuk bitkisine tuz stresinin etkisinin araştırıldığı başka bir çalışmada ise hidrojen peroksit miktarının tuza dayanıklı ve duyarlı olduğu bilinen her iki çeşitte de tuz dozunun artmasıyla arttığı gözlemlenmiştir (Zhang et al., 2014). Kendi çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar ve literatürdeki bilgiler doğrultusunda, hidrojen peroksidin hücre içi homeostazide sinyal molekülü olarak görev aldığı için mi düşük derişimlerde var olduğunu yoksa enzim aktivitelerinin etkinleşmesi sonucu katalizlenerek başka moleküllere dönüşmesiyle mi derişiminin düştüğünü antioksidan metabolizmayı bütün olarak değerlendirerek açıklayabiliriz.

Tuz stresiyle birlikte reaktif oksijen türleri (ROS) çoklu doymamış yağ asitleri ile etkileşime girerler ve bunun sonucunda lipid peroksil radikaller meydana gelir. Bu radikallerin reaksiyonu sonucunda membran organizasyon bütünlüğünü bozulur ve bu peroksidasyon sonucu MDA (malondialdehit) oluşur. Bu sebeple MDA hücre zarında meydana gelen lipid peroksidasyonunun belirteci olarak bilinmektedir (Keleş, 2019;. Halliwell, 2006; Niki, 1987; Cummins et al., 1994; Dolatabadian et al., 2008). Çalışmamızda MDA miktarının tuza dayanıklı olduğu bilinen Carmen çeşidine uygulanan tuz dozu arttıkça kontrol grubuna göre azaldığı, tuza duyarlı olduğu bilinen NM-503 çeşidinde ise kontrol grubuna göre en yüksek dozun en yüksek MDA miktarına sahip olduğu görülmüştür. Tuz stresi ile alakalı çalışmalarda, tuz stresine maruz kalan bitki dokularında lipid peroksidasyonunun stresin bir göstergesi olduğunu ve ürünü olan MDA'nın, enzim aktiviteleri ile arasında ters bir orantı olduğu bildirilmiştir. Ayrıca, tuz stresine bağlı artan prolin miktarının enzim aktivitesi üzerine etkili olduğundan dolayı MDA miktarını da önemli derecede azalttığı tahmin edilmektedir (Koca, 2007). Tuz stresi uygulanan pamuk bitkisinde (Zhang., 2014) elde edilen MDA miktarlarının tuza duyarlı çeşitte dayanıklı çeşide göre daha fazla olduğunu bildirmişlerdir. Sonuçlarımızın verilen bilgiler ve yapılan çalışmalarla paralel olduğu görülmektedir.

Bitkide antioksidanların aktivitesinin artması, tuz toleransı ile ilişkilidir (Noreen and Ashraf, 2009). Tuz stresi, süperoksit, hidroksil radikali ve hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretilmesine neden olmaktadır. Normal şartlarda ROS, hücre içi antioksidanlar yoluyla nötrleştirilir, tuz stresi altında aşırı ROS birikmesi oksidatif stresi tetikler ve normal metabolizmayı ciddi şekilde bozar, nükleik asitte protein yıkımına ve mutasyona neden olur (Czegeny et al., 2014). Tuzluluk kaynaklı oksidatif hasarı hafifletmek için, bitkiler enzimatik ve enzimatik olmayan iki tip antioksidan sistemi taşır. Enzimatik antioksidan sistemi, glutatyon redüktaz (GR) ve askorbat peroksidaz (APX) enzimlerinin yanı sıra, süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve peroksidazları (POX) içerir. SOD majör antioksidan enzim olarak kabul edilir, çünkü $O_2^{\cdot -}$ ve H_2O_2 konsantrasyonunu düzenler. APX ve CAT, verimli H_2O_2 temizleme kabiliyetini ortaya koymaktadır. SOD varlığında APX ve CAT süpürme işlemi sırasında hayati öneme sahip rol oynarlar (Aleem et al., 2019).

Süperoksit dismutaz (SOD: EC 1.15.1.1), reaktif oksijen türlerine (ROS) karşı ilk savunma hattını ve bitki hücrelerinde ROS toksisitesine karşı antioksidan savunma sisteminin oluştuğu en etkili bileşenleri içeren enzimdir. Süperoksit radikallerini detoksifiye ederek, H_2O_2 molekülünü oluşturur, $OH\cdot$ radikalinin oluşma riskini azaltır ve H_2O_2 konsantrasyonlarını belirlediği için son derece önemlidir (Berwal, 2018). Çalışmamızda SOD aktivitesinin dayanıklı olduğu bilinen Carmen çeşidinde tuz uygulamasıyla birlikte kontrol grubuna göre arttığı, duyarlı olduğu bilinen çeşitte ise değişim olmadığı gözlemlenmiştir. Pamuk bitkisinde, tuz stresinin antioksidan enzim aktivitesi ile ilişkilendirildiği çalışmalarda, uygulanan tuz dozunun artışı ile birlikte dayanıklı çeşitteki SOD aktivitesinin duyarlı çeşide göre daha fazla olduğu ve SOD aktivitesinin duyarlı çeşitte neredeyse değişmediği gözlemlenmiştir (Zhang et al., 2014). Ayrıca pamuk bitkisinde tuzun etkisinin araştırıldığı başka bir çalışmada 100 mM uygulanan tuz grubundaki SOD aktivitesinin dayanıklı çeşitte, duyarlı çeşide göre artış gösterdiği görülmüştür (Rajguru et al., 1999). Yapılan çalışmalar doğrultusunda ve çalışmamızdaki SOD enziminin aktivitesi ile H_2O_2 sonuçları birlikte değerlendirildiğinde H_2O_2 miktarının onu detoksifiye eden enzimlerle azaltıldığı görülmektedir.

CAT enzimi, tuzluluk gibi abiyotik stres koşullarında SOD enziminin süperoksit radikalini katalizlemesiyle oluşan hidrojen peroksiti su ve moleküler oksijene

dönüştürerek yüksek derişimlerde zararlı etkisini azaltan iki enzimden biridir (Berwal, 2018; Aleem et al., 2019). Çalışmamızda tuzluluğa dayanıklı olduğu bilinen Carmen çeşidinin artan tuz dozuna bağlı olarak kontrol grubuna göre CAT enzim aktivitesinin değişmediği fakat en yüksek dozda artış gösterdiği, duyarlı olduğu bilinen NM-503 çeşidinde ise artan tuz dozuna bağlı olarak kontrol grubuna göre azaldığı görülmüştür. Pamuk bitkisi üzerinde tuzun etkisinin araştırıldığı çalışmalarda CAT enziminin, 100 mM tuz uygulamasıyla dayanıklı olduğu bilinen çeşitte kontrol grubuna göre artış gösterdiği, duyarlı olduğu bilinen çeşitte ise değişmediği görülmüştür. Yapılan başka bir çalışmada ise pamuk bitkisinin kök ve yapraklarına uygulanan tuz stresinin kök ve yapraklarda tuz dozu arttıkça CAT aktivitesinin duyarlı ve dayanıklı türün ikisinde de azalttığı görülmüştür (Zhang et al., 2014). Sonuçlarımız ve yapılan çalışmalar CAT aktivitesinin, hem çeşide hem de hidrojen peroksidin zararlı etkisini katalizleyerek azaltan başka antioksidan enzimlere bağlı olduğu görülmektedir.

Peroksidaz (POX) enzimi, abiyotik stres varlığında reaktif oksijen türlerine karşı önemli antioksidan enzimlerden biri olarak bilinmektedir. Bitkinin, maruz kaldığı tuz seviyesinin artması sonucunda POX enziminin aktivitesinde meydana gelen artış abiyotik strese karşı direnç gösterebildiğinin belirtisidir (Duman, 2016). Yapılan çalışmalarda pamuk bitkisinde tuz stresinin enzim aktivitesine etkisi incelendiğinde, POX enzim aktivitesinin pamuk çeşidine göre değişebildiği görülmüştür (Meloni, 2003). POX enzim aktivitesinin tuz stresine bağlı olarak artması, SOD enziminin katalizlediği H_2O_2 'nin parçalanması kabiliyetinin yüksek olduğunu gösterir. Aksi takdirde katalizlenmeyen H_2O_2 , hidroksil radikaline dönüşebilir (Gossett et al., 1994b). Çalışmamızdaki POX enzim aktivite miktarları, pamuk bitkisinde tuz stresinin etkisinin incelendiği araştırmalardaki sonuçlarla paraleldir. Dayanıklı olduğu bilinen Carmen çeşidinde POX enzim aktivitesinin artan tuz konsantrasyonu ile kontrol grubuna kıyasla arttığı, duyarlı olduğu bilinen çeşitte ise değişmediği görülmüştür. Tuz uygulanan pamuk bitkisinde POX enziminin tuza dayanıklı olan çeşitte kontrol grubuna göre aktivitesinin arttığı çalışmalar literatürde bildirilmiştir (Desingh&Karaganaj, 2002; Gossett, 1994). POX enziminin aktivitesinin dayanıklı çeşitte CAT enzim aktivitesindeki miktarlara göre daha fazla olması, pamuk bitkisinde hidrojen peroksit konsantrasyonunun POX enzimiyle katalizlendiğini göstermektedir.

Askorbat peroksidaz, bitkilerde tuz toleransının geliştirilmesinde, H_2O_2 'nin detoksifikasyonunda, askorbik asidin homeostazisi ve hücre içi ROS sinyal ağının dengelenmesinde rol oynayan ROS sisteminin önemli enzimlerden biridir. Askorbat peroksidaz (APX), bitkilerde H_2O_2 'i metabolize eden en önemli enzimlerden biridir. APX, H_2O_2 için daha yüksek bir afiniteye sahiptir ve kloroplastlarda, sitozol, mitokondri ve peroksisomlarda ve ayrıca apoplastik alanda, spesifik elektron donör olarak askorbat kullanarak onu H_2O 'ye indirger (Adriana et al., 2015). Tuzluluğun, süperoksit dismutaz, askorbat peroksidaz, MDHAR, dehidroaskorbat redüktaz ve glutatyona bağlı peroksidaz aktivitelerinde bir artışa neden olduğu bilinmektedir (Parida et al., 2004). Çalışmada pamuk bitkisine ait Carmen çeşidinde askorbat peroksidaz aktivitesinin tuz stresine bağlı olarak kontrol grubuna göre değişmediği duyarlı çeşitte ise en yüksek tuz konsantrasyonu uygulamasıyla artış gösterdiği görülmüştür. Yüksek düzeylerde antioksidanların ve aktif bir askorbat-glutasyon döngüsünün, pamukta tuz toleransı ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Gossett, 1994). Pamuk bitkisinde tuz stresi uygulanan grupların askorbat peroksidaz miktarının kontrol grubuna göre arttığı görülmüştür. Askorbat peroksidazın katalazın erişemediği membranlara ulaşp hidrojen peroksidi katalaza göre daha fazla katalizlediği bilinmektedir (Desingh&Kanagaraj, 2002).

Stres toleransında önemli rol oynayan bir başka antioksidan, süperoksit radikali, hidroksil radikali ve hidrojen peroksit ile reaksiyona girebilen ve böylece serbest radikal temizleyici olarak işlev görebilen glutasyon'dur. Ayrıca askorbat-glutasyon döngüsü ile askorbatın yenilenmesine de katılabilir (Parida et al., 2004). Glutasyon redüktaz, kloroplast, sitozol ve mitokondride yer alan Halliwell-Asada döngüsünün son enzimidir. H_2O_2 'in süpürülmesinde sınırlayıcı bir enzimdir ve askorbatın yeniden üretiminde istenen yüksek GSH/GSSG oranının korunmasında gereklidir (Mittler, 2002). Çalışmamızda glutasyon redüktaz aktivitesinin Carmen çeşidinde uygulanan ilk tuz konsantrasyonunda arttığı, NM-503 çeşidinde ise yüksek tuz konsantrasyonu varlığında aktifleşerek arttığı görülmüştür. Bitkilerin glutasyon redüktaz enziminin tuz stresi altında arttığı bilinmektedir (Parida et al., 2004). Pamukta yapılan çalışmalarda tuz stresinin tuza toleranslı çeşitte glutasyon redüktaz aktivitesinde artışa neden olduğu bildirilmiştir (Gossett et al., 1994, 1996; Rajguru et al., 1999; Desingh&Kanagaraj, 2007). Gossett ve ark. (1994), yüksek düzeylerde antioksidanların ve aktif bir askorbat-glutasyon döngüsünün, pamukta tuz toleransı ile ilişkili olduğunu ileri sürmüştür.

Çeşitlerimizde artan tuz konsantrasyonu varlığında POX enzim aktivitesinin artması ve yüksek konsantrasyonlarda ise APX enzimlerinin CAT enzimine göre artış göstermesinin sebebi bu enzimlerin tuz stresi varlığında CAT enzimine göre daha etkin olması ve etkinliklerinin çeşide ve doza bağlı olarak değişmesi ile açıklanabilir.

Fenolik bileşikler, doğal antioksidanlardır ve bu metabolitlerin seviyeleri, stres altındaki bitkilerin antioksidan savunma sistemi kapasitesinin değerlendirilmesinde kullanılabilir. Bu amaçla, 1,1-difenil-2-pikril hidrazil (DPPH) temizleme aktivitesi ve azaltma gücü deneyleri gibi biyokimyasal parametreler kullanılabilir. DPPH analizi, antioksidanların, oksidatif stresin neden olduğu biyolojik hasarda ana faktör olduğu bilinen serbest radikalleri temizleme yeteneğini değerlendirmenin en kolay, hızlı, hassas ve güvenilir yollarından biridir (Koleva et al., 2002; Huang et al., 2005). Çalışmamızda iki çeşitte de tuz uygulanan ilk ve en düşük doz olan 100 mM tuz uygulanan grupta kontrole göre DPPH aktivitesinde belirgin bir düşüş olduğu ve en yüksek doz olan 400 mM'da bu düşüşün %50'ye ulaştığı gözlemlenmiştir. Dayanıklı olduğu bilinen Carmen çeşidinde DPPH aktivitesine bağlı % inhibisyonun daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Pamuk bitkisinde tuzun etkisinin incelendiği çalışmada DPPH aktivitesinin tuz uygulanan gruplarda %35 azaldığı görülmüştür (Xie et al., 2008). Bu veriler tuzun, iki çeşitte de antioksidan aktiviteyi azaltsa da pamukta antioksidan koruma sisteminin çeşide bağlı olarak değiştiğini göstermektedir.

Çalışmamızda, iki çeşidin de tuz stresine karşı fizyolojik ve morfolojik olarak tepkileri incelendiğinde dayanıklı olduğu bilinen Carmen çeşidinin tuz stresine karşı 200 mM'a kadar NM-503 çeşidine göre ozmotik regülasyon ve antioksidan mekanizmalar ile daha fazla direnç gösterebildiği görülmektedir. Yapılan çalışmalarla paralel olarak çalışmamızda da pamuğun diğer mekanizmalara göre tuz stresini ozmotik regülasyonlarla tolere ettiğini gözlemledik. Tuza dayanıklı olduğu bilinen Carmen çeşidinde artan konsantrasyona bağlı artan prolin birikimi de bunu göstermektedir. Oksidatif stresin belirteci olan MDA miktarının tuza dayanıklı olduğu bilinen Carmen çeşidinde düşük, NM-503 çeşidinde ise yüksek olmasının sebebi Carmen çeşidinin oksidatif stresin zararlı etkisinden antioksidan savunma sisteminin aktifleşerek korunması ile açıklanabilir. Carmen çeşidinde, süperoksit anyonunu hidrojen perokside dönüştüren SOD enzimi aktivitesinin yüksek olmasına rağmen H_2O_2 miktarının düşük, NM-503 çeşidinde ise yüksek olması Carmen çeşidinde POX ve APX enzimlerinin

yüksek aktivite göstererek hidrojen peroksidin zararlı etkisini azaltmasına bağlı olduğu görülmüştür.

Klasik bitki ıslahının temeli olarak bilinen varyasyon ve seleksiyonun, günümüz teknolojisinde karşılığı *in vitro* seleksiyon olarak bilinmektedir. *In vitro* seleksiyonlar, tüm bitki yerine hücre seçimine olanak sağlamaktadır. *In vitro* şartlarda seleksiyonun istenilen bir zamanda gerçekleşebilmesi sebebiyle bitkinin gelişme aşamalarına bağlı olunmaması da önemli bir avantajdır. Bu sebeplerden dolayı, gelecekte yeni çeşitler geliştirmek için biyoteknolojik yöntemlerden önemli ölçüde faydalanılması beklenilmektedir (Emiroğlu ve Gürel, 2005).

Biyoteknolojik çalışmaların sonuçlarının pratiğe dönüştürülmesi ve kullanılabilmesi için pamuk bitkisi diğer bitkiler arasında öncelikli olarak yerini almıştır (İzci, 2007).

6. ÖNERİLER

Çalışmamızda tuzluluğa dayanıklı olduğu bilinen Carmen çeşidinin kalluslarının büyümek üzere besin ortamına alındığı andan itibaren kontrol ve tuz konsantrasyonu uygulanan gruplarında kararına olduğu görülmüştür. Kararmanın besin ortamından mı yoksa bitkinin tuz stresine karşı geliştirdiği bir mekanizma ile mi kararmayı desteklediğini anlamak için besin ortamı içeriğinde farklı tuz ajanları denenebilir. Ayrıca besin ortamı komponentleri de değiştirilerek tuz ajanları ile paralel olarak farklı besin ortamları da denenebilir.

Çalışmamızda analizlenecek olan kalluslar büyüme ortamında 4 hafta süre bekletilip 4 hafta sonunda ise analizlenmek üzere besin ortamından alınmışlardır. Yaptığımız araştırmalar sonucunda pamuk kalluslarının analizi için en uygun optimizasyonun 4 hafta sonunda analizlenmesi olduğunu belirlesek de aynı çalışmanın, farklı zamanlarda (7-14-21.gün) besin ortamlarından alınan kalluslarda yapılan aynı analizlerle gerçekleştirilmesi bize analiz sonuçlarının kallusun olgunluğuna bağlı olarak değişip değişmediği hakkında bilgi vermesi açısından önemli olabilir.

Ayrıca ülkemizde tarımı yapılan Carmen ve NM-503 çeşitleri dışında tuzluluğa dayanıklı ve duyarlı olduğu bilinen başka pamuk çeşitleri de ticari ve ekonomik olarak önem arz etmektedir. Bu çeşitlere ek olarak diğer çeşitlerin de aynı çalışmalara tabi tutulmasının da arazi çalışmalarına ışık tutmak için önemli olduğu düşünülmektedir.

Çalışmamızda tuz stresinin etkisi pamuk kalluslarında fizyolojik, morfolojik ve biyokimyasal olarak incelenmiştir. Tuz stresine karşı dayanıklılık mekanizmasını desteklediğini bilen genlerle de bu çalışmada incelenen parametreler ile paralel olarak çalışılması daha kapsamlı, geliştirilmiş ve yol gösterici bir çalışma olmasını sağlayacaktır.

Ayrıca *in vitro* koşullarda gerçekleştirilen bu çalışmanın daha da geliştirilerek arazi koşullarında aynı çeşitlerin yanı sıra daha fazla çeşit ile *in vitro* ile eş zamanlı olarak gerçekleştirilmesi bu çalışmanın arazi koşullarına yön verip ışık tutmasını daha da güçlendirecektir.

KAYNAKLAR

- Abdel-Raheem, A.T., Ragab, A. R., Kasem, Z.A., Omar, F.D&A. M., Samera., 2007.** *In vitro* Selection For Tomato Plants For Drought Tolerance Via Callus Culture Under PEG and Mannitol Treatments. African Crop Science Conference Proceedings Vol. 8., 2027-2032, p.
- Abdellatef, E., Khalafallah, M., 2008.** Influence Of Growth Regulators On Callus Induction From Hypocotyls Of Medium Staple Cotton (*Gossypium hirsutum* L). Cultivar Barac B-67, J.Soil.Nature. 2 (1):17-22.
- Abogadallah G.M., 2010.** Antioxidative defense under salt stress. Plant Signalling Behaviour, 5: 369– 374, p.
- Adriano Sofo, A., Scopa, A., Nuzzaci, M., Vitti, A., 2015.** Ascorbate Peroxidase and Catalase Activities and Their Genetic Regulation in Plants Subjected to Drought and Salinity Stresses. International Journal of Molecular Sciences, ISSN 1422-0067, 18, p.
- Ahmad, S., Fiaz, S., Riaz, A., Bashir, I., Zeb, A., 2016.** Correlation analysis of morphological and fiber quality traits in upland Cotton (*Gossypium hirsutum* L.), International Journal of Biosciences, ISSN: 2220-6655, Vol. 9, No. 4, Pakistan, 200-208, p.
- Ashraf, M. and S. Ahmad. 2000.** Influence of sodium chloride on ion accumulation, yield components, and fiber characteristics in salt-tolerant and salt-sensitive lines of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). Field Crops Res., 66: 115-127, p.
- Ahsan, Z., Majidano, M., Channa, A., Panhwar, H., Soomro, W., Khaskheli, I., Rashid, K., 2014.** Regeneration of Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) Through Asexual Methods, A Review, American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci., 14 (12): 1478-1486, Pakistan, ISSN 1818-6769, p.

- Akın, G., 2018.** Köpeklerde Yaşlanmanın Enzimatik ve Nonenzimatik Antioksidan Sistem Üzerine Etkisi. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 90, s.
- Akkuş, İ., 1995.** Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. 1. Ed, Konya, Mimoza Basım Yayım ve Dağıtım.
- Akyol, B., 2015,** Pamuk (*Gossypium hirsutum* L.) Anterlerinden in vitro Koşullarda Kallus ve Embriyo Rejenerasyonlarının Sağlanması, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, TÜRKİYE, 134, s.
- Albayrak, H., 2014.** Aydın Merkez İlçesi Pamuk Üretiminde Yetiştirme Koşullarının Verim, Lif ve Tohum Özellikleri Üzerine Etkisi,. Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın, Türkiye, 151, s.
- Aleem, S. I., Farooq, J., Rizwan, M., Younas, A., Sarwar, G., 2019.** Salinity stress in cotton: effects, mechanism of tolerance and its management strategies. *Physiol Mol Biol Plants*.
- Alexieva, V., Sergiev, I. and Karanov, E., 1997.** Effect of spermine, atrazine and combination between them on some endogenous protective systems and stress markers in plants. *Compt Rend Acad Bulg Sci*, 51(3), 121-124, p.
- Alexieva, V., Ivanov, S., Sergiev, I., Karanov, E., 2003.** Interaction between stresses, *Bulgarian Journal of Plant Physiology. Special Issue*, 1-17, p.
- Apel, K., and Hirt, H., 2004.** Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol*, 55; 373–399, p.
- Arasimowicz M, Floryszak-Wieczorek J, Milczarek G, Jelonek T., 2009** Nitric oxide, induced by wounding, mediates redox regulation in pelargonium leaves. *Plant Biology-Stuttgart*, 11, 650-663, p.
- Arnon, D.I., 1949.** Copper enzyme polyphenoloxides in isolated chloroplast in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology.*, 24, 1-15, p.
- Avsian-Kretchmer O., Gueta-Dahan Y., Lev-Yadun S., Gollop R. and Ben-Hayyim G., 2004.** The saltstress signal transduction pathway that activates

the gpx1 pro-moter is mediated by intracellular H₂O₂, different from the pathway induced by extracellular H₂O₂ Plant Physiology, 135: 1685–1696, p.

Aydın, G., 2012. Melisa (*Melisa officinalis* L.) Genotiplerinin İn Vitro ve İn Vivo Koşullarda Tuz Stresine Yanıtlarının Belirlenmesi, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Çanakkale, 100, s.

Aydın, A., 2018. Türkiye’de Tescillenmiş Bazı Ticari Pamuk Çeşitlerinin Moleküler Karakterizasyonu Üzerine Bir Araştırma, Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Antalya Türkiye, 368, s.

Aydın, M.H., Turhan, G., 2009. Rhizoctonia solani’nin fungal antagonistlerinin belirlenmesi üzerinde araştırmalar. Anadolu Journal of Aegean Agricultural Research Institute, 19(2): 49-72, s.

Bakhsh, A., Anayol, E., Türkmen, K, Özcan, S., 2016, The Effect of Improvised Media and Gelling Agents on *In Vitro* Germination of Cotton (*Gossypium hirsutum*. L.), Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi, Niğde, Türkiye, 20(3): 223-229, s.

Bardakçı, Ö., 2017. Bazı Sentetik Antioksidanların 2,2- Difenil-1-Pikrilhidrazil (DPPH) Radikal Süpürme Kapasitesi Yöntemi İle Antioksidan Aktivitelerinin Araştırılması, Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 58, s.

Bates, L. S., Waldren, R.P., Teare, I.D., 1973. Rapid determination of free proline for water- stres studies. Plant and Soil, 39, 205-207, p.

Becker, LB., Vanden, Hoek TL., Shao, ZH., Li,CQ., Schumacker, PT., 1999. Generation of superoxide in cardiomyocytes during ischemia before reperfusion. Am J Physiol; 277: 2240-2246, p.

Beauchamp, C. and Fridovich, I., 1971. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical biochemistry*, 44(1), 276-287, p.

Benzie, I., 2000. Evolution of antioxidant defence mechanisms. *Eur. J. Nutr.*, 39:53-61, p.

- Bergmeyer, H.U. and Gawehn, K., 1970.** *Methoden der enzymatischen Analyse* (Vol. 432). Weinheim: Verlag Chemie.
- Berwal, K. M., Ram, C., 2018.** Superoxide Dismutase: A Stable Biochemical Marker for Abiotic Stress Tolerance in Higher Plants. *Abiotic and Biotic Stress in Plants*.
- Bildiren, Ş., 2018.** Tuz Stresi Altına Farklı Buğday (*Triticum aestivum* L.) Genotiplerinde Bor Uygulamalarının İyileştirici Etkisinin Araştırılması, Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Sakarya, 137, s.
- Bilgili, E., Yılmaz, H., Akkoyun, S., Vurarak, Y., Gül, M., 2018.** Factors Affecting Cotton Production Decisions Of Farmers: Eastern Mediterranean Region, Turkey, *Scientific Papers Series Management, Economic Engineering in Agriculture and Rural Development* Vol. 18, Issue 2, PRINT ISSN 2284-7995, p.
- Blokhina O. and Fagerstedt KV., 2010.** Reactive oxygen species and nitric oxide in plant mitochondria: origin and redundant regulatory systems. *Physiologia Plantarum*, 138:447–462, p.
- Bora, M., 2014.** Değişik Vejetasyon Dönemlerine Kadar Uygulanan Farklı Tuz Konsantrasyonlarının Biberde Meydana Getirdiği Fizyolojik, Morfolojik ve Kimyasal Değişikliklerin Belirlenmesi. Namık Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 96, s.
- Bradford, M.M., 1976.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254, p.
- Brand-Williams, W., M. E. Cuvelier, and C. Berset, 1995.** Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technol.* 28, 25–30, p.
- Büyük, İ., Soydam Aydın, S., Aras, S., 2012.** Bitkilerin stres koşullarına verdiği moleküler cevaplar. *Türk Hij Den Biyol Derg*: 2012; 69(2), 4, s.

- Cai, Y., Luo, Q., Sun, M. and Corke, H. 2004.** Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sci*, 74; 2157–2184, p.
- Cakmak, I. and Horst, W.J., 1991.** Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). *Physiologia Plantarum*, 83(3), 463-468, p.
- Carlberg, I., Mannervik, B., 1985.** Glutathione reductase, *Methods in Enzymology*, 113, 484 490.
- Chakravarthy, V., Reddy, T., Dashavantha, V., Rao, R&K., 2014.** Current status of genetic engineering in cotton (*Gossypium hirsutum* L): an assessment, an assessment, *Critical Reviews in Biotechnology*, 34:2, 144-160, p.
- Chandler, S.F. and Thorpe, T.A., 1986.** "Variation from plant tissue cultures: Biotechnological application to improving salinity tolerance", *Biotechnology Advances* vol: 4(1):117-135, p.
- Chaudiere, J., Ferrari-Iliou, R., 1999.** Intracellular Antioxidants: From chemical to biochemical mechanisms. *Food and Chemical Toxicology*, 37: 949-962, p.
- Cheeseman KH, Slater TF., 1993** An introduction to free radical biochemistry. *British Medical Bulletin*, 49(3), 481-93, p.
- Cummins, J.M., Jequier, A. M. And Kan R., 1994.** Molecular biology of human male infertility: links with aging, mitochondrial genetics, and oxidative stress, *Mol. Reprod. Dev*, 37, 345-362, p.
- Çanakçı, S., 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*, Cilt 24, Sayı1, 23-40, 7, s.
- Çaylak, E., 2011.** Hayvan ve bitkilerde oksidatif stres ile antioksidanlar. Çankırı Karatekin Üniversitesi, Çankırı. Tıp Araştırmaları Dergisi: 9 (1) : 73-83, 10, s.

Çetin, D., Çelik, İ., 2012. Antalya Bölgesinde Pamuk Yetiştiriciliğinin Durumu ve Bazı Sorunlarına Genel Bir Bakış, Selçuk Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi, 26(4), ISSN: 1309-0550, 68-72, s.

Çetinkaya, A., 2013. Antioksidanların Reaktif Oksijen Türleri Tüketimiyle Cuprac Antioksidan Kapasitesi Arasındaki İlişki, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 71, s.

de Azevedo Neto , A.D., Prisco, J.T., Filho, J.E., Abreu, B., & Filho, G.E., 2006. Effect of salt stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of salt-tolerant and salt-sensitive maize genotypes. Environmental and Experimental Botany, 56, 87–94, p.

Demiral, T., & Türkan, İ., 2005. Comparative lipid peroxidation, antioxidant defense systems and proline content in roots of two rice cultivars differing in salt tolerance. Environmental and Experimental Botany, 53, 247-257, p.

Diego A. Meloni, D, A., Oliva, M, A, Martinez, C, A., Cambraia, J., 2003. Photosynthesis and activity of superoxide dismutase, peroxidase and glutathione reductase in cotton under salt stress. Environmental and Experimental Botany, 69-76, p.

Dinç, R., 2017. Çukurova Koşullarında Bazı Pamuk (*Gossypium Hirsutum* L.) Çeşitlerinde Ekim Zamanının Verim Üzerine Etkileri, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya, Türkiye, 54, s.

Dixon, D.P., Cummins, L., Cole, D.J., Edwards, R. 1998. Glutathione-mediated detoxification systems in plants. Current Opinion in Plant Biology, 1: 258-266, p.

Djilianov, D., Els, P., Öden, S., Öncülen, H.V., Muller, J., 2003. "Nodulation under salt stress of alfalfa lines obtained after *in vitro* selection for osmotic tolerance", *Plant Science* 165: 887-894, p.

Doğan, M., 2012. Azot Uygulamasının Tuz Stresi ve Antioksidan Enzim Aktivitesine Etkisi, Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 16-3, 297-306, s.

Doğru, A. 2006. Kolza (*Brassica napus* L. ssp.)' oleifera nın bazı kışlık çeşitlerinde düşük sıcaklık toleransı ile ilgili fizyolojik ve biyokimyasal parametrelerin araştırılması. Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Bölümü Doktora Tezi.

Dolatabadian A, Sanavy SAMM, Chashmi NA. The effects of foliar application of ascorbic acid (Vitamin C) on antioxidant enzymes activities, lipid peroxidation and proline accumulation of Canola (*Brassica napus* L.) under conditions of salt stress. Journal of Agronomy and Crop Science. 2008;194:206–213, p.

Duman, A, Y., Acemi, A., Toygar, H., Yüzügüllü, Y., Özen, F., 2017. Tuz Stresi ve BAP Varlığında *Amsonia orientalis*'in Antioksidan Enzimlerinin İncelenmesi. CBÜ Fen Bil. Dergi., Cilt 12, Sayı 3, 543-551, s.

Duran, E, R., Coskun, Y., Savaskan, Ç., 2010. Tuzun Makarnalık Bugday Genotiplerinde (*Triticum durum* Desf.) Bazı Kalitatif ve Kantitatif Özellikler Üzerine Etkisi. Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 14-1,17-22, p.

Eida, A., Alzubaidy, H., Zélicourt1, A., Synek, L., Alsharif, W., Lafi, F., Hirt, H., Saad, M., 2019. Phylogenetically diverse endophytic bacteria from desert plants induce transcriptional changes of tissue-specific ion transporters and salinity stress in *Arabidopsis thaliana*, Plant Science, 280, 228-240, p.

Ekmekçi, E., Apan, M., Kara, T., 2005. Tuzluluğun Bitki Gelişimine Etkisi, OMÜ Zir. Fak. Dergisi, J. of Fac. of Agric. 20(3):118-125, s.

Ellialtıoğlu, Ş., Tıprıdamaz, R., 1998. Doku kültürünün tuz stresine dayanıklılıkta kullanımı. Bitkilerde Stres Fizyolojisinin Moleküler Temelleri Sempozyumu, 22-26 Haziran, E.Ü. Ziraat Fakültesi, E.Ü. Bilim–Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi, Bornova – İzmir, 234 s.

Elliot, JG., 1999. Application of antioxidant vitamins in foods and beverages. *Food Technology*, 53(2), 46-48, p.

- Ercan, O., 2008.** Effect Of Drought And Salt Stresses On Antioxidant Defense System And Physiology Of Lentil (*Lens culinaris* M.) Seedling, The Graduate School Of Natural And Applied Sciences Of Middle East Technical University, 126, p.
- Finch, R.P., Slamet, I.H. and Cocking, 1990.** Production of heterokaryons by the fusion of mesophyll protoplasts of *Porteresia coarctata* and cell suspension derived protoplast of *Oryza sativa*: a new approach to somatic hybridization of rice. J. Plant Physiol. 136: 592-598, p.
- Finkelstein, R., Gampala, S, S, L., Rock, C, D., 2002.** Absciscic Acid Signaling in Seeds and Seedlings. Plant Cell. 2002; 14(Suppl): 30, p.
- Flora, S.J., 2007.** Role of free radicals and antioxidants in health and disease. Cell Mol Biol; 53: 1-2.
- Foyer, C., Noctor, N., 2011.** Ascorbate and Glutathione: The Heart of the Redox Hub., Centre for Plant Sciences, Faculty of Biology, University of Leeds.
- Gao, H.J., Yang, H.Y., Bai, J.P., Liang, X.Y., Lou, Y., Zhang, J.L. ve Chen, Y.L., 2015.** Ultrastructural and physiological responses of potato (*Solanum tuberosum* L.) plantlets to gradient saline stress, Frontiers in Plant Science, 5, 787.
- Garratt, L, C., Janagoudar, S, B., Lowe, C, J., 2002.** Salinity Tolerance and Antioxidant Status in Cotton Cultures, Free Radical Biology & Medicine, Vol. 33, No. 4, 502–511, p.
- Gandonou, C., Abrini, J., Idomar, M., Senhaji, S, N., 2005.** Response of sugarcane (*Saccharum sp.*) varieties to embryogenic callus induction and *in vitro* salt stress. African Journal of Biotechnology Vol. 4 (4), 350-354, p.
- Ganesan, M., Jayabalan, N., 2005.** Carbon source dependent somatic embryogenesis and plant regeneration in cotton *Gossypium hirsutum* L. cv. SVPR2 through suspension cultures. Indian Journal of Experimental Biology, Vol, 43, 921-925, p.

- Gaspar, T. Franck, T., Bisbis, B., Kevers, C., Jouve, L., Hausman, J.F., Dommes, J., 2002.** Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures. *Plant Growth Regulation*, 37(3), 263-285, p.
- Gehlöt, H. S., Pur ohit A., Shekhawat, N. S., 2005.** Metabolic Changes and Protein Patterns Associated With Adaptation to Salinity in *Sesamum indicum* Cultivars. *Journal of Cell and Molecular Biology*, 4:31- 39, p.
- González, A., Steffen, K.L., Lynch, J., 1998.** Light and excess manganese: Implications for oxidative stress in common bean, *Plant Physiology*, 118, 493-504, p.
- Greenway, H., Munns, R., 1980.** Mechanisms Of Salt Tolerance in Nonhalophytes. *Ann. Rev. Plant Physiology*-31,149-90, p.
- Güneş, G., 2014.** Ankara Etrafindan Toplanan Bazı Bitki Ekstrelerinin Total Antioksidan Kapasiteleri ve Antioksidan Enzim Aktiviteleri Üzerine Etkileri, *Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, 93, s.
- Güngör, N., Knaapen, AM., Munnia, A., 2010.** Genotoxic effects of neutrophils and hypochlorous acid. *Mutagenesis*; 25:149-154, p.
- Gürel, A. ve Sezener, V. 2012.** Recent Devolepments in Cotton Breeding and Biotechnology Fields in Turkey, International Cotton Advisory Committee. (<https://www.icac.org/wp-content/uploads/2012/11/01-ICAC-Antalya-Sunu-1-5-SON.pdf>).
- Haq, I., 2005.** Callus proliferation and somatic embryogenesis in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *African Journal of Biotechnology* Vol. 4 (2), 3, p.
- Halliwell, B., 2006.** Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology*, 141, 312–322, p.
- 42
- Halliwell, B., Gutteridge, JMC., 1984.** Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemical Journal*, 219, 1-14, p.
- Halliwell, B., Gutteridge JMC., 1989.** Free radicals inbiology and medicine. 2nd ed. *Oxford: Clarendon Press*, 188-196, p.

- Halliwell, B., 1991.** Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *The American Journal of Medicine*, 30, 91(3C), 14-22, p.
- Harbinson, J., Hedley, C., 1993.** Changes in P-700 oxidation during the early stages of the induction of photosynthesis. *Plant Physiol*; 103: 649–60, p.
- Hernandez, J. A., Olmos, E., Sevilla, F., & Hellin, E., 1994.** Induction of several antioxidant enzymes in the selection of a salt-tolerant cell line of *Pisum sativum*. *Journal of Plant Physiology*, 144(4-5), 594-598, s.
- Herzog, V., Fahimi, H.D., 1973.** A new sensitive colorimetric assay for peroxidase, using 3,3- diaminobenzidine as hydrogen donor, *Analytical Biochemistry*, 55, 554-562, p.
- Hsu, S.Y., Kao, C.H., 2003.** The protective effect of free radical scavengers and metal chelators on polyethylene glycol-treated leaves. *Biologia Plantarum*, 46: 617-619, p.
- Huang, D., Ou, B., Prior, R.L., 2005.** The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agr Food Chem* 53: 1841-1185, p.
- Ito, H., Ohtsuka, T. and Tanaka, A., 1996.** Conversion of chlorophyll b to chlorophyll a via 7-hydroxymethyl chlorophyll. *Journal of Biological Chemistry*, 271(3), 1475-1479, p.
- İzci, B., 2009.** Pamukta (*G. hirsutum* L.) Farklı Tuz Konsantrasyonlarının *In Vitro* Koşullarda Fotosentetik Pigmentler Üzerine Etkisi. *Alinteri*, 17 (B), ISSN:1307-3311, 7-13, p.
- Jebara, S., Jebara, M., Limam, F., & Aouani, M. E., 2005.** Changes in ascorbate peroxidase, catalase, guaiacol peroxidase and superoxide dismutase activities in common bean (*Phaseolus vulgaris*) nodules under salt stress. *Journal of plant physiology*, 162(8), 929-936, p.
- Karanlık, S., 2001.** Değişik buğday genotiplerinde tuz stresine dayanıklılık ve dayanıklılığın fizyolojik nedenlerinin araştırılması. Adana, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

- Karakuş, M., 2008.** Farklı Tuz Stresi Koşullarında Prolin Uygulamalarının Patateste Fizyolojik ve Morfolojik Özelliklere Etkileri, Harran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 110, s.
- Karakaş, Pehlivan, F., 2016.** Kavuzlu Siyez (*Triticum monococcum* ssp. *monococcum*) ve Ekmeklik (*Triticum aestivum* L) Buğdaylarda Kurak ve Tuz Stresinin Erken Fide Gelişimi ve Antioksidan Aktivite Üzerine Etkisi. Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi, 2016, 25 (1):107-116, s.
- Kasnak, C., Palamutoğlu, R., 2014** Doğal Antioksidanların Sınıflandırılması ve İnsan Sağlığına Etkileri, ISSN: 2148-127X, 10, s.
- Kavas, Ö., 1989.** Serbest radikaller ve organizma üzerine etkileri. *Türkiye Klinikleri*, 9(1), 1-8, p.
- Keleş, B., 2019.** *In Vitro* Kültür Koşulları ve Tuzluluk (NaCl) Stresi Altında Çimlendirilen Aspir (*Carthamus tinctorius* L.) Bitkisinde Meydana Gelen Morfolojik, Fizyolojik ve Biyokimyasal Değişimler. Batman Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 61, s.
- Khan, M., Khan, M., Khan, A., Cheema , M., Khan, S., 2018.** Genetic Studies for Morphological and Fiber Quality Traits in Upland Cotton (*Gossypium hirsutum* L.), Pakistan Council for Science and Technology, ISSN 0254-6418, p.
- Kılavuz, A., 2006.** Artan Dozlarda Tuz ve Fosfor İle Mikoriza Uygulamasının Nohut (*Cicer arietinum* L.) Bitkisinde Verim, Azot, Fosfor ve Potasyum İçeriğine Etkisi. Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Van, 32s.
- Kıran, S., Kuşvuran, Ş., Ozkay, F., Ozgun, Ö., Sönmez, K., Özbek, H., Ellialtıoğlu, Ş., 2015.** Bazı Patlıcan Anaçlarının Tuzluluk Stresi Koşullarındaki Gelişmelerinin Karşılaştırılması, Tarım Bilimleri Araştırma Dergisi 8 (1): 20-30, s.
- Koca, N., Karadeniz, F., 2003.** Serbest Radikal Oluşum Mekanizmaları ve Vücuttaki Oluşum Mekanizmaları ve Vücuttaki Antioksidan Savunma

Sistemleri, Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Gıda Mühendisliği Dergisi, Sayı: 16, 6, s.

- Koca, H., 2007.** Tuz Stresinin Farklı Susam Çeşitlerinin Fizyolojik ve Biyokimyasal Özellikleri Üzerine Etkisi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, 148, s.
- Koleva, II., Van Beek, TA., Linssen, JPH., 2002.** Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. *Phytochem Analysis* 13: 8-17, p.
- Koubaa, R., Charfeddine, S., Ellouz, W., Saidi, M., Drira, N., Gargouri-Bouid, R., Nouri-Ellouz, O., 2015.** Investigation of the response to salinity and to oxidative stress of interspecific potato somatic hybrids grown in a greenhouse, *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 120: 14, p.
- Köken, İ., 2017.** Ege Bölgesine Uygun Pamuk Çeşitlerinde Verim ve Kalite Özelliklerinin Belirlenmesi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, 78, s.
- Korkmaz, H., Durmaz, A., 2017.** Bitkilerin Abiyotik Stres Faktörlerine Verdiği Cevaplar. *GÜFBED/GUSTIJ.*, 7 (2), 15, s.
- Köse, H., 2015.** Tuz Stresinin Farklı Mısır ve Sorgum Bitkilerinin Gelişimi Üzerine Etkisi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, 72, s.
- Köşkeröğlu, S., 2006.** Tuz Stresi Altındaki Mısır Bitkisinde (*Zea mays* L.) Prolin Birikim Düzeyleri ve Stres Parametrelerinin Araştırılması. Muğla Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Muğla, 120, s.
- Kuşvuran, Ş., Yaşar, F., Abak, K., Ellialtıoğlu, Ş., 2007.** Tuz Stresi Altında Yetiştirilen Tuza Tolerant ve Duyarlı *Cucumis* sp.'nin Bazı Genotiplerinde Lipid Peroksidasyonu, Klorofil ve İyon Miktarlarında Meydana Gelen Değişimler. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarım Bilimleri Dergisi (J. Agric. Sci.)*, 2008, 18(1): 13-20, s.
- Ledford, H.K., Chin, B.L., Niyogi, K.K., 2007.** Acclimation to singlet oxygen stress in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryotic Cell*, 6: 919-930, p.

- Lloyd, R., Hanna, P., Mason, R., 1997.** The origin of the hydroxyl radical oxygen in the Fenton reaction. *Free Radical Biology & Medicine*, 22(5), 885-888, p.
- Liu, T., Stern, A., Roberts, L., 1999.** The isoprostanes: Novel prostaglandin-like products of the free radical catalyzed peroxidation of arachidonic acid. *Journal of Biomedical Science*, 6, 226–35, p.
- Liua, P., Baob, W., 1998.** "Cell types in the wild type callus of rice (*Oryza sativa* L.) as revealed by screening for salt tolerant lines with selection pressure", *Plant Science* 131 195-202, p.
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., Chandra, N., 2010.** Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*, 4(8), 118–126, p.
- Ma, X., Dong, H., Li, W., 2011.** Genetic improvement of cotton tolerance to salinity stress. *African Journal of Agricultural Research* Vol. 6 (33), 6, p.
- Marschner, H. 1995.** Mineral nutrition of higher plants. Academic Press, New York, 60, 379-396, p.
- Mansouri, A., Muller, FL., Liu, Y., Ng, R., Faulkner, J., Hamilton, M., Richardson, A., Huang, T-T., Epstein, CJ., Remmen, HV., 2006.** Alterations in mitochondrial function, hydrogen peroxide release and oxidative damage in mouse hind-limb skeletal muscle during aging. *Mechanisms of Ageing and Development*; 127(3), 298-306, p.
- McCord, J., 2000.** The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am. J. Med.*, 108: 652-659, p.
- Mittler, R., 2002.** Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *TRENDS in Plant Science*, 7, no.9.
- Mitysik, J., B. Alia, P. Mohanty, 2002.** Molecular mechanism of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants. *Current Sci.*, 82, 525-532, p.

- Moller, IM., Jensen, PE., Hansson, A., 2007.** Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annu Rev Plant Biol*, 58: 459-81, p.
- Mostofa, M.G., Hossain, M.A. ve Fujita, M., 2015.** Trehalose pretreatment induces salt tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings: oxidative damage and co-induction of antioxidant defense and glyoxalase systems, *Protoplasma*, 252, 2, 461–475, p.
- Munns, R., 1993.** Physiological processes limiting plant growth in saline soils: Some dogmas and hypotheses. *Plant Cell Environ.* (16) 15-24, s.
- Munns, R., 2002.** Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Environ.* (25) 239-250, s.
- Munns, R. and Tester, M., 2008.** Mechanisms of salinity tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.* (59), 30, p.
- Murray, R., Granner, D., Mayes, P., Rodwell, V., 1996** Harper'in Biyokimyası 24. baskı, (Çev: Dikmen N., Özgünen T.), Barış Kitabevi, İstanbul.
- Nabors, M.W., Daniels, A., Nadolny, L., Brown, C., 1975.** "Sodium chloride tolerant lines of tobacco cells". *Plant Science Letters*, vol 4(3):155-159, p.
- Nappi, AJ., Vass, E., 1998.** Hydroxyl radical formation via iron-mediated Fenton Chemistry is inhibited by methylated catechols. *Biochim Biophys Acta*, 1425, 159–67, p.
- Nayyar, H., Gupta, D., 2006.** Differential sensitivity of C3 and C4 plants to water deficit stress: Association with oxidative stress and antioxidants. *Environmental and Experimental Botany*, 58, 106–113,p.
- Nishikimi, M., Yagi, K., 1996.** Biochemistry and molecular biology of ascorbic acid biosynthesis. *Subcell Biochem* 25: 17–39, p.
- Niki, E., 1987.** Antioxidant in relation to lipid peroxidation. *Chemistry and Physics of Lipids*, 44(2-4), 227-253, p.

Oliveira, F. D., Campos, T. D., Oliveira, B. C., 1998. Effect of saline substrate on germination, vigor and growth of herbaceous cotton. *Engenharia Agric* 18(2):1–10, p.

Osswald, W., Kraus, R., Hippeli, S., Benz, B., Volpert, R. and Elstner, E., 1992. Comparison of enzymatic activities of dehydroascorbic acid reductase, glutathione reductase, catalase, peroxidase and superoxide dismutase of healthy and damaged spruce needles (*Picea abies* L.). *J. Plant Physiol.*, 139: 742- 748, p.

Özcan, O., Erdal, H., Çakırca, G., 2015. Yönden, Z., Oksidatif stres ve hücre içi lipid, protein ve DNA yapıları üzerine etkileri, *Journal of Clinical and Experimental Investigations*, 5, p.

Özdamar, F. Ö., Furtana, B. G., Ellialtıoğlu., Tıpırdamaz, R., 2016. Hidrojen Peroksit ve Nitrik Oksit İlişkisinin Bitkilerde Abiyotik Stres Toleransındaki Rolü. *Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 2016, 25 (1):117-131, s.

Parida, K. A., Das., A. B., 2005. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 60 (2005) 324–349, p.

Parida, K., Veerabathini, S., Kumari, A., Agarwal, P., 2015. Physiological, Anatomical and Metabolic Implications of Salt Tolerance in the Halophyte *Salvadora persica* under Hydroponic Culture Condition, *Frontiers in Plant Science*, Volume 7, 18, s.

Parihar, P. Singh, S., Singh, R., Singh, P., Prasad, M., 2014. Effect of salinity stress on plants and its tolerance strategies: a review, *Environ Sci Pollut Res* 22:4056–4075, s.

Pekşen, S., 2014. Arpa’da Kök Büyümesi, Antioksidatif Enzim Aktivitesi ve Lipid Peroksidasyonu Üzerine Arsenik’in Etkisi. *Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı*, Edirne, 71, s.

Peng, T., Yu, P., Chen, J., Wang, H., Wu, H., Wei, Y., Jou, M., 2006. Visualizing common deletion of mitochondrial DNA-augmented mitochondrial reactive oxygen species generation and apoptosis upon oxidative stress. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1762(2), 241-255, p.

- Percy, M.E., 1984.** Catalase: an old enzyme with a new role? A review. *Can. J. Biochem. Cell. Biol.* 62: 1006-1014.
- Powers, S., Lennon, S.L., 2000.** Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. *Proc. Nutr. Soc.*, 58: 1025-1033, p.
- Rai, M.K., Rajwant, K.K., Singha, Rohtas., Gangolaa, C., Dhawan, A.K., 2011.** Developing stress tolerant plants through *in vitro* selection—An overview of the recent progress. *Environmental and Experimental Botany* 71, 89–98, p.
- Rajguru, N, S., Banks, W, S, Gossett, D, R, Lucas, C, M., 1999.** Antioxidant Response to Salt Stress During Fiber Development in Cotton Ovules. *The Journal of Cotton Science* 3:11-18, p.
- Reddy, M.P., Vora, A.B., 1986.** Changes in pigment composition, Hill reaction activity and saccharides metabolism in bajra (*Pennisetum typhoides* S&H) leaves under NaCl salinity. *Photosynthica*, 20: 50-55, p.
- Renu, M, Goswami. C.L., 1995.** Response of chloroplastic pigments to NaCl and GA-3 during cotton cotyledonary leaf growth and maturity. *Agric Sci Dig* 15(3):146–150, p.
- Rezende, R., Rodrigues, F., Soares, J., Silveira, H., Dias, M., 2018.** Salt stress and exogenous silicon influence physiological and anatomical features of *in vitro*-grown cape gooseberry, *Ciência Rural*, Santa Maria, Brazil, ISSN 1678-4596.
- Rajeswari, S., Muthuramu, S., handirakala, R., Thiruvengadam, V., Raveendran, T, S., 2010.** Callus Induction, Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration In Cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Electronic Journal of Plant Breeding*, 1(4): 5, p.
- Rontain, D., G. Basset, A.D. Hanson, 2002.** Metabolic engineering of osmoprotectant accumulation in plants. *Met. Eng.*, 4, 49-56, p.
- Sabir, F., Sangwan, S, R., Kumar, R., Sangwan, S, N., 2012.** Salt Stress-induced Responses in Growth and Metabolism in Callus Cultures and Differentiating

In Vitro Shoots of Indian Ginseng (*Withania somnifera* Dunal), J Plant Growth Regul, 31:537–548, p.

Saleh, B., 2012. Salt stress alters physiological indicators in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). Soil Environ. 31(2): 113-118, p.

Salisbury, F.B., Ross, C.W., 1992. Plant Physiology, Wadworth Publishing Company, California.

Semerci, A., Çelik, A., 2019. Economic Analysis of Cotton Production in Turkey: A Case Study of Hatay City, Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology, 7(2), 246-252, p.

Sewelam, N., Kazan, K., Schenk, M, P., 2012. Global Plant Stress Signaling: Reactive Oxygen Species at the Cross-Road., Frontiers in Plant Science, 7:187, 21, p.

Shalata, A., Tal, M., 1998. The effect of salt stress on lipid peroxidation and antioxidant the leaf of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *lycopersicon pennellii*. Physiologia plantarum, 169-174, p.

Shams, M., 2019. Tuz Stresinin Biberde Bitki Gelişimi, Fizyolojik ve Biyokimyasal Özellikler, DNA Metilasyonu ile Tohum Çimlenmesi Üzerine Etkisi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Erzurum, 156, s.

Shannon, M, C. 1984. Breeding, selection, and the genetics of salt tolerance. In: Salinity tolerance in plants. (Eds.): R.C. Staples and G.H. Toeniessen. Jhon Wiley & Sons, New York. pp. 231- 254.

Sharp, EN., Rupper, P., Miller, TA., 2008. The structure and spectra of organic peroxy radicals. Phys Chem Chem Phys;10: 3955-3981, p.

Skorzynska-Polit, E., Drazkiewicz, M., Krupa, Z., 2003. The activity of the antioxidative system in cadmium-treated *Arabidopsis thaliana*. Biol Plant. 47: 71-8, p.

- Şen, A., 2005.** Buğday (*Triticum aestivum* L.) Doku Kültüründe Tuz Stresinin Etkileri, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 100, s.
- Şahin, B., Akçalı, T, C., 2016.** Farklı NaCl Konsantrasyonlarının Bazı Pamuk Çeşitlerinin Çimlenmesi Üzerine Etkisi. Mustafa Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, Hatay. Uluslararası Tarım ve Yaban Hayatı Bilimleri Dergisi (UTYHBD), 2016, 2(2): 75 – 79, s.
- Talaat, N.B., 2015.** Effective Microorganisms Improve Growth Performance and Modulate the ROS-Scavenging System in Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Plants Exposed to Salinity Stress, Journal of Plant Growth Regulation, 34, 1, 35–46, p.
- Teiz, L., Zeiger, A., 2008.** Bitki Fizyolojisi. (Çev. İ. Türkan), Palme Yayıncılık, Ankara, 690, s.
- Ulukan, H., 2007.** Klasik Bitki Islahı ve Genetik Mühendisliği Kullanılarak Oluşturulan Değişimlere Genel Bir Bakış., Uludağ Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Dergisi, Cilt 21, Sayı 2, 27-40, s.
- Wang, B., Zhang, M., Fu, M., Qian, X., Rong, P., Zhang, Y., Jiang, P., Wang, J., Lu, X., Wang, D., Ye, W., Zhu, X., 2015.** Epigenetic mechanisms of salt tolerance and heterosis in Upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) revealed by methylation-sensitive amplified polymorphism analysis, School of Life Sciences, Nantong University, Jiangsu, China.
- Wang, N, Qiao, W, Xiaohong, L., Jianbin, S., Qinghua, X., Zhou, H., Yan, G, Huang, Q., 2017.** Relative contribution of Na^+/K^+ homeostasis, photochemical efficiency and antioxidant defense system to differential salt tolerance in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) cultivars. Plant Physiology and Biochemistry, 10, p.
- Weimberg, R., 1988.** Modification of foliar solute concentrations by calcium in two species of wheat stressed with sodium chloride and/or potassium chloride. Physiologia Plantarum, 73: 418- 425, p.

- Willcox, J., Ash, S., Catignani, G., 2004.** Antioxidants and prevention of chronic disease. Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44, 275–295, p.
- Ülkü, Z., 2014.** Zygophyllum Fabago L.'nün Lipid Peroksidasyon, Antioksidan Enzimler ve Prolin İçeriği Üzerine Tuz Stresinin Etkileri, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya, 102, s.
- Xie, Z., Duan, L., Tian, X., Wang, B., Eneji, E, A, Li, Z., 2008.** Coronatine alleviates salinity stress in cotton by improving the antioxidative defense system and radical-scavenging activity. *Journal of Plant Physiology* 165, 375-384, p.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, MTD., Mazur, M and Telser, J., 2007.** Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39, 44-84, p.
- Yan, L.J., Sohal, RS., 1998.** Mitochondrial adenine nucleotide translocase is modified oxidatively during aging. *Proc Natl Acad Sci U S A*;95:896-901, p.
- Yang, Y., Han, C., Liu, Q., Lin, B., Wang, J., 2008.** Effect of drought and low light on growth and enzymatic antioxidant system of *Picea asperata* seedlings. *Acta Physiol Plant*; 30: 433-40, p.
- Yaşar, F., 2003.** Some of antioxidant enzyme activity investigation as in vivo and *in vitro* of eggplant genotypes under salt stress. Doctoral dissertation, PhD Thesis, University of Yuzuncu Yıl, Van.
- Yavaşer, R., 2011.** Doğal ve Sentetik Antioksidan Bileşiklerin Antioksidan Kapasitelerinin Karşılaştırılması, Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 124, s.
- Yediyıldız, A., 2008.** Kuraklık ve Tuz Stresi Uygulanan Buğday (*Triticum aestivum*) Çeşitlerinde Antioksidant Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi, Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kayseri, 85, s.

- Yeo, A.R., Flowers, T.J., 1993.** Soil mineral stresses. Approaches to crop improvement. Springer, Berlin, Heidelberg, New York. 218, p.
- Yıldız, M., Terzi, H., 2013.** Effect of NaCl Stress on Chlorophyll Biosynthesis, Proline, Lipid Peroxidation and Antioxidative Enzymes in Leaves of Salt-Tolerant and Salt-Sensitive Barley Cultivars. Journal Of Agricultural Sciences-19, 79-88, p.
- Yılmaz, Ş., 2015.** Tuz ve Kuraklık Stres Koşullarına Maruz Bırakılan *Phaseolus Vulgaris* L. (Fasulye) Bitkisinde Giberellik Asit Uygulamasının GABA ve Antioksidan Savunma Sistemine Etkisinin Belirlenmesi. Aksaray Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 61, s.
- Yılmaz, Ş., Gül, M., 2016.** İşletmelerde Pamuk Üretim Tekniği ve Girdi Kullanım Durumu: Antalya İli Örneği, Türk Tarım-Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi, 4(5): 384-394, s.
- Zhao M.G., Tian Q.Y. and Zhang W.H., 2007.** Nitric oxide synthase dependent nitric oxide production is associated with salt tolerance in Arabidopsis. Plant Physiology, 144: 206–217, p.
- Zhang, B., Zhou, Y., 1999.** Effects of NaCl Stress on Cotton Tissue Culture and Plant Regeneration. Cotton Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Anyang, Henan.
- Zhang, L., Song L., Ding W., Zhao M., Sun B., 2006.** Nitric oxide protects against oxidative stress under heat stress in the calluses from two ecotypes of reed. Plant Science, 171: 449–458, p.
- Zhang, L., Ma, H., Chen, T., Pen, J., Yu, S. ve Zhao, X., 2014.** Morphological and physiological responses of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) plants to salinity, Plos One, 9, 11, p.
- Zhu, J.K., 2001.** Plant salt tolerance. Trends Plant Sci., 6, 66-71.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca ilminden faydalandığım, insani ve ahlaki değerleri ile örnek edindiğim, yanında çalışmaktan onur duyduğum ve ayrıca tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu hoşgörü ve sabırdan dolayı değerli hocam Prof. Dr. Aynur GÜREL'e

İkinci danışmanım olarak analizlerim sırasında bana yol gösteren çok değerli Prof. Dr. Lale Yıldız AKTAŞ ve laboratuvar öğrencilerine,

Hayatımda her zaman önemli yere sahip olan, bu tez çalışması süresince beni maddi-manevi destekleyen sevgili anne, baba, kardeşlerim ile birlikte anneannem ve dedeme,

Yüksek Lisans çalışmamdaki analizlerimde deneyimlerini benimle paylaşan Cem DİRLİK ile çalışmalarım esnasında bana yardımcı olan arkadaşlarım Ezgi AYDIN, Nurberat ÇETİN, Hacer KANDEMİR, Senem ŞEN ve Bitki Doku Kültürü Laboratuvarındaki tüm ekip arkadaşlarıma,

Bana tez aşamamda moral verip anlayış gösteren aynı evi paylaştığım arkadaşlarım Nursena SELÇUK ve Zeynep ALİMİSOĞLU'na, varlığını hep yanımda hissettiğim Sinem Sarı, Sevda DEMİRCAN, Sevinç DOĞAN'a, İzmir'de her zaman bana destek olan Aşkın KURTULAN ve Egemen TAYLAN'a,

Çalışmalarımı bitirmemde emeği geçen özellikle Prof. Dr. Esin Hameş'in laboratuvarı olmak üzere tüm Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Laboratuvarlarına,

Ege Üniversitesi İdari ve Mali İşler Daire Başkanlığı, Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü'ne (BAP-19, 20040 no'lu proje) katkılarından dolayı teşekkür ederim.

ÖZGEÇMİŞ

Melis SAÇU

Doğum Yeri-Tarihi: AVCILAR-04/10/1993

E-posta: melissacu93@gmail.com

Telefon: 0538 844 92 48

Deneyim Bilgisi:

-01/07/2013-01/09/2012: Satış Danışmanı-De Facto Ozon Giyim A.Ş- Satış Danışmanı

-25/07/2014-12/09/2014: Kalekim Kimyevi Maddeler Sanayi ve Ticaret A.Ş- Stajyer

-08/09/15-13/12/08/16: Sudesan Temizlik Ürünleri ve Ambalaj San ve Tic A.Ş-Kalite Güvence (Mikser Analiz-Hat Kontrol)

-15/08/16-15/10/16: Erte Kozmetik- Üretim Sorumlusu

-3/11/16-1/08/17: Koton (Point Bornova)-Satış Danışmanı

-02/12/2019- Devam : Soyak İlaç A.Ş-Kalite Güvence Sorumlusu

Eğitim:

Yüksek Lisans: Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji ABD (Bitki Doku Kültürü) (2017-2019)

Lisans:	Dokuz Eylül Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü	2011-2015
----------------	---	-----------

Lise:	Sabancı 50.Yıl Lisesi	2007-2011
--------------	-----------------------	-----------

Tamamlanmış tezler:

SAÇU, M., MAK, M., (2015). Yakı Otu Olarak Bilinen Epilobim Parviflorium Bitkisinin Antioksidan Kapasitesinin Belirlenmesi Lisans bitirme tezi. Dokuz Eylül Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü. Danışman: Prof.Dr. Leman TARHAN.

Yayınlar:

- Yakı Otu Olarak Bilinen Epilobim Parviflorium Bitkisinin Antioksidan Kapasitesinin Belirlenmesi (Tez Çalışmasının Poster Sunumu) 21.05.2015, DEÜ Fen Fakültesi.

Sertifikalar:

- 6.Ulusal Kimya Öğrenci Kongresi (Kimyagerler Derneği-Ege Üniversitesi,2015)

- ISO / IEC 17025 Deney ve Kalibrasyon Laboratuvarlarının Yeterliliği için Genel gereksinimler katılım sertifikası (2015)
- 5.Ulusal Kimya Öğrenci Kongresi (Kimyagerler Derneği-İstanbul Üniversitesi,2014)
- HPLC Eğitimi Katılım Belgesi (2014)
- XRD Eğitimi Katılım Belgesi (2014)
- Cv Hazırlama ve Mülakat Teknikleri Eğitimi Sertifikası (Runway Kariyer-2014)
- Ulusal Kariyerimin Kimyası (Yıldız Teknik Üniversitesi,2013)
- 3.Kozmetik Kimyası Kongresi (Antalya, 2013)

Bilgisayar:

- Microsoft Office (Word, Excel, Power Point)
- Adobe Photoshop Programı
- SPSS
- Minitab

Seminerler :

- Işık ve kimya öyküleri-Prof.Dr.Yavuz Ataman (2014)
- Kariyer günleri "*Dalan-Aris-Dyo-Kosse Composite-Runway*" '(Düzenleme Kurulu-2014)