

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

**Ceviz Çeşitlerinin Tuza Tolerans Durumlarının Belirlenmesi ve
Cevizde Tuz Stresi ile İlgili Genlerin RNA Sekanslaması ile
Ortaya Çıkarılması**

Mesut ADA

Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

Temmuz, 2025

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZ ONAYI

**Ceviz Çeşitlerinin Tuza Tolerans Durumlarının Belirlenmesi ve
Cevizde Tuz Stresi ile İlgili Genlerin RNA Sekanslaması ile
Ortaya Çıkarılması**

Mesut ADA

Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

Bu Doktora Tezi 19/06/2025 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Değerlendirilmiş ve
Oy Birliği / Oy Çokluğu ile Kabul Edilmiştir.

Jüri	: Prof. Dr. Salih KAFKAS	(Danışman)	
	: Prof. Dr. H. Yıldız DAŞGAN		
	: Prof. Dr. Hayriye İBRİKÇİ		
	: Doç. Dr. Hayat TOPÇU		
	: Doç. Dr. Müjgan GÜNEY		

Bu Tez Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalında Hazırlanmıştır.

Tez No:

Prof. Dr. Sadık DİNÇER
Enstitü Müdürü

Bu çalışma Bap Birimi Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: FDK-2021-12777

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

İÇİNDEKİLER

ÖZ	I
ABSTRACT.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
ÇİZELGELER DİZİNİ	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VI
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	VIII
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	7
2.1. Ceviz Ağaçlarında Tuzluluk Stresi İle İlgili Çalışmalar	7
2.2. Diğer Meyve Ağaçlarında Tuzluluk Stresi İle İlgili Çalışmalar	10
2.3. Ceviz Ağaçlarında Tuzluluk Stresi Koşullarında RNA-Seq ile İlgili Yapılan Çalışmalar.....	13
2.4. Diğer Meyve Ağaçlarında Tuzluluk Stresi Koşullarında RNA-Seq ile İlgili Yapılan Çalışmalar	14
3. MATERYAL VE METOD	17
3.1. Materyal.....	17
3.1.1. Ceviz Çeşitlerinin Tohumlarının Katlamaya Alınması	17
3.1.2. Çimlendirme Ortamının Hazırlanması ve Ceviz Çeşitlerine Ait Tohumların Ekimi	18
3.1.3. Çimlenen Ceviz Tohumları İçin Fidan Torbası Ortamının Hazırlanması ve Şaşırtma İşleminin Yapılması	19
3.2. Metod.....	20
3.2.1. Fidanların Tuz Stresine Maruz Bırakılmaları.....	20
3.2.2. Fidanlarda Tuz Stresi ve Uygun Doz Seviyesinin Belirlenmesine Yönelik Analizler	21
3.2.3. Fidanlarda Tuz Stresi ve Uygun Doz Seviyesinin Belirlenmesinin Ardından Toleranslı ve Hassas Ceviz Çeşitlerinde Tuzluluk Stresine Yönelik Analizler	23
3.2.4. Yaprak Örneklerinin Alınması ve RNA izolasyonu.....	31
3.2.5. Kütüphane Oluşturma ve RNA Sekanslama	33
3.2.6. Biyoinformatik Analizler	34
3.2.7. RNA-Seq Datasının Validasyonu.....	35
3.2.8. Farklı Ekspresyona Olan Genlerin qPCR ile Validasyonu	36
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	39
4.1. Ceviz Çeşitlerinin Tuza Tolerans Durumlarının Belirlenmesi	39
4.1.1. Bitki Boyu (cm).....	39
4.1.2. Yaprak Sıcaklığı (°C)	42

4.1.3. Klorofil İçin Spad Değerleri.....	44
4.1.4. Genotiplerin Görsel Olarak Skala İle Değerlendirilmesi	46
4.1.5. Yaprak Sayısı (adet/ bitki)	49
4.1.6. Yaprak Oransal Su İçeriği.....	51
4.1.7. Kök Kuru Madde Miktarı.....	52
4.1.8. Canlılık Oranları.....	55
4.1.9. İkinci Yıl Denemesi İçin Genotip Seçim Kriterleri.....	59
4.2. Seçilen Toleranslı ve Hassas Ceviz çeşitlerinin 2. Yıl tuza tolerans durumlarının belirlenmesi.....	60
4.2.1. Klorofil İçin Spad Değerleri	60
4.2.2. Yaprak Sıcaklığı (°C).....	60
4.2.3. Yaprak Alanı (cm ²)	64
4.2.4. Yaprak Kuru Madde Miktarı	66
4.2.5. Yaprak Sayısı (adet/bitki)	68
4.2.6. Yaprak Oransal Su İçeriği.....	70
4.2.7. Yaprak Ozmotik Su Potansiyeli	72
4.2.8. Yaprak Su Potansiyeli.....	74
4.2.9. Yaprakta Potasyum (K), Sodyum (Na), Kalsiyum (Ca) ve Klor (Cl) Konsantrasyonu	76
4.2.10. Prolin Miktarı.....	80
4.2.11. Yaprak Hücrelerinde Membran Zararlanmasının Belirlenmesi (%)	82
4.2.12. İkinci Yıl Bulgularının Değerlendirilmesi ve RNA-Seq Analizi İçin Genotip Seçim Kriterleri.....	84
4.3. RNA Sekanslama Bulguları ve Tartışmaları.....	84
4.3.1. Referans Ceviz Genomuna Haritalama Sonuçları.....	85
4.3.2. Gen İfade Analizi	86
4.3.3. Korelasyon Analizi.....	88
4.3.4. Farklı İfade Olan Genlerin (DEG) Tespiti	89
4.3.5. DEG Venn Diyagramı	94
4.3.6. Tuzluluk Stresi ile Bağlantılı Genlerin Belirlenmesi	95
4.3.7. Tuzluluk Stresi ile Bağlantılı Genlerin Gen Ontology (GO) Analizi İle İşlevlerinin Belirlenmesi.....	99
4.3.8. Farklı Eksprese Olan Genlerin qPCR İle Validasyonu	105
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	113
5.1. Sonuç	113
5.2. Öneriler	115

KAYNAKLAR	119
ÖZGEÇMİŞ	133



Ceviz Çeşitlerinin Tuza Tolerans Durumlarının Belirlenmesi ve Cevizde Tuz Stresi ile İlgili Genlerin RNA Sekanslaması ile Ortaya Çıkarılması

Mesut ADA

Danışman: Prof. Dr. Salih KAFKAS

Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

ÖZ

Ceviz (*Juglans regia* L.), toprak ve sulama suyundaki tuzluluğa karşı yüksek düzeyde duyarlılık gösteren bir türdür. Bu çalışma, ceviz genotiplerinin tuz stresine karşı morfolojik, fizyolojik ve moleküler düzeydeki tepkilerini iki yıl boyunca (2021–2022) değerlendirmek amacıyla yürütülmüştür. İlk yıl, 21 genotip dört farklı NaCl konsantrasyonuna (75, 150, 225 ve 300 mM) maruz bırakılmıştır. Artan tuz konsantrasyonları bitkisel gelişim parametrelerinde genel bir azalmaya yol açmış; ancak bu azalmaların genotipe özgü farklılıklar taşıdığı belirlenmiştir. ‘Serr’ çeşidi, tüm uygulamalarda yüksek bitki boyu, yaprak sayısı, yaprak oransal su içeriği (RWC) ve kök kuru madde miktarı ile ön plana çıkarken; ‘Sölez-1’ çeşidi yüksek SPAD değeri ve %100 canlılık oranıyla dikkat çekmiştir. Buna karşın, ‘Fernor’ çeşidi, artan tuz düzeylerinde yüksek yaprak sıcaklığı, düşük SPAD ve RWC değerleri ve %41’e kadar gerileyen canlılık oranı ile en hassas genotip olarak tanımlanmıştır.

Bu bulgular doğrultusunda, ‘Serr’, ‘Sölez-1’ ve ‘Maraş-18’ çeşitleri toleranslı; ‘Fernor’, ‘Chandler’ ve ‘Hartley’ ise duyarlı olarak sınıflandırılmıştır. İkinci yılda, bu altı çeşit 150 mM NaCl konsantrasyonu altında morfolojik, fizyolojik ve iyonik yönleriyle incelenmiştir. ‘Serr’ çeşidi, yüksek RWC, geniş yaprak alanı, daha az negatif ozmotik potansiyel, yüksek prolin düzeyi ve sınırlı $\text{Na}^+ - \text{Cl}^-$ birikimi ile birlikte yüksek $\text{K}^+ - \text{Ca}^{2+}$ düzeylerini koruyarak güçlü bir iyonik denge sağlamıştır. Buna karşın, ‘Fernor’ genotipi, iyon dengesizliği ve su ilişkilerindeki bozulma ile yüksek düzeyde stres duyarlılığı göstermiştir.

Tuz stresine karşı genetik yanıtları ortaya koymak amacıyla, toleranslı ‘Serr’ ve hassas ‘Fernor’ ceviz çeşitleri kullanılarak RNA-Seq analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu analizler sonucunda toplam 14.153 yeni transkript tanımlanmış ve 150 mM NaCl uygulaması altında diferansiyel olarak ifade edilen 161 aday gen tespit edilmiştir. Gen Ontology (GO) sınıflandırması doğrultusunda bu genlerin iyon taşınımı, ozmotik denge, oksidatif stres yanıtı ve sinyal iletimi gibi önemli biyolojik süreçlerde görev aldığı belirlenmiştir.

RNA-Seq bulgularının doğrulanması amacıyla biyolojik işlev açısından öne çıkan 12 aday gen seçilmiş, bu genlere yönelik 14 spesifik primer çifti tasarlanarak kantitatif gerçek zamanlı PCR (qPCR) analizleri gerçekleştirilmiştir. Yapılan qPCR analizleri sonucunda, yedi genin ifade düzeyleri RNA-Seq verileri ile yüksek oranda uyum göstermiştir. Özellikle, prolin biyosentezinde görev alan *LOC108990701* geninin tuz stresi altında anlamlı şekilde yukarı regüle olduğu ve bu durumun ozmotik adaptasyonda önemli rol oynadığı belirlenmiştir. Ayrıca, iyon taşınımı ve stomatal hareketlerin düzenlenmesinde görevli *LOC108995962* geninin ifadesinde artış gözlenmiş ve bu genin iyonik dengeyi korumada etkili olduğu düşünülmüştür. Oksidatif stresle ilişkili *LOC108990546* ile hücrel redoks homeostazında görev alan lipoksigenaz kodlayan *LOC109012163* genleri de diferansiyel olarak ifade edilmiş ve bu genlerin qPCR ile doğrulanan ifadeleri, RNA-Seq sonuçlarıyla güçlü bir paralellik sergilemiştir.

Sonuç olarak, bu çalışma cevizde tuzluluk stresine karşı gelişen çok düzeyli adaptif yanıtları ortaya koymakta ve moleküler ıslah çalışmalarında değerlendirilebilecek önemli aday genleri tanımlamaktadır.

Anahtar Kelimeler: Ceviz, *J. Regia*, Tuz Stresi, RNA-Seq

CUKUROVA UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

PhD THESIS

**Determination of salt tolerance levels of walnut cultivars and
identification of genes responsible for salt stress in walnut by
RNAseq analysis**

Mesut ADA

Advisor: Prof. Dr. Salih KAFKAS

Department of Horticulture

ABSTRACT

Walnut (*Juglans regia* L.) is highly sensitive to salinity stress, posing a significant challenge for sustainable cultivation under increasing soil and water salinity. This study aimed to evaluate the morphological, physiological, and molecular responses of walnut genotypes to salt stress over two consecutive years (2021–2022). In the first year, 21 genotypes were subjected to four NaCl concentrations (75, 150, 225, and 300 mM). Morphophysiological assessments revealed significant reductions in growth parameters with increasing salinity, though genotypic variations were evident. The genotype ‘Serr’ maintained the highest plant height, leaf number, relative water content (RWC), and root dry weight across all salt treatments, while ‘Sölez-1’ showed the highest SPAD value, leaf number, and 100% survival rate. Conversely, ‘Fernor’ exhibited the most severe symptoms under salt stress, including elevated leaf temperature, decreased RWC and SPAD values, and a survival rate reduced to 41% under 300 mM NaCl.

Based on these findings, ‘Serr’, ‘Sölez-1’, and ‘Maraş-18’ were classified as salt-tolerant, while ‘Fernor’, ‘Chandler’, and ‘Hartley’ were categorized as sensitive. In the second year, these six genotypes were further evaluated under 150 mM NaCl. ‘Serr’ maintained favorable physiological traits, including high RWC, broader leaf area, less negative osmotic potential, increased proline accumulation, limited Na⁺ and Cl⁻ accumulation, and elevated K⁺ and Ca²⁺ levels, indicating effective ion homeostasis. In contrast, ‘Fernor’ displayed disrupted water relations and ionic imbalance under stress.

RNA-Seq analyses were performed using *Serr* (salt-tolerant) and *Fernor* (salt-sensitive) walnut genotypes to elucidate transcriptional responses under 150 mM NaCl-induced salt stress. A total of 14,153 novel transcripts were identified, and differential gene expression (DGE) analysis revealed 161 candidate genes potentially associated with salt stress response. Functional categorization of these genes through Gene Ontology (GO) enrichment analysis indicated significant enrichment in biological processes such as ion transport, osmotic adjustment, oxidative stress mitigation, and signal transduction pathways. To validate RNA-Seq results, 12 candidate genes were selected based on their putative functional relevance, and 14 specific primer pairs were designed for quantitative real-time PCR (qPCR) analysis. The qPCR validation confirmed consistent expression trends with RNA-Seq data for seven genes. Notably, *LOC108990701*, encoding Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase (P5CS), was significantly upregulated under salt stress and implicated in proline biosynthesis and osmotic adjustment. Similarly, *LOC108995962*, associated with transmembrane potassium transport and stomatal regulation, exhibited increased expression, suggesting its role in maintaining ionic balance. *LOC108990546*, a gene involved in oxidative stress response, and *LOC109012163*, encoding a lipoxygenase enzyme linked to cellular redox homeostasis, were also differentially expressed and demonstrated strong correlation between qPCR and transcriptomic data.

In conclusion, this study provides a comprehensive understanding of the multilevel responses of walnut to salinity and identifies promising candidate genes for molecular breeding aimed at improving salt tolerance in walnut.

Keywords: Walnut, *J. regia*, Salt Stress, RNA-Seq

TEŞEKKÜR

Çalışmamın belirlenmesinden başlayarak, her aşamasında ve her konuda bana yardımcı olan, daima yapıcı, eğitici ve öğretici olan Sayın Hocam Prof. Dr. Salih KAFKAS'a sonsuz teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Tezimin her aşamasında yakın ilgi ve desteğini esirgemeyen Sayın Hocam Prof. Dr. F. Nurgül TÜREMİŞ'e, bana her zaman yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. N. Ebru KAFKAS'a ve Doç Dr. Hayat TOPÇU'ya en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam boyunca tez izleme jürileri, Bahçe Bitkileri Bölümü öğretim Üyesi Prof. Dr. H. Yıldız DAŞGAN'a ve Toprak Bilimi ve Bitki Besleme Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. Hayriye İBRİKÇİ'ye teşekkür ederim. Tezimin değerlendirilmesinde ve ilerlemesinde yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Müjgan GÜNEY'e teşekkür ederim.

Tezim süresince bana destek veren Prof. Dr. Okan ÖZKAYA'ya, Doç Dr. Harun KARCI'ya, Doç. Dr. Aykut BURGUT'a, Doç. Dr. Murat GÜNEY'e, Dr. Ayşegül BURGUT'a, Dr. Öğr. Üy. Ömer Faruk BİLGİN'e, Ar. Gör. Ebru KURT'a, Ar. Gör. Dr. Boran İKİZ'e, Tekniker Doğan ERGÜN'e, Zir. Yük. Müh. İrem BİÇER'e, Zir. Yük. Müh. Tuğçe TEMTEK'e, Zir. Yük. Müh. Burak ÖZGÖREN'e, Zir. Yük. Müh. Cihan AKGÖL'e ve moleküler genetik laboratuvarındaki arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Doktoramın başlangıcından sonuna kadar benim yanımda olan, kızım Reyhan Cemre ADA'ya, oğlum Onur Alp ADA'ya, sevgili eşim Dr. Öğr. Üy. Melike ADA'ya ve aileme sonsuz teşekkür ederim.

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. 2023 Yılı Ülkeler Bazında Dünya Ceviz Üretimi Alanları ve Miktarları	1
Çizelge 3.1. Katlamaya Alınan Ceviz Çeşitleri ve Tohum Sayıları.....	17
Çizelge 3.2. Fidan torbalarına aktarılan ceviz tohumlarının sayıları	20
Çizelge 3.3. Primer3 web Aracı Kullanılarak Oluşturulan Primerlerin İsimleri ve Baz Dizisi 5'-3' ...	35
Çizelge 3.4. High Capacity cDNA RT Kit (Applied Biosystems) ile oluşturulan cDNA PCR döngü koşulları	36
Çizelge 3.5. Real Q Plus 2X Master Kit (Ampliqon, Denmark) ile oluşturulan RT-qPCR döngü koşulları	37
Çizelge 4.1. Farklı ceviz çeşitlerinde tuz dozlarının bitki boyu üzerine etkisinin değerlendirilmesi ...	40
Çizelge 4.2. Farklı ceviz genotiplerinde 4 farklı tuz dozunun yaprak sıcaklığına etkisinin değerlendirilmesi	42
Çizelge 4.3. Farklı ceviz genotiplerinin 4 farklı tuzluluk konsantrasyonunda klorofil içeriğinin SPAD değerleri üzerindeki değişimi	45
Çizelge 4.4. Farklı ceviz çeşitlerinin 4 farklı tuz dozunda görsel olarak skala ile değerlendirilmesi ..	47
Çizelge 4.5. Farklı ceviz genotiplerinin 4 farklı tuz konsantrasyonun yaprak sayısı üzerine etkisinin değerlendirilmesi	49
Çizelge 4.6. Farklı ceviz genotiplerinin 4 farklı tuzluluk konsantrasyonunun yaprak oransal su içeriği üzerine etkisinin değerlendirilmesi.....	52
Çizelge 4.7. Farklı ceviz genotiplerinin 4 farklı tuz dozunun kök kuru madde miktarı üzerine etkisinin değerlendirilmesi.....	54
Çizelge 4.8. Farklı ceviz genotiplerinin 4 farklı NaCl dozunun canlılık oranı üzerine etkisinin değerlendirilmesi	56
Çizelge 4.9. Toleranslı ve Hassas ceviz çeşitlerinin 150 mM NaCl uygulamasının klorofil için Spad değeri üzerine etkisi	60
Çizelge 4.10. Toleranslı ve Hassas ceviz çeşitlerinin 150 mM NaCl uygulamasının yaprak sıcaklığı üzerine etkisi	63
Çizelge 4. 11. Toleranslı ve Hassas ceviz çeşitlerinin 150 mM NaCl uygulamasının yaprak alanı üzerine etkisi	65
Çizelge 4. 12. Toleranslı ve Hassas ceviz çeşitlerinin 150 mM NaCl uygulamasının yaprak kuru madde miktarı üzerine etkisi.....	67
Çizelge 4. 13. Toleranslı ve Hassas ceviz çeşitlerinin 150 mM NaCl uygulamasının yaprak sayısı üzerine etkisi	69

Çizelge 4. 14. Toleranslı ve Hassas ceviz çeşitlerinin 150 mM NaCl uygulamasının yaprak oransal su içeriği üzerine etkisi.....	71
Çizelge 4.15. Toleranslı ve Hassas ceviz çeşitlerinin 150 mM NaCl uygulamasının yaprak ozmotik su potansiyeli üzerine etkisi.....	73
Çizelge 4.16. Toleranslı ve Hassas ceviz çeşitlerinin 150 mM NaCl uygulamasının yaprak su potansiyeli üzerine etkisi	75
Çizelge 4.17. Toleranslı ve Hassas ceviz çeşitlerinin 150 mM NaCl uygulamasının yaprakta Potasyum (K), Sodyum (Na), Kalsiyum (Ca) ve Klor (Cl) konsantrasyonu üzerine etkisi.....	78
Çizelge 4.18. Toleranslı ve Hassas ceviz çeşitlerinin 150 mM NaCl uygulamasının prolin miktarı üzerine etkisi.....	80
Çizelge 4.19. Toleranslı ve Hassas ceviz çeşitlerinin 150 mM NaCl uygulamasının yaprak hücrelerinde membran zararlanmasının belirlenmesi üzerine etkisi.....	82
Çizelge 4.20. Temiz okuma kalite ölçümleri	85
Çizelge 4.21. Genom Haritalamasının Sonuçları	86
Çizelge 4.22. Gen haritalama Oranının Özeti	87
Çizelge 4.23. Gen ve Transkript istatistikleri.....	88
Çizelge 4.24. Tuzluluk Stresi ile Bağlantılı Genlerin Kimliği, Adı, Kromozomdaki Yeri, Başlangıç-Bitiş Pozisyonu	97
Çizelge 4.25. Gen Ontology sistematığındeki genlerin ve gen ürünlerinin işlevleri (NCBI)	100
Çizelge 4.26. Genlerin Primer Listesi ve Fonksiyonel Özellikleri.....	106

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. Ceviz tohumlarının katlamaya alınması ve katlamaya alınan ceviz tohumlarının depodaki görünümü.....	18
Şekil 3.2. Viyollere doldurulacak ortamın hazırlanması	18
Şekil 3.3. Viyollerin doldurulması ve katlamadan çıkarılan ceviz tohumunun görünümü	19
Şekil 3.4. Toprak : Nevşehir Pomzası: Çiftlik Gübresi (2:1:0.5) Ortamı ve Fidan Torbalarının Doldurularak Plastik Seraya Konulması	19
Şekil 3.5. Viyollerde çimlenen ceviz tohumlarının fidan torbalarına şaşırtılması.....	20
Şekil 3.6. Ceviz fidanlarına tuz uygulama dozları ve uygulama tarihleri.....	21
Şekil 3.7. SPAD Metre ile Klorofil Ölçümünün yapılması	23
Şekil 3.8. Sölez-1, Serr, Maraş-18, Chandler, Fernor ve Hartley ceviz çeşitlerine ait tohumların Nevşehir pomzası dolu ortamda katlamaya alınmasının görünümü.....	24
Şekil 3.9. Tohumların Fidan Torbasına Şaşırtılması ve Cansuyu İşleminin Yapılması	24
Şekil 3.10. Tohumların çimlenmesi ve tuz uygulaması yapılacak bitkilerin belirlenmesi (Sarı: 150 mM – Mavi: Kontrol (0 mM)).....	25
Şekil 3.11. Denemede belirlenen cevizlere tuz uygulamasının (150 mM NaCl) yapılması.....	25
Şekil 3.12. SPAD Metre ile Klorofil Ölçümünün yapılması.....	26
Şekil 3.13. Yaprak ozmotik potansiyelinin belirlenmesi ile ilgili hazırlıklar ve Ozmometre Cihazının Görünümü	27
Şekil 3.14. Yaprak oransal su içeriğinin belirlenmesi ile ilgili çalışmalar.....	28
Şekil 3.15. Yaprak hücrelerinde membran zararlanmasının belirlenmesi ile ilgili yapılan analizden görünüm	28
Şekil 3.16. Yaprak Su Potansiyelinin Ölçümünün Yapılması	29
Şekil 3.17. Denemede Yer Alan Bitkiye Ait Yaprakların Tarandıktan Sonraki Durumu	29
Şekil 3.18. Prolin analizinin yapılma aşamaları	30
Şekil 3.19. Na, K, Ca elementlerinin konsantrasyonlarının belirlenmesi	30
Şekil 3.20. Cl Elementinin Konsantrasyonunun Belirlenmesi	31
Şekil 3.21. RNA izolasyonu için örneklerin alınması işlemi	32
Şekil 3.22. RNA izolasyonu yapılacak yaprak örneklerinin sıvı azotta ezilmesi.....	32
Şekil 3.23. RNA'ların kalitelerinin % 0.5'lik agaroz jeldeki görüntüsü.....	33
Şekil 3.24. Beijing Genomics Institute (BGI) tarafından gerçekleştirilen süreçlerin şematik genel görünümü	34

Şekil 4.1. Sölez-1, Serr ve Maraş-18 ceviz çeşitlerine ait tohumlarının tuz uygulaması yapıldıktan sonraki görünüşleri, (Siyah: 300 mM – Yeşil: 225 mM – Sarı:150 mM – Kırmızı: 75 mM – Mavi: 0 mM)	58
Şekil 4.2. Chandler, Fernor ve Hartley ceviz çeşitlerine ait tohumlarının tuz uygulaması yapıldıktan sonraki görünüşleri, (Siyah: 300 mM – Yeşil: 225 mM – Sarı:150 mM – Kırmızı: 75 mM – Mavi: 0 mM)	59
Şekil 4.3. Örnekler Arası Korelasyon Analizi (X ve Y eksenini her bir numuneyi temsil etmektedir. Renk, korelasyon katsayısını temsil eder (koyu renk ne kadar yoğunsa, korelasyon yüksek, renk ne kadar açıksa, korelasyon o kadar düşüktür)).	89
Şekil 4.4. Fernor_kontrol ve Fernor_150mM, Fernor_kontrol ve Serr_kontrol, Fernor_150mM ve Serr_150mM, Serr_kontrol ve Serr_150mM DEG'lerin özeti	90
Şekil 4.5. Fernor_kontrol grubu ile Fernor_150mM NaCl uygulamalarına ait DEG'lerin A) Volcano plot, B) MA grafiği ve C) Heatmap	91
Şekil 4.6. Fernor_150mM NaCl grubu ile Serr_150mM NaCl uygulamalarına ait DEG'lerin A) Volcano plot, B) MA grafiği ve C) Heatmap	92
Şekil 4.7. Fernor_kontrol grubu ile Serr_kontrol uygulamalarına ait DEG'lerin A) Volcano plot, B) MA grafiği ve C) Heatmap	93
Şekil 4.8. Serr_kontrol grubu ile Serr_150mM NaCl uygulamalarına ait DEG'lerin A) Volcano plot, B) MA grafiği ve C) Heatmap	94
Şekil 4.9. DEG'lerin Venn Diyagramında İfadesi	95
Şekil 4.10. Delta CT metodu ile gen stabilitesinin sonuçları	105
Şekil 4.11. Jr_Salt_2.011 ve Jr_Salt_2.012 primerlerinin qPCR ve Rna-Seq ifadesinin belirlenmesi	108
Şekil 4.12. Jr_Salt_010 primerinin qPCR ve Rna-Seq ifadesinin belirlenmesi	109
Şekil 4.13. Jr_Salt_011 ve Jr_Salt_012 primerlerinin qPCR ve Rna-Seq ifadesinin belirlenmesi	110
Şekil 4.14. Jr_Salt_013 ve Jr_Salt_014 primerlerinin qPCR ve Rna-Seq ifadesinin belirlenmesi	112

SİMGELER VE KISALTMALAR

%	: Yüzde
°C	: Santigrat derece
µg/g	: Mikrogram/gram
µg	: Mikrogram
ABA	: Absisik asit (Absciscic Acid)
APX	: Askorbat peroksidaz (Ascorbate Peroxidase)
BAM	: Binary Alignment Map (İkili hizalama haritası, gen dizileme dosya formatı)
BGI	: Beijing Genomics Institute (Pekin Genomik Enstitüsü)
BR	: Brassinosteroid (Bir bitki hormonu)
Ca	: Kalsiyum
CAT	: Katalaz (Catalase)
CCD	: Karotenoid parçalama dioksijenaz (Carotenoid Cleavage Dioxygenase)
Cl	: Klor
cm	: Santimetre
CML	: Calmodulin Benzeri Protein
COMT	: Kafeik asit O-metiltransferaz (Caffeic acid O-methyltransferase)
CPC	: CAPRICE transkripsiyon faktörü (bitkilerde kök epidermal gelişimle ilişkili bir protein ailesi)
CT	: Eşik döngüsü (Cycle Threshold, RT-PCR terimi)
CTAB	: Setil trimetil amonyum bromür (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide)
DEG	: Farklı ifade edilen genler (Differentially Expressed Genes)
DEPC	: Dietilpirokarbonat
DNA	: Deoksiribonükleik asit (Deoxyribonucleic Acid)
dS/m	: DesiSiemens/metre (Elektrik iletkenliği birimi)
EC	: Elektrik iletkenliği (Electrical Conductivity)
EDTA	: Etilendiamintetraasetik Asit
EF1α	: Elongasyon Faktörü 1-alfa (Elongation Factor 1-alpha)
ERF	: Etilen Tepki Faktörü (Ethylene Response Factor)
FAO	: Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (Food and Agriculture Organization)
FC	: Katlanma Değişimi (Fold Change)
FDR	: Yanlış Keşif Oranı (False Discovery Rate)
FPKM	: Kilobaz başına düşen Milyon Okuma Parçası (Fragments Per Kilobase Million)
g	: Gram

GA3	: Gibberellik asit (Gibberellic Acid)
Gb	: Gigabase
Gb	: Gigabayt (Gigabyte)
GO	: Gen Ontolojisi (Gene Ontology)
HISAT2	: Genom hizalama yazılımı (Hierarchical Indexing for Spliced Alignment of Transcripts 2)
HKT	: Yüksek afiniteli potasyum taşıyıcı (High-affinity potassium transporter)
JAZ	: Jasmonate ZIM-Domain Proteinleri
JMP	: İstatistiksel analiz yazılımı
JN	: Juglans nigra (Siyah ceviz türü)
K	: Potasyum
KEGG	: Kyoto Gen ve Genom Ansiklopedisi (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)
kg	: Kilogram
KNOLLE	: Bitki hücre bölünmesinde görevli protein ailesi
LOX	: Lipoksigenaz (Lipoxygenase)
LSD	: Least Significant Difference (En Küçük Önemli Fark)
m	: Metre
MA	: M (logaritma oranı), A (ortalama değer) - plot
MDA	: Malondialdehit
Mg	: Magnezyum
mg	: Miligram
MgCl ₂	: Magnezyum klorür
MgSO ₄	: Magnezyum sülfat
MLO	: Küf direnç geni (Mildew Resistance Locus O)
mM	: Milimolar
MPa	: MegaPascal
mRNA	: Mesajcı RNA (messenger RNA)
MYB	: Bitkilerde MYB tipi transkripsiyon faktörü
N	: Azot
Na	: Sodyum
Na ₂ SO ₄	: Sodyum sülfat
NaCl	: Sodyum klorür
NCBI	: National Center for Biotechnology Information (Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi)
NGS	: Yeni Nesil Dizileme (Next Generation Sequencing)
OH	: Hidroksil grubu

ORF	: Açık Okuma Çerçevesi (Open Reading Frame)
P	: Fosfor
P5CS	: Delta-1-pirrolin-5-karboksilat sentetaz (Delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthetase)
PAL	: Fenilalanin amonyum liyaz (Phenylalanine Ammonia Lyase)
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
PIP	: Plazma membranı integral proteini (Plasma Membrane Intrinsic Protein)
POD	: Peroksidaz
ppm	: Milyonda bir parça (Parts per million)
PR	: Paradox ceviz anacı
PVP	: Polivinilpirolidon
Q20, Q30	: Sekans kalitesi göstergeleri (Sekans verilerinin güvenilirliğini belirten kalite skorları)
qPCR	: Kantitatif gerçek zamanlı PCR (Quantitative Real-Time PCR)
RACE	: Rapid Amplification of cDNA Ends (cDNA uçlarının hızlı amplifikasyonu)
REC	: Relative Electrolyte Conductivity (Göreceli Elektrolit İletkenliği)
RIN	: RNA Integrity Number (RNA Bütünlük Numarası)
RLM	: RNA Ligase-Mediated (RNA Ligaz aracılı, gen ekspresyon analizi tekniği)
RNA	: Ribonükleik asit (Ribonucleic Acid)
RNA-Seq	: RNA sekanslama (RNA Sequencing)
ROS	: Reaktif oksijen türleri (Reactive Oxygen Species)
rRNA	: Ribozomal RNA
RSEM	: RNA-Seq by Expectation Maximization (Gen ekspresyon seviyesi belirleme metodu)
RT	: Reverse Transkriptaz (ters transkripsiyon)
RWC	: Yaprak Oransal Su İçeriği (Relative Water Content)
SAM	: Dizi hizalama harita formatı (Sequence Alignment Map)
SAMTOOLS	: Dizi analiz yazılımı
SÇKM	: Suda Çözünebilir Kuru Madde
SOD	: Süperoksit dismutaz (Superoxide Dismutase)
SPAD	: Yaprak Klorofil Ölçümü (Soil Plant Analysis Development)
SPL	: SQUAMOSA Promoter Binding Protein-Like (Transkripsiyon faktörü)
TEM	: Transmission Electron Microscope (Geçirimli Elektron Mikroskobu)
TF	: Transkripsiyon Faktörü
TIFY	: Bitkide Jasmonate sinyal mekanizmasında rol alan gen ailesi
TRIS	: Tris(hidroksimetil)aminometan (pH tamponu)
TÜİK	: Türkiye İstatistik Kurumu

UV-B : Ultraviyole-B ışını

WRKY : Bitkilerde WRKY gen transkripsiyon faktörü ailesi

ZML : Bitkide fotoperiyodik ve çevresel sinyallere cevap veren bir protein ailesi

Δ CT : Delta Cycle Threshold (PCR analizlerinde kullanılır, ekspresyon farklarını ifade eder)



1. GİRİŞ

Ceviz (*Juglans regia* L.), *Juglandales* takımında yer alan *Juglandaceae* familyasının *Juglans* cinsine ait bir türdür ve bu cins içerisinde ticari öneme sahip 18 tür arasında en yaygın olanıdır. *J. regia*, Karpat Dağları'nın güneyinden başlayarak Doğu Avrupa, Türkiye, Irak, İran'ın doğu kesimleri ve Himalaya Dağları'nın eteklerini kapsayan geniş bir coğrafyada doğal yayılım göstermektedir (Şen, 1986; Akça, 2001).

2023 yılı verilerine göre, dünya genelinde ceviz yetiştiriciliği toplam alanı 1.251.957 hektar, toplam üretim miktarı ise 3.988.643 ton olarak kaydedilmiştir (Çizelge 1.1). Üretim miktarları açısından değerlendirildiğinde, dünya genelinde en fazla üretim gerçekleştiren ülkeler sırasıyla Çin (1.400.000 ton), ABD (747.520 ton), İran (380.999 ton) ve Türkiye (360.000 ton) olarak belirlenmiştir. Benzer şekilde, ceviz üretim alanları bakımından ise Çin (355.995 ha), ABD (155.806 ha), İran (61.383 ha) ve Türkiye (174.080 ha) en geniş alanlara sahip ülkeler olarak öne çıkmaktadır (FAO, 2025).

Çizelge 1.1. 2023 Yılı Ülkeler Bazında Dünya Ceviz Üretimi Alanları ve Miktarları

ÜLKE	ALAN (ha)	ÜRETİM (Ton)
Çin	355.995	1.400.000
ABD	155.806	747.520
İran	61.383	380.999
Türkiye	174.080	360.000
Meksika	120.566	167.778
Diğer Ülkeler	384.127	932.346
Dünya	1.251.957	3.988.643

Kaynak: FAO (2025)

2023 yılı verilerine göre, Türkiye'de toplamda 16.777.339 adet meyve veren ve 12.627.698 adet meyve vermeyen ceviz ağacı tespit edilmiştir. Aynı yıl itibarıyla Türkiye'nin toplam ceviz üretimi 360.000 ton olarak kaydedilmiştir. Adana ili özelinde, 2023 yılı kayıtlarına göre 246.000 adet meyve veren ve 66.148 adet meyve vermeyen ceviz ağacı bulunduğu belirlenmiştir (TÜİK, 2025).

Türkiye'de ceviz üretimi tohumdan çoğaltma ile başlamıştır. Ancak günümüzde tohumdan üretim, ceviz yetiştiriciliği için tercih edilen bir yöntem olmaktan çıkmıştır. Bunun temel nedeni, ekonomik ve standart bir üretim hedeflendiğinde, çöğür ağaçlarından elde edilen ürünlerin kalite ve verim açısından önemli farklılıklar göstermesi ve bu durumun ciddi zaman ve ekonomik kayıplara yol açmasıdır. Bu sorunların çözümü amacıyla yapılan seleksiyon çalışmaları ile geliştirilen genotiplerin ise farklı bölgelere adaptasyonu sürecinde çeşitli sorunların ortaya çıktığı belirtilmektedir (Kaşka ve Sütyemez, 2001).

Ceviz yetiştiriciliğinde, çeşitlerin iklim gereksinimlerinin doğru bir şekilde belirlenmesi büyük önem taşımaktadır. Özellikle ilkbahar geç donları açısından risk oluşturmayacak alanların

tercih edilmesi gereklidir. Bunun yanı sıra, yüksek yaz sıcaklıkları, kış donları, sis, yağış miktarı ve zamanlaması ile rüzgâr gibi iklim koşulları, ceviz yetiştiriciliğinde dikkate alınması gereken önemli ekolojik faktörlerdir (Akça, 2001). Türkiye’de ceviz, iklim koşullarının elverdiği ölçüde hemen her bölgede yetiştirilen bir meyve türüdür.

Eğer bir bölgede ceviz ağaçları mevcutsa ve bu ağaçlardan düzenli meyve alınabiliyorsa, söz konusu bölgenin ceviz yetiştiriciliği için uygun olduğu değerlendirilebilir (Şen ve ark., 2011). Son yıllarda ceviz yetiştiriciliğine olan ilginin artmasıyla birlikte, Türkiye’nin hemen her bölgesine binlerce ceviz fidanı dikilmiştir. Ancak, yeni kurulan bahçelerin genellikle küçük ölçekli olması ve çeşit ile yer seçiminde yeterli dikkatin gösterilmemesi, gelecekte ciddi sorunlara yol açabileceği yönünde endişeler doğurmaktadır. Bu sorunların temelinde ise kullanılan standart ceviz çeşitlerinin soğuklama gereksinimi, kuraklık, kireç, tuz, su baskını, bitki besin elementi eksikliği, toksik etkiler, güneş yanıklığı ve diğer çevresel stres koşullarına karşı tepkilerinin yeterince araştırılmamış olması yatmaktadır (Akça, 2001).

Toprakta bulunan tuz oranı, meyve türlerinin verimini doğrudan etkileyen en önemli faktörlerden biridir. Toprak tuzluluğu, elektriksel iletkenlik (EC) değeriyle ölçülmekte olup, ceviz verimi üzerindeki etkisi şu şekilde belirlenmiştir:

- Elektriksel iletkenlik (EC) 2.3 olduğunda ceviz verimi %10,
- Elektriksel iletkenlik (EC) 3.3 olduğunda ceviz verimi %25,
- Elektriksel iletkenlik (EC) 4.8 olduğunda ise ceviz verimi %50 oranında azalmaktadır.

Bu veriler, toprak tuzluluğunun ceviz yetiştiriciliğinde dikkate alınması gereken kritik bir ekolojik faktör olduğunu göstermektedir (Akça, 2001; Şen ve ark., 2011).

Toprak ve sulama suyundaki tuzluluk, cevizlerde meyve kalitesi ve verimi üzerinde olumsuz etkiler yaratmaktadır. Tuzun spesifik iyon etkisi nedeniyle, ceviz yetiştiriciliğinde kullanılan anaçlar büyük bir öneme sahiptir. Bu durum, farklı anaç tiplerinin tuzu absorbe etme ve kaleme taşıma kapasitelerinin farklılık göstermesinden kaynaklanmaktadır (Akça, 2001; Şen ve ark., 2011).

Tuz stresine dayanıklı çeşitlerin seçilmesi, yüksek verimlilik, daha az sulama ihtiyacı, gübre kullanımının azalması, ürün güvenliğinin artması, çevresel dayanıklılığın güçlenmesi ve ekonomik kârlılığın artması gibi önemli avantajlar sunmaktadır (Munns ve Tester, 2008; Flowers ve Colmer, 2008; Deinlein ve ark., 2014).

Bitkilerin yaşamsal döngüsü olan büyüme, gelişme ve üretim süreçlerinde, olumsuz çevre koşullarına bağlı olarak organizmada meydana gelen istenmeyen durumlar genel olarak stres olarak tanımlanmaktadır (Jones ve Qualset, 1984). Bitkiler dış çevresel etmenlerin neden olduğu strese karşı kimyasal, biyokimyasal, hormonal ve genetik mekanizmalar yoluyla karmaşık fizyolojik tepkiler göstermektedir. Bu nedenle, tüm bitkiler için aynı abiyotik faktörlerin stres oluşturacağını varsaymak

doğru değildir. Bazı bitkiler maruz kaldıkları stresin olumsuz etkilerinden zarar görürken, diğerleri bu zararları onararak yaşam döngülerini sürdürebilmektedir (Taiz ve Zeiger, 2002; Kadioğlu ve Yanar, 2004).

Bitkiler yaşam döngüleri boyunca biyotik (canlı kaynaklı) ve abiyotik (cansız kaynaklı) stres faktörlerine ayrı ayrı veya birlikte maruz kalmaktadır. Her iki stres türü de bitkilerin metabolik, morfolojik ve fizyolojik gelişimini önemli ölçüde olumsuz etkilemektedir (Fujita ve ark., 2006). Abiyotik stres faktörleri; atmosfer, toprak ve iklim koşulları (örneğin, aşırı sıcaklıklar, kuraklık, kuvvetli rüzgar), radyasyon olayları ve ışık şiddeti gibi çevresel etmenleri kapsamaktadır. Biyotik stres faktörleri ise bitkilerin hayvanlar veya mikroorganizmalar tarafından zarar görmesiyle ilişkilendirilmektedir. Ayrıca, sanayileşmenin bir sonucu olarak çevreye yayılan kimyasal kirleticiler de bitkiler üzerinde önemli bir tehdit oluşturmakta ve bu tür kirleticilere karşı bitkiler genellikle savunmasız kalmaktadır (Acar ve Demirbaş, 2022).

Tuzluluk stresi, özellikle kurak ve yarı kurak bölgelerdeki tarımsal alanlarda önemli bir sorun haline gelmiştir. Türkiye'de yaklaşık 1.5 milyon hektar tarım alanı, tuzluluk ve sodisite problemlerinden etkilenmektedir. Tuzluluk stresinin bitkiler üzerindeki olumsuz etkilerinin, Na^+ ve Cl^- iyonlarının neden olduğu ozmotik stres ve beslenme bozukluklarıyla ilişkili iyon toksisitesinden kaynaklandığı belirlenmiştir (Greenway ve Munns, 1980; Lewitt, 1980; Munns ve Termaat, 1986; Yeo ve ark., 1991; Marschner, 1995; Akça ve Samsunlu, 2012).

Tuzluluk stresinin bitkilerdeki etkilerini inceleyen çalışmalarda, bu stres faktörünün büyüme, prolin birikimi, klorofil içeriği ile K/Na ve Ca/Na oranlarını etkilediği tespit edilmiştir. Tuz stresine toleranslı genotiplerde prolin birikimi, klorofil içeriği ve K/Na oranının yüksek olduğu, buna karşın Na^+ ve Cl^- birikiminin düşük seviyelerde kaldığı gözlemlenmiştir (Mane ve ark., 2011).

Tuzluluk stresi, birçok bitki türünde olduğu gibi ceviz yetiştiriciliğinde de üretimi sınırlayıcı bir faktör olarak öne çıkmaktadır (Romero-Aranda ve ark., 1998; Lotfi ve ark., 2009a). Ceviz abiyotik stres koşullarına karşı oldukça hassas bir bitkidir ve bu bağlamda tuza dayanıklı genetik kaynakların belirlenmesi büyük önem taşımaktadır (Lotfi ve ark., 2009b). Tuzluluk stresine maruz kalan ceviz ağaçları üzerinde farklı araştırmacılar tarafından çok sayıda çalışma yürütülmüş ve ceviz bu stres faktörüne karşı çeşitli fizyolojik ve moleküler tepkiler gösterdiği belirlenmiştir. Tuzluluk stresine maruz kalan ceviz ağaçları, kök ve yapraklarında tuz birikimini azaltmaya yönelik mekanizmaları aktive etmektedir. Bu mekanizmalar tuzların köklerden uzaklaştırılması için kök basıncının artırılması ya da yapraklardaki tuz atılımının artırılması yoluyla işlev görmektedir. Ayrıca, ceviz ağaçları tuz stresine bağlı olarak oluşan reaktif oksijen türlerine (ROS) karşı savunma oluşturmak amacıyla antioksidan enzimlerin üretimini artırabilmektedir. Tuzluluk stresi, bitki hücrelerinde su kaybına neden olarak hücresel osmotik dengenin bozulmasına yol açabilmektedir. Bu duruma karşı ceviz ağaçları, osmoregülasyon mekanizmalarını kullanarak hücre içi osmotik dengeyi korumakta, stomatal konfigürasyonlarını düzenleyerek transpirasyonu azaltmakta ve böylece su kaybını minimize etmektedir. Bu mekanizmalar, bitkinin su dengesini koruyarak tuzluluk

stresine karşı direncini artırmasına olanak sağlamaktadır. Tuzluluk stresine yanıt olarak, ceviz ağaçlarında kök morfolojisi ve dağılımında da değişiklikler gözlemlenmiştir. Bitki, su ve besin alımını optimize etmek için daha uzun kökler geliştirebilir ya da daha fazla yan kök oluşturarak bu adaptasyonu sağlayabilir. Ancak, tuzluluk stresinin bitki üzerindeki etkileri, çeşit, yetiştirme koşulları ve stresin şiddeti gibi faktörlere bağlı olarak farklılık gösterebilmektedir (Munns ve Tester, 2008; Flowers ve Colmer, 2008; Deinlein ve ark., 2014; Munns ve ark., 2006).

Bitkiler abiyotik stres koşullarına genetik özelliklerine bağlı olarak farklı tepkiler vermektedir. Tuzluluk stresine yönelik çalışmalar kapsamında kullanılan moleküler markörler, bitkilerin bu strese karşı tepki mekanizmalarını anlamak ve tuzluluk toleransını artırmak amacıyla önemli göstergeler sağlamaktadır. Bu markörler genellikle gen ekspresyonu, protein ifadesi ve metabolik profiller üzerine yoğunlaşmaktadır. Tuzluluk stresinde önemli bir rol oynayan *yüksek afiniteli K⁺ taşıyıcı (HKT)* gen ailesi, bitkilerde Na⁺ taşınımını düzenleyerek Na⁺ ve K⁺ arasındaki iyonik dengeyi sağlamaktadır. Bu genler, tuzların köklerden alımını ve taşınmasını düzenlerken, *HKT* genlerinin ekspresyonundaki değişiklikler, bitkilerin tuzluluk stresine duyarlılığını veya toleransını belirlemede etkili bir markör olarak kullanılabilir. Tuzluluk stresi sırasında bitkilerde antioksidan savunma mekanizmaları da aktif hale gelmektedir. *Superoxide Dismutase (SOD)* ve *Peroxidase (POD)* gibi antioksidan enzimlerin aktivitesindeki artışlar veya gen ekspresyonundaki değişiklikler, tuzluluk stresine karşı bitkilerin tepkilerini belirlemek için kullanılabilecek önemli göstergelerdir. Ayrıca, *prolin* ve *glisin betain* gibi osmolitler, bitkilerin tuzluluk stresine uyum sağlamasında kritik bir rol oynamaktadır. Bu osmolitlerin seviyelerindeki değişiklikler, bitkilerin tuzluluk stresine duyarlılığını veya toleransını belirlemek için potansiyel bir markör olarak değerlendirilmektedir. Abiyotik stres yanıtlarını düzenleyen önemli bir fitohormon olan *absisik asit (ABA)*, tuzluluk stresi altında bitkilerde üretimi artarak adaptasyon süreçlerini başlatmaktadır. *ABA* yolu genlerinin ifadesindeki değişiklikler, bitkilerin tuzluluk stresine yanıtını değerlendirmede kritik bir role sahiptir. Bunun yanı sıra, tuzluluk stresi altında hücre zarındaki lipid bileşimindeki değişiklikler, membran stabilitesini etkileyerek bitkilerin strese uyum sağlamasında rol oynamaktadır. Lipid peroksidasyonu veya membran lipid bileşimi gibi parametreler de tuzluluk stresi markörleri olarak değerlendirilebilmektedir. Bu markörler, tuzluluk stresine karşı bitkilerin fizyolojik ve biyokimyasal tepkilerini anlamak için değerli bilgiler sunmakta ve bu bağlamda tarımsal uygulamalar için önemli bir temel oluşturmaktadırlar (Munns ve Tester, 2008; Flowers ve Colmer, 2008; Deinlein ve ark., 2014).

Tuzluluk stresi altında, bitkilerde RNA düzeyinde çeşitli değişiklikler meydana gelmekte olup bu değişiklikler, gen ekspresyonunun düzenlenmesiyle tuzluluk stresine uyum sağlama süreçlerinde kritik bir rol oynamaktadır. Bu düzenlemeler transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel mekanizmalar aracılığıyla gerçekleşmektedir. Tuzluluk stresine yanıt olarak belirli genlerin ifade düzeylerinde artış veya azalış gözlemlenmekte ve bu değişiklikler, bitkilerin strese adaptasyonunu kolaylaştıran veya engelleyen genlerin etkinliğini belirlemektedir. Tuzluluk stresine yanıt sırasında,

transkripsiyon faktörleri ve diğer transkripsiyonel düzenleyici proteinlerin aktivitelerinde önemli değişiklikler meydana gelir. Bu düzenlemeler, RNA polimeraz ve transkripsiyon faktörleri aracılığıyla belirli genlerin transkripsiyonunu düzenleyerek, savunma mekanizmalarının başlatılmasını veya inhibe edilmesini sağlamaktadır. Stres koşulları altında RNA işleme mekanizmalarında da değişiklikler gözlemlenmiştir. Bu değişiklikler öncül mRNA'ların parçalanması, ekson alternatif splicing mekanizmaları ve mRNA stabilitesinin düzenlenmesi gibi süreçleri kapsamaktadır. Bu tür düzenlemeler tuzluluk stresine yanıt olarak belirli genlerin ekspresyon düzeylerini değiştirerek, bitkilerin strese karşı adaptasyonunu desteklemektedir. Ayrıca, tuzluluk stresine karşı gen ifadesini düzenlemek amacıyla küçük RNA molekülleri olan miRNA'lar (mikro RNA) ve siRNA'lar (küçük interferans RNA) da aktif rol oynamaktadır. Bu moleküller, hedef mRNA'ların translasyonunu inhibe ederek veya parçalayarak gen ekspresyonunun stres koşullarına uygun bir şekilde düzenlenmesini sağlamaktadır. Bu mekanizmalar tuzluluk stresine yanıt olarak genetik ve epigenetik düzeyde düzenlemelerin kompleks ve dinamik bir şekilde gerçekleştiğini ortaya koymaktadır (Shkolnik-Inbar ve Bar-Zvi, 2010; Gong ve ark., 2005).

Son 15-20 yılda çeşitli yeni RNA moleküllerinin keşfi ve bu moleküllerin gen düzenlemesindeki rollerinin anlaşılması konusunda önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. RNA molekülleri, proteinler, DNA ve diğer RNA molekülleriyle etkileşime girerek hücrel süreçlerde kritik bir rol oynamaktadır. Özellikle RNA-RNA etkileşimlerinin, RNA biyogenezi ve işlevini düzenleyerek çeşitli biyolojik süreçlerde önemli bir rol üstlendiği belirlenmiştir. Ökaryotik hücrelerde RNA-RNA etkileşim mekanizmalarını ve işlevlerini anlamak, genetik ve moleküler biyoloji araştırmaları açısından büyük bir öneme sahiptir. Geleneksel olarak, RNA-RNA etkileşimleri onlarca yıldır çeşitli biyokimyasal yöntemlerle incelenmiştir. Ancak, son yıllarda yüksek verimli RNA dizileme teknolojilerinin geliştirilmesi, RNA-RNA etkileşim ağlarının geniş kapsamlı bir şekilde tanımlanmasını sağlamış ve RNA yapısı ile gen ekspresyonunun düzenlenmesindeki rollerinin daha iyi anlaşılmasına olanak tanımıştır (Singh ve ark., 2022). Ters transkripsiyon yöntemiyle gerçekleştirilen polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR), genellikle mRNA, öncül mRNA (pre-mRNA) veya kodlama yapmayan RNA gibi farklı RNA türlerinin varlığını tespit etmek amacıyla kullanılmaktadır. Bu yöntem, RNA seviyelerinin analizi ve gen ekspresyon düzenlemelerinin incelenmesi için temel bir araç olarak yaygın şekilde uygulanmaktadır. Bu ilerlemeler RNA'nın hücrel işlevlerdeki kritik rollerine dair kapsamlı bir anlayış sunmakta ve genetik araştırmaların yönünü şekillendirmeye devam etmektedir (Rio, 2014).

Yeni nesil dizileme (NGS) teknolojilerinin geliştirilmesiyle birlikte RNA-seq çalışmaları, hem prokaryotlarda hem de ökaryotlarda transkriptomların nicel ve nitel analizine olanak sağlayarak bu alandaki araştırmalara önemli katkılar sunmuştur. RNA-seq çalışmaları, genellikle RNA moleküllerinden ters transkripsiyon yoluyla oluşturulan cDNA kütüphanelerinin dizilenmesi üzerine temellendirilmiştir. Ancak, bu deneysel süreçler sırasında ortaya çıkan hatalar ve bozulmalar bazı uygulamaların doğruluğunu ve güvenilirliğini sınırlayabilmektedir. Son yıllarda doğrudan RNA

dizilimi gibi teknolojik yenilikler mevcut RNA-seq yaklaşımlarının bazı sınırlamalarını aşmaya yönelik çözümler sunmuş ve transkriptomik araştırmalar için yeni olanaklar sağlamıştır. Bu gelişmelere rağmen, özellikle teknolojik altyapı ve yöntemlerin doğruluğu ile ilgili bazı zorluklar devam etmektedir. Bununla birlikte, son dönemde sınırlı miktardaki hücrelerden elde edilen RNA'nın güvenilir bir şekilde analiz edilmesi konusunda önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Bu gelişmeler tek hücre düzeyinde transkriptom profili çıkarılmasına yönelik çalışmalara yeni bir perspektif kazandırmıştır. Bu teknolojik ilerlemeler RNA biyolojisi ve transkriptomik araştırmalarında daha hassas ve kapsamlı analizlerin yapılmasına olanak tanımaktadır (Ozsolak ve Milos, 2011).

Birçok araştırmacı, RNA-Seq çalışmalarıyla abiyotik stres koşullarına maruz kalan bitkilerde özellikle tuz stresine verilen tepkilerle ilişkili aday genleri belirlemiştir. Radwan ve ark. (2015) hurma ağacında tuzluluk stresine dayanıklılık ile ilişkili genleri belirlerken, Li ve ark. (2017) armutta tuz toleransı mekanizmalarını RNA-Seq analizi ile araştırmıştır. Yang ve ark. (2017) cevizde *WRKY* transkripsiyon faktörlerinin tuz stresine karşı işlevlerini incelemiş, Jazi ve ark. (2017) fıstıkta tuzluluğa tolerans sağlayan genlerin belirlenmesine odaklanmıştır. Wu ve ark. (2018) elmada *MdMYB44* geninin tuz ve soğuk stresine yönelik düzenleyici etkisini ortaya koymuş, Li ve ark. (2019) elmalarda kuraklık, tuzluluk ve soğuk streslerine bağlı gen ekspresyon profillerini analiz etmiştir. Ya-bin ve ark. (2019) kivi çeşitlerinde stres toleransına duyarlı aday genleri belirlemiş, Liu ve ark. (2020) cevizde *JrERF2-2* geninin strese yanıt mekanizmalarındaki rolünü açıklamıştır. Ma ve ark. (2021) elmada *miR156/SPL* gen ailesinin tuz stresine karşı düzenleyici mekanizmasını incelemiş, Liu ve ark. (2022) cevizde *TIFY* transkripsiyon faktörlerinin abiyotik stres koşullarındaki işlevlerini araştırmıştır. Qin ve ark. (2022) elmada *WRKY* gen ailesinin, Yu ve ark. (2022) ise bademde *PdWRKY* gen ailesinin abiyotik strese karşı etkilerini ortaya koymuştur. Bu çalışmaların her biri, farklı bitki türleri ve genotiplerinde tuz stresine karşı önemli bulgular sunmuş olmakla birlikte, ticari öneme sahip yerel ve yabancı ceviz çeşitlerinin tuz stresine karşı tolerans mekanizmalarını kapsamlı şekilde ele alan çalışmalar sınırlıdır. Özellikle ceviz gibi abiyotik streslere hassas bir türde, genotipler arası farklılıkların detaylı olarak analiz edilmesi literatürde eksik kalmıştır.

Ceviz, toprak ve sulama suyunda bulunan tuz varlığına karşı oldukça hassas bir tür olarak bilinmektedir. Bu durum, tuza toleranslı genotiplerin sürdürülebilir ceviz yetiştiriciliği açısından önemini artırmaktadır. Çünkü tuz stresine bağlı sorunlar genellikle kimyasal müdahaleleri gerektirmektedir. Bu çalışmada, bazı ceviz çeşit ve genotiplerinin tuza tolerans durumlarının belirlenmesi ve bir adet hassas ve bir adet toleranslı ceviz çeşidinde yapılan tuz stresi uygulaması sonucu RNA-Seq yöntemiyle cevizde tuz stresine ilişkili aday genlerin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Ceviz Ağaçlarında Tuzluluk Stresi İle İlgili Çalışmalar

Lotfi ve ark. (2009a), yedi farklı ceviz çeşidinin (Serr, Lara, Pedro, Chandler, Hartley, Vina ve Roun de Montignac) tohumlarının tuzluluk stresi altında çimlenme performansını araştırmıştır. Çalışmada, tuzluluk stresini oluşturmak amacıyla 50 mM'den 250 mM'e kadar değişen konsantrasyonlarda NaCl solüsyonları uygulanmıştır. Tuzluluk seviyelerindeki artışın, köklerin bağıl su içeriğinde önemli bir azalmaya neden olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, artan tuzluluk seviyelerinin çimlenme yüzdesi üzerinde de olumsuz etkiler yarattığı tespit edilmiştir. Çalışmada, Chandler çeşidinin tuzluluğa en toleranslı ceviz çeşidi olduğu saptanırken, Hartley, Pedro ve Roun de Montignac çeşitlerinin yarı duyarlı, Vina, Serr ve Lara çeşitlerinin ise tuzluluğa karşı hassas olduğu belirlenmiştir. Araştırmacılar, ceviz çeşitleri arasında tuzluluk stresine yanıt bakımından genetik farklılıkların olduğunu göstermiş ve tuza dayanıklı çeşitlerin seçiminin sürdürülebilir ceviz yetiştiriciliği için önemini vurgulamışlardır.

Lotfi ve ark. (2009b), tuz stresinin yedi farklı ceviz çeşidinin (Serr, Lara, Pedro, Chandler, Hartley, Vina ve Roun de Montignac) tohumlarının çimlenme üzerindeki etkilerini araştırmıştır. Çalışmada, bitkiler 50 mM ile 250 mM arasında değişen NaCl çözeltileri kullanılarak tuz stresine maruz bırakılmıştır. Araştırma sonucunda, farklı strese dayanıklılık gruplarının farklı hücre zarı taşıma özelliklerine sahip olduğu tespit edilmiştir. Tuz konsantrasyonunun artmasıyla birlikte, dirençli çeşitlerde özellikle sürgünlerde K ve Ca birikiminin arttığı, yarı toleranslı çeşitlerde ise yalnızca köklerde K birikimi meydana geldiği belirlenmiştir. Tüm çeşitlerin kök ve sürgünlerindeki Mg birikimindeki farklılıkların, uygulanan tüm stres seviyelerinde önemli olduğu, ancak bu farklılıkların çeşitlere bağlı olmadığı gözlemlenmiştir. Buna karşın, Na birikimindeki farklılıkların diğer minerallerle karşılaştırıldığında daha az olduğu tespit edilmiştir. Özellikle yarı toleranslı ve toleranslı çeşitlerde, köklerdeki Na seviyelerinin sürgünlere kıyasla daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Araştırmacılar, ceviz çeşitlerinin tuz stresine karşı adaptasyonunda farklı minerallerin birikim dinamiklerinin önemli bir rol oynadığını ve bu mekanizmaların çeşitlere bağlı olarak farklılık gösterdiğini belirlemişlerdir.

Akça ve Samsunlu (2012), yaptıkları bir çalışmada üç farklı ceviz çeşidinin (Bilecik, Kaman-1 ve Kaman-5) tuz stresine tolerans düzeylerini belirlemeyi amaçlamışlardır. Araştırmada, sodyum klorür, magnezyum sülfat ve kalsiyum klorür tuz kaynakları olarak kullanılmıştır. Denemede, dört farklı tuz su konsantrasyonu uygulanmıştır ($Ecw: 0,3 \text{ dS/m}$, $Ecw: 1,5 \text{ dS/m}$, $Ecw: 3 \text{ dS/m}$ ve $Ecw: 5 \text{ dS/m}$). Farklı tuz konsantrasyonları uygulanmadan önce ve uygulamadan sonra, canlı ve kuru bitki ağırlığı, ölü ve canlı kök ağırlığı ile kuru ve yaş bitki ağırlıkları ölçülmüştür. Ayrıca, klorofil analizi, prolin analizi, yaprak su içeriği, potasyum (K), kalsiyum (Ca), sodyum (Na), magnezyum (Mg), fosfor (P), azot (N), kuru yaprak miktarı ve klorin içeriği gibi parametreler değerlendirilmiştir.

Çalışmanın sonuçlarına göre, Kaman-5 ceviz çeşidinin tuz stresine hassasiyetinin diğer iki çeşide (Bilecik ve Kaman-1) göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Vahdati (2013), ceviz köklerinin genellikle üst toprak katmanlarında yoğunlaştığını ve kurak mevsim boyunca su alımında etkinliğini kaybettiğini tespit etmiştir. Ceviz genotipleri arasında antioksidatif enzim aktivitelerindeki farklılıkların, oksidatif stres hasarına neden olan mekanizmalar ile bu genotiplerin abiyotik streslere karşı toleransları arasındaki ilişkiye işaret ettiği belirtilmiştir. Araştırmada, ozmotik strese toleranslı ceviz fidelerinde daha yüksek prolin birikiminin, artan antioksidatif enzim aktivitesiyle birlikte gözlemlendiği bulunmuştur. Çalışmanın sonucuna göre, prolin birikiminin ceviz ağaçlarında antioksidatif savunma mekanizmasını aktive edebileceğini göstermektedir. Araştırmacı, ceviz genotipleri arasında antioksidatif savunma ve ozmotik stres toleransında farklılıkların genetik ve fizyolojik faktörlerden kaynaklanabileceğini vurgulamıştır.

Tufan (2016), yerel bir ceviz genotipinin çeşitli abiyotik stres faktörlerine karşı dayanıklılığını değerlendirmeyi amaçlamıştır. Çalışmada, bitkilere farklı dozlarda tuzluluk (75 mM, 150 mM ve 225 mM NaCl), ağır metal, kireç, hava kirliliği (baca tozu) ve kuraklık stresi uygulanmıştır. Uygulama sonuçlarına göre, incelenen ceviz genotipinin tuz konsantrasyonları ve kuraklık stresine karşı duyarlı olduğu, ancak ağır metal toksisitesine toleranslı olduğu tespit edilmiştir. Baca tozu ve kireç uygulamalarına ise genotipin orta dereceli tolerans gösterdiği belirlenmiştir.

Şimsek ve ark. (2017), Şebin ceviz çeşidinin stres koşulları olarak değerlendirilen tuzluluk ve kuraklığa dayanım durumlarını belirlemek amacıyla bir çalışma gerçekleştirmiştir. Çalışmada, *J. regia* çöğürleri üzerine aşılanmış Şebin ceviz fidanları kullanılmıştır. Tuzlu sulama sularının hazırlanmasında sodyum bikarbonat, magnezyum klorür ve kalsiyum klorür tuzlarından faydalanılmış ve 5 farklı tuzluluk konsantrasyonu ile 3 farklı sulama suyu miktarı uygulanmıştır. Araştırma sonuçları, ceviz gelişimi üzerine tuzluluk ve su stresinin önemli etkileri olduğunu ortaya koymuştur. Özellikle sulama suyunun 3 dS m⁻¹ tuzluluk düzeyinde, bitkilerin gelişim gösteremediği tespit edilmiştir. Çalışma, ceviz yetiştiriciliğinde tuzluluk ve kuraklık stres faktörlerinin aynı anda bulunmamasına dikkat edilmesi gerektiğini vurgulamıştır. Araştırmacılar, ceviz yetiştiriciliğinde stres yönetiminin önemini ve çevresel koşullara uygun planlamanın gerekliliğini ortaya koymuştur.

Karimi ve ark. (2018), bir yaşındaki mikro çoğaltılmış Chandler ceviz çeşidinin kuraklık toleransını belirlemek amacıyla bir çalışma yürütmüştür. Çalışmada, yedi farklı tuz konsantrasyonu kullanılmış ve bu uygulamaların bitkideki kuraklık toleransı üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Araştırma sonuçlarına göre, Na_2SO_4 uygulaması, *Juglans regia*'da kuraklık toleransını artırmada en etkili yöntem olarak belirlenmiş ve prolin ile indüksiyon birikimini teşvik ederek kuraklık stresine karşı adaptasyonu desteklediği kanıtlanmıştır. Çalışmanın sonuçlarına göre, ceviz yetiştiriciliğinde kuraklık stresine toleransı artırmaya yönelik spesifik tuz uygulamalarının önemi vurgulanmıştır.

Wang ve ark. (2021), erken ve geç gelişen iki ceviz çeşidinde su stresi, tuzluluk ve bu stres faktörlerinin kombinasyonlarının etkilerini incelemiştir. Çalışmada, büyüme, fotosentetik kapasite,

yapısal olmayan karbonhidrat içeriği, Cl^- iyon birikimi, reaktif oksijen türleri (ROS) birikimi ve ozmotik düzenleme parametreleri değerlendirilmiştir. Sonuçlar, geç gelişen ceviz çeşidinin stresli koşullar altında erken gelişen çeşide göre daha yüksek toplam biyokütle ve net fotosentetik orana sahip olduğunu göstermiştir. Ayrıca, geç gelişen cevizde daha yüksek antioksidan enzim aktivitesi, daha etkin osmoregülasyon ve daha düşük ROS birikimi tespit edilmiştir. Tuzluluk stresine karşı geç gelişen ceviz, tuz taşınımını sınırlayarak Cl^- iyonlarının köklerde birikimini artırırken, erken gelişen cevizde Cl^- iyonlarının yapraklara taşınma düzeyinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Araştırma, geç olgunlaşan ceviz çeşidinin su stresi, tuzluluk ve özellikle bu iki stres faktörünün kombinasyonu altında daha iyi stres toleransı gösterdiğini ortaya koymuştur.

Akça ve Şahin (2022), tuzluluk stresinin büyüme, besin durumu, klorofil içeriği ve su tüketimi üzerindeki etkilerini araştırmak amacıyla *Juglans nigra* L. (JN), *Paradox* (PR) ve *Juglans sieboldiana* L. (JS) anaçları üzerine aşılanmış iki yıllık Chandler ceviz fidanlarına dört farklı tuzlu sulama suyu (S_0 : 0.3 dS m^{-1} [kontrol], S_1 : 1.5 dS m^{-1} , S_2 : 3 dS m^{-1} , S_3 : 5 dS m^{-1}) uygulamıştır. Tuzlu sulamalar, NaCl, MgSO_4 ve CaCl_2 tuzları kullanılarak hazırlanmıştır. Çalışmada, sürgün uzunluğu değişim oranı (%) S_0 uygulamalarında 77.57 (JN) ile 81.83 (PR) arasında, S_3 uygulamalarında ise 55.60 (JS) ile 56.84 (PR) arasında değişmiştir. Bitki çapı değişim oranı (%) S_0 uygulamaları için 75.10 (JN) ile 99.22 (PR) arasında, S_3 uygulamalarında ise 60.63 (JN) ile 80.97 (PR) arasında gözlemlenmiştir. Ortalama kök uzunluğu, S_0 uygulamalarında 30.75 cm (JN) ile 37.50 cm (PR) arasında, S_3 uygulamalarında ise 8.91 cm (JN) ile 21.50 cm (PR) arasında değişmiştir. Kök sayısı, S_0 uygulamalarında 19.00 (JS) ile 22.16 (PR) arasında, S_3 uygulamalarında ise 6.41 (JN) ile 8.08 (PR) arasında belirlenmiştir. Yaprakların Na ve Cl^- içerikleri S_3 uygulamasında JN, PR ve JS için sırasıyla 1.41, 1.97 ve 3.41 (% Na); 0.88, 0.99 ve 0.91 ppm (Cl^-) olarak ölçülmüştür. Ca/Na oranları JN, PR ve JS'de sırasıyla 0.43, 0.27 ve 0.14, K/Na oranları ise 0.24, 0.12 ve 0.10 olarak hesaplanmıştır. Bu bulgular ışığında, yaprak Na^+ , Cl^- ve K^+ içerikleri ile K/Na ve Ca/Na oranlarına bağlı olarak anaçların tuzluluk toleransı sıralaması $\text{JN} > \text{PR} > \text{JS}$ olarak belirlenmiştir. Sonuçlar, *Juglans nigra*'nın tuzluluk stresine karşı en toleranslı anaç olduğunu, *Paradox*'un orta dereceli tolerans gösterdiğini ve *Juglans sieboldiana*'nın ise tuzluluğa en hassas anaç olduğunu ortaya koymuştur.

Ji ve ark. (2022a), tuza toleranslı *Juglans microcarpa* L. fidelerinin farklı NaCl konsantrasyonlarına (0, 50, 100, 200 ve 300 mmol/L) maruz bırakılarak gelişimlerinin değerlendirilmesini amaçlamıştır. Araştırmada, tuz stresine maruz kalan fidelerde sararma, solma, kıvrılma ve yaprak dökülmesi gibi tuz hasarı belirtilerinin ortaya çıktığı tespit edilmiştir. Yüksek tuz konsantrasyonları ve uzun süreli stresin, yaprakların solması ve dökülmesiyle daha ciddi zararlara yol açtığı belirlenmiştir. Tuz stresinin, fidelerin büyümesini önemli ölçüde engellediği saptanmıştır. Tuz konsantrasyonu ve stres süresi arttıkça, fidelerin klorofil içeriği ve fotosentetik parametrelerinin değişen derecelerde azaldığı; buna karşılık bağlı elektrik iletkenliği (REC) ve malondialdehit (MDA) seviyelerinin arttığı gözlemlenmiştir. Araştırma sonuçları, *J. microcarpa* L. fidelerinin 100 mmol/L tuz stresine karşı daha toleranslı olduğunu, ancak 200 mmol/L ve 300 mmol/L tuz stresinde

büyümeye verilen zararın daha şiddetli hale geldiğini ortaya koymuştur. Araştırmacılar, *J. microcarpa* L.'nin orta düzeyde tuz stresine adaptasyon sağlayabilmesini belirlemesine rağmen, yüksek tuz konsantrasyonlarının ciddi fizyolojik bozukluklara yol açtığını saptamışlardır.

Ji ve ark. (2022b), *J1 (Juglans hindsii)*, *J2 (J. mandshurica)*, *J3 (J. regia × J. mandshurica)* ve *J4 (J. regia × J. hindsii)* olmak üzere dört ceviz anacı genotipini, farklı NaCl konsantrasyonlarının (0, 50, 100, 200 ve 300 mmol/L) etkilerini incelemek amacıyla 28 gün süreyle bir saksı deneyiyle test etmiştir. Araştırmada fide morfolojisi, büyüme indeksleri, klorofil içeriği, fotosentetik parametreler, bağıl elektrik iletkenliği (REC), malondialdehit (MDA) içeriği, prolin (Pro), çözünür şeker konsantrasyonu ile yapraklardaki süperoksit dismutaz (SOD) ve peroksidaz (POD) aktiviteleri değerlendirilmiştir. Sonuçlar, tuz stresinin dört genotipin de morfolojik özellikleri ve büyüme indekslerini olumsuz etkilediğini göstermiştir. Tuz stresini, genotiplerin klorofil içeriği ve fotosentetik parametrelerini azaltırken, REC, MDA, Pro ve çözünür şeker içeriklerini farklı derecelerde artırmıştır. Ayrıca, enzimatik aktivitelerde (SOD ve POD) genotipler arasında farklı eğilimler gözlemlenmiştir. Fizyolojik ve biyokimyasal analizler, tuz stresinin fidelerin hem fizyolojik hem de biyokimyasal süreçleri üzerinde önemli etkiler yarattığını ortaya koymuştur. Genotipler arasında yapılan karşılaştırmalarda, *J4*'ün güçlü tuz toleransına sahip olduğu belirlenmiş ve bu genotipin cevizde tuzluluğa toleranslı anaç ıslahı için önemli bir genetik kaynak olduğu tespit edilmiştir.

2.2. Diğer Meyve Ağaçlarında Tuzluluk Stresi İle İlgili Çalışmalar

Matsumoto ve ark. (2006), yerli Akdeniz armut anaçları (*Pyrus amygdaliformis* ve *P. elaeagrifolia* Pall ile tuzluluğa toleranslı olduğu bilinen Asya armut anaçlarının (*Pyrus betulaefolia* Bunge, *P. pyrifolia* Nakai ve *P. xerophila* Yu) 75 mM ve 150 mM NaCl konsantrasyonlarına karşı 30 gün boyunca gösterdiği dayanıklılığı incelemiştir. Çalışma sonucunda, yerli Akdeniz anaçlarında 30 günlük tuzluluk uygulaması süresince her iki tuzluluk konsantrasyonunda da yaprak hasarına rastlanmazken, Asya anaçlarında belirgin yaprak hasarı gözlenmiştir. Ayrıca, gövde, saçak kökler ve diğer bitki organlarında Na ve Cl birikiminin oldukça yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ancak, yerli Akdeniz anaçlarının yapraklarında Na ve Cl birikiminin Asya anaçlarına kıyasla daha düşük olduğu belirlenmiştir. Bu bulgular ışığında, *P. amygdaliformis* ve *P. elaeagrifolia* Pall anaçlarının gövdelerinde tuzluluğu sınırlayan bir mekanizmaya sahip olabileceğini düşündürmüştür. Tuzluluk uygulaması, her iki anaç grubunda da kök su potansiyelinde ve Cl/Ca oranında azalmaya neden olmuş; bu durum stomaların kapanması ve fotosentetik süreçlerin kısıtlanması ile sonuçlanmıştır. Bununla birlikte, yerli Akdeniz anaçlarında fotosentetik oranların daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Özellikle düşük NaCl konsantrasyonlarının, yerli Akdeniz anaçlarının yapraklarındaki fotosentetik faaliyetlerde önemli azalmaları önleyebileceği tespit edilmiştir. Sonuç olarak, yerli Akdeniz armut anaçlarının, Asya anaçlarına kıyasla tuzluluğa daha toleranslı olduğu ortaya konulmuştur.

Kumari ve ark. (2007), iki farklı dut (*Morus* spp.) genotipinde tuzluluğun büyüme ve proteomik değişiklikler üzerindeki etkilerini araştırmıştır. Çalışmada, üç aylık dut bitkileri yedi gün

boyunca %0.0, %1.0, %1.5 ve %2.0 NaCl konsantrasyonlarında tuz stresine maruz bırakılmıştır. Tuz uygulamasının her iki genotipte de büyüme, kuru madde miktarı ve yaprak alanı üzerinde olumsuz etkiler yarattığı tespit edilmiştir. Yapraklardan ekstrakte edilen çözünür proteinler, tuz stresinin neden olduğu değişiklikleri belirlemek amacıyla iki boyutlu elektroforez yöntemiyle analiz edilmiştir. Bu analizler sonucunda, tuz stresinin her iki genotipte de proteinlerin niteliksel ve niceliksel özelliklerinde değişimlere neden olduğu ortaya konulmuştur. Çalışma, tuz stresinin dut bitkilerinde hem büyüme hem de proteomik yapı üzerinde önemli etkiler yarattığını göstermiştir.

Javadisaber (2014), bazı armut (*Pyrus communis* L.; Ankara armudu ve OH x F 333), ahlat (*Pyrus elaeagnifolia* Pall.; Ahlat-1, Ahlat-2 ve Ahlat-3) ve ayva (*Cydonia oblonga* Mill.; Quince A) genotiplerinde farklı tuz stresi seviyelerinin in vitro koşullarda mikro sürgünlerin büyüme ve gelişimi üzerine etkilerini ve tuz stresi altında mikro sürgünlerde dehydrin gen ifadelerini araştırmıştır. Tuzluluk stresi, besin ortamına 75 mM, 150 mM, 225 mM ve 300 mM NaCl ile 7.5 mM, 15 mM, 22.5 mM ve 30 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ eklenerek oluşturulmuştur. Kültürlerde sürgünlerin canlılık oranı, ortalama sürgün sayısı, uzunluğu, kalınlık düzeyi, kallus çapı, sürgünlerdeki zarar düzeyi ve ortalama yaş ağırlık özellikleri morfolojik olarak değerlendirilmiştir. Gen ifade analizleri için 225 mM NaCl + 22.5 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ tuz konsantrasyonu kullanılmış ve tuz uygulamasından 24, 48, 96 ve 192 saat sonra mikro sürgünlerde dehydrin gen ifade profilleri incelenmiştir. Araştırma sonuçlarına göre, Ankara armudu, Quince A ve Ahlat-3 genotiplerinde tüm tuz seviyelerinde sürgün canlılık oranları yüksek değerlerde (%80.5-100.0) bulunmuştur. Ortalama sürgün sayısı ise tüm genotiplerde kontrol grubuna (4.36-8.47 adet/eksplant) kıyasla tuz uygulamaları altında istatistiksel olarak önemli düzeyde daha düşük (1.0-2.52 adet/eksplant) tespit edilmiştir. Tuz konsantrasyonunun artmasıyla birlikte sürgün kalınlığı azalmış, sürgün uzunluğu ise genellikle kontrol grubuyla benzer bulunmuştur. Bununla birlikte, yüksek tuz konsantrasyonları kallus çapı ve toplam yaş ağırlık değerlerinde azalmaya, sürgünlerde ise zarar düzeyinin artmasına neden olmuştur. En şiddetli zarar düzeyi, 300 mM NaCl + 30 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ konsantrasyonunda gözlenmiştir. Dehydrin gen ifadesi açısından Quince A, Ahlat-3, OH x F 333, Ahlat-2 (24 saat) ve Ankara armudu (48 saat) genotiplerinin tuzluluk stresine daha erken yanıt verdiği belirlenmiştir. Sonuçlar, özellikle Ahlat-3, Quince A ve Ankara armudu genotiplerinin yüksek tuz konsantrasyonlarında dahi sürgün canlılık oranlarını koruyabilmeleri nedeniyle tuz stresine karşı toleranslı olabileceğini göstermiştir.

Küçükymruk ve ark. (2015), bir yaşındaki Mazzard ve Mahlep anaçları üzerine aşılanmış 0900 Ziraat kiraz çeşidinin farklı tuzlu sulama suyu uygulamalarına verdiği tepkileri incelemiştir. Denemede, kum: tınlı toprak: torf: çiftlik gübresi (1:2:1:0.5) oranında hazırlanan bir yetiştirme ortamı kullanılmış ve tuz kaynağı olarak CaCl_2 , MgSO_4 ve NaCl kullanılmıştır. Araştırmada, dört farklı tuzlu sulama suyu konsantrasyonu uygulanmıştır. Sonuçlar, Mahlep anacı üzerine aşılı kiraz ağaçlarının, Mazzard anacı üzerine aşılı olanlara göre tuzluluğa daha dayanıklı olduğunu göstermiştir. Tuzlu su uygulamalarının, Mazzard anacı üzerine aşılı kiraz ağaçlarına daha fazla zarar verdiği tespit edilmiştir. Her iki anaç üzerine aşılanmış kiraz ağaçlarında, deneme sonunda en yüksek

zarar düzeyi 4.0 dS m^{-1} ve 6.0 dS m^{-1} seviyelerindeki tuzlu su uygulamalarında gözlemlenmiştir. Araştırmacılar, Mahlep anacının tuzluluk stresine karşı daha dayanıklı bir seçenek olabileceğini ve anaç seçiminde tuzluluk toleransının dikkate alınması gerektiğini vurgulamıştır.

Garriga ve ark. (2015), çilek bitkisinde tuzluluk stresinin vejetatif büyüme, fizyolojik parametreler ve meyve kalitesi üzerindeki etkilerini araştırmıştır. Çalışmada Camarosa çilek çeşidi, 0 mM, 30 mM ve 60 mM NaCl konsantrasyonlarına maruz bırakılmıştır. Araştırma sonuçlarına göre, tuz stresi altında bitkisel büyüme, yaprak bağıl su içeriği, pigment konsantrasyonları, verim ve meyve büyüklüğünde azalma gözlemlenmiştir. Buna karşın, prolin ve malondialdehit (MDA) konsantrasyonlarının artış gösterdiği tespit edilmiştir. *Fragaria chiloensis*'in tuzluluk stresine *F. ananassa*'dan daha toleranslı olduğu ileri sürülmüş olsa da, *F. chiloensis*'in de vejetatif gelişim açısından benzer etkiler gösterdiği bulunmuştur. Tuzluluk stresinin meyve ağırlığı üzerinde anlamlı bir etkisi saptanmamış olmakla birlikte, suda çözünabilir kuru madde (SÇKM) ve titre edilebilir asitlik gibi meyve kalitesi özellikleri üzerinde önemli bir etkisi olduğu belirlenmiştir. Araştırmacılar, çilek yetiştiriciliğinde tuzluluk stresinin fizyolojik ve kalite parametreleri üzerindeki etkisini vurgulamış ve genotipler arası tolerans farklılıklarının önemine işaret etmiştir.

Yu-peng ve ark. (2018), Actinidia türüne ait dört farklı genotipin (Acva-1, Acva-2, Acva-3 ve ZM-2) üç farklı tuz konsantrasyonunda yetiştirilerek büyüme, fizyolojik ve biyokimyasal göstergeler üzerindeki etkilerini araştırmıştır. Çalışmada, yapraklarda gözlenen hasar belirtilerine dayanarak bir Tuz Hasarı İndeksi (Salt Damage Index, SDI) geliştirilmiştir. Araştırma sonuçlarına göre, SDI'nin artan tuz konsantrasyonlarıyla kademeli olarak yükseldiği ve yeni sürgünlerin sayısı ile uzunluğunda önemli azalmalar olduğu tespit edilmiştir. Üç antioksidan enzim ve iki ozmotik ayarlama maddesinin, dört genotipin eski ve yeni yapraklarında farklı düzeylerde değişiklik gösterdiği belirlenmiştir. Spad değerleri, Acva-2 genotipinin yeni yaprakları hariç diğer genotiplerde azalma göstermiştir. Tuz konsantrasyonlarındaki artışla birlikte malondialdehit (MDA) içeriğinde bir artış, kök aktivitesinde ise bir azalma gözlemlenmiştir. Tuz toleransını değerlendirmek için temel bileşen analizi uygulanmış ve sonuçlar Acva-3 genotipinin tuza karşı en yüksek toleransı gösterdiğini ortaya koymuştur. Araştırmacılar, Actinidia türlerinde genotipe bağlı olarak tuz stresine karşı farklı adaptasyon mekanizmalarının bulunduğunu ve özellikle Acva-3 genotipinin yüksek tuz toleransı ile öne çıktığını belirlemiştir.

Mahouachi (2018), iki farklı mango anaç fidanı (13/1 ve Gomera-3) üzerinde tuz stresine tolerans veya duyarlılık düzeylerini belirlemek amacıyla bir çalışma gerçekleştirmiştir. Araştırmada, fidanlar 175 gün boyunca 50 mM NaCl içeren bir su çözeltisine maruz bırakılmıştır. Çalışma sonuçlarına göre, 13/1 anaçlarında tuz uygulamasının başlamasından itibaren dört ay boyunca herhangi bir olumsuz etki görülmezken, Gomera-3 anaçlarında tuz uygulamasının 64. gününden itibaren yaprak sayısında bir azalma tespit edilmiştir. Tuz stresi, Gomera-3 anaçlarında yaprakların taze ve kuru ağırlıklarını azaltırken, 13/1 anaçlarında yaprak biyokütlesi üzerinde herhangi bir değişikliğe neden olmamıştır. Bu bulgular, tuz konsantrasyonunun her iki anaçta fonksiyonel yaprak

sayısını farklı şekillerde etkilediğini göstermiştir. Ancak, tuzluluk 13/1 anaçlarında nispi kök uzunluğu büyümesini Gomera-3 anaçlarına kıyasla daha erken ve daha belirgin şekilde azaltmıştır. Bitkilerin beslenme durumuyla ilgili olarak, tuzluluk her iki anaçta Na^+ ve Cl^- konsantrasyonlarını artırmış, ayrıca yalnızca 13/1 anaçlarında K^+ seviyelerinde artışa neden olmuştur. Bununla birlikte, tuz stresi diğer besin maddelerinin konsantrasyonlarını önemli ölçüde değiştirmemiştir. Sonuç olarak, yaprak kuruma oranı, K^+ artışı ve uzun süreli tuz stresine bağlı prolin birikiminin gecikmesi gibi parametreler göz önünde bulundurulduğunda, 13/1 anaçlarının Gomera-3 anaçlarına kıyasla uygulanan tuz stresine karşı daha toleranslı olduğu belirlenmiştir.

Ferreira ve ark. (2019), beş farklı çilek çeşidini dört farklı tuzluluk seviyesi altında arazi koşullarında yetiştirerek tuzluluğun etkilerini değerlendirmiştir. Araştırma sonuçlarına göre, artan tuzluluk seviyesi tüm bitki dokularında Cl^- iyonunun, kök ve saplarda ise Na^+ seviyelerinin artmasına neden olmuştur. Bununla birlikte, yapraklarda gözlenen toksik etkilerin Cl^- iyonuna bağlı olduğu, Na^+ iyonunun bu etkilerde belirleyici bir rol oynamadığı tespit edilmiştir. Çalışmada, tüm çilek çeşitlerinde tuzluluk seviyesinin 1.0 dS m^{-1} kadar artırılması durumunda bile meyve veriminde anlamlı düşüşler olduğu belirlenmiştir. Araştırmacılar, tuzluluğun çilek bitkilerinde hem fizyolojik hem de üretim performansı üzerinde olumsuz etkiler oluşturduğunu saptamıştır.

Yaghubi ve ark. (2019), Kürdistan ve Paros çilek çeşitlerinde sodyum klorür (NaCl) kaynaklı tuzluluk stresinin meyve kalitesi üzerindeki etkilerini ve bu süreçte potasyum silikat uygulamasının rolünü incelemiştir. Araştırma, potasyum silikatın tuzluluk stresi altında yetiştirilen çileklerde kuru madde miktarını artırmak için etkili bir yöntem olduğunu ortaya koymuştur. Çalışmada, Kürdistan çilek çeşidinin yapraklarının kuru ağırlığını daha yüksek seviyelerde koruyarak fotosentetik aktivitesini sürdürme eğiliminde olduğu belirlenmiştir. Potasyum silikatın inhibitör etkisiyle bitkilerde köklerden sodyum alımının daha verimli bir şekilde gerçekleştiği saptanmıştır. Ayrıca, potasyum silikatın çilek meyvesinin tadını belirleyen ana faktörlerden biri olduğu tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra, tuzluluk bulunan ya da bulunmayan koşullarda, potasyum silikat uygulamasının Paros çilek çeşidinde fenol ve flavonoid içeriklerini artırdığı belirlenmiştir. Sonuç olarak, potasyum silikat uygulamasının çilek bitkilerinde sadece tuzluluk stresi altında büyümeyi ve verimi korumada etkili olmakla kalmayıp, aynı zamanda meyve kalitesi özelliklerini ve sağlık açısından önemli bileşenleri geliştirdiği görülmüştür.

2.3. Ceviz Ağaçlarında Tuzluluk Stresi Koşullarında RNA-Seq ile İlgili Yapılan Çalışmalar

Yang ve ark. (2017), cevizde iki WRKY transkripsiyon faktörü genini (*JrWRKY6* ve *JrWRKY53*) tanımlamış ve bu genlerin stres koşullarında ifade edildiğini ortaya koymuştur. Çalışmada, *JrWRKY6* ve *JrWRKY53* genlerinin tuzluluk stresine maruz kalan bitkilerde 24 ve 48 saat içinde en yüksek indüksiyonu gösterdiği, bu düzenlemenin kökler hariç kısa sürede gerçekleştiği belirlenmiştir. Araştırma sonuçları, *JrWRKY6* ve *JrWRKY53* genlerinin tuzluluk, ozmotik stres ve anormal sıcaklıklara karşı toleransı artırmada önemli bir rol oynayabileceğini göstermiştir. Bu

genlerin, abiyotik streslere karşı bitkilerin uyum mekanizmalarında ABA sinyal yolu ve W-box bağlanma aktivitesi yoluyla olumlu bir tepki verdiği tespit edilmiştir. Araştırmacılar, WRKY transkripsiyon faktörlerinin cevizde abiyotik streslere karşı genetik dayanıklılığı artırmak için önemli hedefler olabileceğini ve bu genlerin stres toleransını artırmada potansiyel olarak kullanılabileceğini belirlemiştir.

Liu ve ark. (2020), ceviz bitkisinin stres koşullarına karşı direnç mekanizmalarını araştırmak amacıyla, strese dirençle ilişkili aday genleri incelemiştir. Çalışmada, *JrERF2-2* geninin stres yanıt mekanizmalarındaki rolünü daha ayrıntılı olarak belirlemek için iki yaşındaki aşılı Xiangling ceviz fidanları tuzluluk, kuraklık ve ABA stresine maruz bırakılmıştır. Tuz stresi, 0.3 mol/L sodyum klorür (NaCl) kullanılarak 0, 3, 12 ve 24 saat süreyle uygulanmıştır. Kuraklık stresi, 100 g/kg PEG6000 kullanılarak 0, 3, 4 ve 5 gün süreyle indüklenmiş; ABA uygulaması ise 0.1 mmol/L ABA kullanılarak 0, 3, 24 ve 48 saat süreyle gerçekleştirilmiştir. Araştırma sonuçları, NaCl stresi altında *JrERF2-2* geninin ekspresyon seviyelerinin zamanla arttığını göstermiştir. Bu bulgular, *JrERF2-2*'nin ERF transkripsiyon faktör ailesinin önemli bir üyesi olduğunu ve diğer türlerdeki homologlarıyla benzer işlevlere sahip olabileceğini ortaya koymuştur. Çalışmada, *JrERF2-2* geninin, ceviz bitkisinin olumsuz çevresel koşullara adaptasyonunda rol oynayan önemli bir aday gen olduğu belirlenmiştir.

Liu ve ark. (2022), ceviz genom veri tabanında yirmi bir *TIFY* transkripsiyon faktörünü tanımlamış ve biyoinformatik analizler yoluyla bu genleri dört alt aileye (*TIFY*, *JAZ*, *ZML* ve *PPD*) ayırmıştır. Filogenetik analizler, *JrTIFY* genlerinin, *Arabidopsis thaliana*'daki *TIFY* gen ailesi ile yakından ilişkili olduğunu ortaya koymuştur. qRT-PCR (kantitatif gerçek zamanlı PCR) analizi, *TIFY* genlerinin kuraklık, sıcaklık ve tuz stresi altında 'Qingxiang' ve 'Xiangling' ceviz çeşitlerinde farklı ifade modellerine sahip olduğunu göstermiştir. Araştırmada, *JAZ* alt ailesinin farklı abiyotik stres koşullarında diğer alt ailelere kıyasla daha fazla ifade edildiği belirlenmiştir. Özellikle, *JrTIFY14* geninin ısı ve tuz stresi altındaki ekspresyon seviyelerinin, kuraklık stresi altındakilere göre önemli ölçüde daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

2.4. Diğer Meyve Ağaçlarında Tuzluluk Stresi Koşullarında RNA-Seq ile İlgili Yapılan Çalışmalar

Radwan ve ark. (2015), hurma ağacının (*Phoenix dactylifera* L.) tuzluluk koşullarında stres toleransı ile ilişkili genleri belirlemek ve ileri düzey fonksiyonel çalışmaları desteklemek amacıyla transkriptomik bir analiz gerçekleştirmiştir. Çalışmada, Deglet Nour ve Beida hurma çeşitlerine ait genç kökler tuz uygulamasına maruz bırakılmıştır. Araştırmada RNA-Seq ekspresyon profili ve transmisyon elektron mikroskobu (TEM) analizleri kullanılmıştır. RNA-Seq analizi sonucunda toplam 1,939 gen belirlenmiş ve bu genlerin birçoğunun tuz stresine toleranslı işlevsel roller oynadığı tespit edilmiştir. Ayrıca, RNA-Seq analizi ile SNF1 ile ilişkili kinaz 2 protein boyunca ABA sinyal yollarının aktif olduğu ortaya konulmuştur. TEM analizi ise, tuz stresine maruz kalan köklerin distal bölgelerindeki kortikal hücrelerde plazmoliz gözlemlendiğini, ancak epidermal hücrelerde böyle bir

durumun saptanmadığını göstermiştir. Araştırmanın sonuçlarına göre, hurma ağacında tuz stresine toleransla ilişkili genetik mekanizmaların ve hücrel adaptasyon süreçlerinin daha iyi anlaşılmasına katkı sağladığı belirlenmiştir. Ayrıca, çalışmada elde edilen genetik ve morfolojik veriler, tuzluluk stresine karşı dayanıklı hurma çeşitlerinin geliştirilmesi için değerli bir temel sunmuştur

Li ve ark. (2017), tuz stresinin armutun (*Pyrus spp.*) büyümesini, meyve verimini ve kalitesini olumsuz etkilediğini, bu stresle başa çıkmak için armut yetiştiriciliğinde genellikle *Pyrus betulaefolia* anacının kullanıldığını belirtmişlerdir. Ancak *Pyrus betulaefolia*'nın genomik bilgisinin sınırlı olması, tuzluluk toleransının altında yatan mekanizmaların detaylı bir şekilde araştırılmasını engellemiştir. Bu çalışmada, yaprak ve köklere NaCl+LiCl₃ uygulamaları yapılarak, tuzluluk stresi altında RNA-Seq kullanımıyla gen ekspresyonlarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Harita analizlerine dayalı olarak 18 farklı eksprese edilmiş geni içeren toplam 3,796 yeni transkript tespit edilmiştir. Ayrıca transkripsiyon başlangıç yerleri, terminal bölgeleri ve ekleme desenleri incelenmiş ve 90,752 alternatif ekleme olayı tanımlanmıştır. Bunun yanı sıra, 583 DEG ekzonun varlığı belirlenmiştir. Çalışmada *Pbr038831.1* geninin tüm uygulamalarda farklı şekilde ifade edildiği saptanmıştır.

Jazi ve ark. (2017), iki fıstık çeşidinin 24 farklı dokusunu temsil eden havuzlanmış numunelerin RNA sekanslamasını gerçekleştirmiştir. Araştırmada, kontrol ve tuz muamelesi altında RNA sekanslaması Illumina HiSeq 2000 platformu ile gerçekleştirilmiş ve tuzluluk toleransı altında toplam 368,953,262 okuma ile kontrol koşullarında 100 bp okuma elde edilmiştir. Bu çalışma, *P. vera*'nın tüm transkriptom analizine ilişkin ilk rapor niteliğinde önemli bir kaynak sağlamıştır. Araştırmacılar, bu ana ağaç üzerinde yapılan fonksiyonel ve karşılaştırmalı genomik çalışmaların, tuzluluk toleransına yönelik genetik mekanizmaların keşfedilmesine katkı sunduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca, elde edilen bulgular, daha fazla tuzluluk toleransına sahip yeni fıstık çeşitlerinin geliştirilmesi için belirteçler ve strese yanıt mekanizmaları sunmuştur.

Wu ve ark. (2018), elmada tuz stresi ve soğuk etkisi üzerine negatif bir düzenleyici olan *MdMYB44* transkripsiyon faktörünün fonksiyonel karakterizasyonunu belirlemeyi amaçlamışlardır. Çalışmada, beş yaşındaki *Golden Delicious* elma çeşidinin kök dokusu, yaprak, kök, çiçek ve meyve parçalarından *MdMYB44* geni eksprese edilmiştir. Filogenetik analizler, *MdMYB44* proteininin *Arabidopsis thaliana*'nın MYB44 proteini ile yüksek düzeyde homolog olduğunu ortaya koymuştur. Araştırmacılar, *MdMYB44* geninin, elmada tuzluluk ve soğuk stresine karşı yanıt mekanizmalarında önemli bir rol oynayabileceğini ve negatif regülasyon yoluyla bu streslere adaptasyonu etkileyebileceğini saptamıştır.

Li ve ark. (2019), in vitro yetiştirilen elma bitkilerini kuraklık, tuzluluk ve soğuk stresine maruz bırakarak, transkriptom profil analizi yoluyla gen ekspresyonlarını incelemiştir. Çalışmada, stres koşulları altında DEG'ler tespit edilmiş ve bu genlerin regülasyonu değerlendirilmiştir. Gen Ontolojisi (GO) analizi, "biyolojik süreç" kategorisinde özellikle "metabolik süreç" altında, "bağlayıcı" ve "katalitik faaliyet" alt kategorilerinde zenginleşmeler olduğunu ortaya koymuştur. Kyoto Gen ve Genom Ansiklopedisi (KEGG) yolu analizi ise ortak DEG'lerin çoğunlukla "biyolojik

fonksiyonlar" kategorisine ait olduğunu göstermiştir. Ayrıca, 17 DEG'in "çevresel bilgi işleme" alt kategorisinde sinyal işleyici olarak tanımlandığı belirlenmiştir.

Ya-bin ve ark. (2019), kivi (*Actinidia spp.*) bitkisinin sıcaklık, kuraklık, soğuk ve fitopatojen gibi çevresel streslere karşı oldukça hassas bir meyve türü olduğunu belirttikleri çalışmalarında, stres direncinin iyileştirilmesi amacıyla kivi çeşitlerinde strese duyarlı aday genleri tanımlamayı hedeflemiştir. Araştırmada, kuraklık, tuzluluk ve soğuk stresi koşulları altında ifade edilen yeni bir kivi geni homoloğu olan R1R2R3-MYB (*AcMYB3R*) geninin izolasyonu ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. İn vitro analizler sonucunda, *AcMYB3R* proteininin, hücre döngüsünde G2/M aşamasında görev alan faza özgü *KNOLLE* geninin ortoloğunun cis elemanına bağlanarak transkripsiyonel aktivasyon yeteneğine sahip bir nükleer protein olduğu tespit edilmiştir.

Ma ve ark. (2021), elmada tuza dayanıklı çeşitlerin belirlenmesi ve tuza tolerans mekanizmalarının aydınlatılması amacıyla *miR156/SPL* düzenleyici genini araştırmıştır. Çalışmada, elmada tuz stresini düzenleyen *miR156/SPL* mekanizmasını incelemek için hem *mdm-MIR156a* hem de *MdSPL13* genlerinin tuz stresine yanıt verdiği, ayrıca *MdSPL13* geninin *mdm-MIR156a*'nın hedefi olduğu doğrulanmıştır. Bu amaçla, RLM-5' RACE ve stabil genetik transformasyon teknolojisi uygulanmıştır. Araştırmada, *MIR156a* geninin aşırı ekspresyonunun elmada tuz direncini zayıflattığı, buna karşın *MdSPL13* geninin aşırı ekspresyonunun tuz direncini güçlendirdiği belirlenmiştir. *MdSPL13OE* transgenik bitkilerinin RNA-Seq analizi, transgenik olmayan elma bitkileriyle karşılaştırıldığında toplam 6094 DEG geninin varlığını ortaya koymuştur.

Qin ve ark. (2022), elmada GDDH13 genomu üzerinde gerçekleştirdikleri çalışmada toplam 113 *WRKY* geni tanımlamışlardır. Farklı gruplardan seçilen yedi *WRKY* geninin tümünün çekirdekte lokalize olduğu tespit edilmiştir. Çalışmada, 113 *MdWRKY* geni arasında hem tuzluluk hem de kuraklık stresine yanıt veren önemli bir gen olan *MdWRKY70L* geninin varlığı belirlenmiştir. Araştırmacılar, *MdWRKY70L*'nin abiyotik streslere karşı elmada önemli bir rol oynayabileceğini belirlemiş ve bu genin, stres toleransı artırmaya yönelik genetik çalışmalar için değerli bir hedef olabileceğini saptamıştır.

Yu ve ark. (2022), bademde (*Prunus dulcis*) *PdWRKY* gen ailesinin farklı doku ekspresyon modellerini incelemiş ve *PdWRKY* genlerinin dokuya özgü ekspresyon özelliklerine sahip olduğunu ortaya koymuştur. qRT-PCR analizi, *PdWRKY* genlerinin düşük sıcaklık, kuraklık ve tuz stresi gibi abiyotik stres koşullarına karşı direnç mekanizmalarına katıldığını ve bu genlerin ifade seviyelerinin zamanla değişiklik gösterdiğini tespit etmiştir. Çalışmada, *PdWRKY* gen ailesi üzerinde sistematik biyoinformatik analiz ve abiyotik stres araştırmaları gerçekleştirilmiş ve bu genlerin bademde stres toleransına yönelik genetik çalışmalar için temel oluşturabileceği vurgulanmıştır. Çalışmanın sonuçlarına göre, bademde abiyotik stres toleransının artırılmasına yönelik ileri genetik araştırmalarda *PdWRKY* genlerinin önemli bir hedef olabileceğini göstermiştir.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

Bu çalışma Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Uygulama ve Araştırma Çiftliği'nde bulunan plastik serada ve Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Moleküler Genetik Laboratuvarı'nda yürütülmüştür.

Çalışmada kullanılan toplam 21 ceviz çeşidine ait tohumlar, Yalova Atatürk Bahçe Kùltürleri Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü ile Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Araştırma alanında bulunan ve 2008 yılında kurulan kapama ceviz bahçesinden temin edilmiştir. Bu çeşitlere ait tohumlar 10 Kasım 2020 tarihinde katlama işlemine alınmıştır.

Araştırmada kullanılan toplam 21 ceviz çeşidi şunlardır: Kaman-1, Oğuzlar-77, Howard, Sölez-1, 98/115, 214/47, 77-H-1, 230-37, KM-2, Antalya-3, Yalova-3, Maraş-18, Maraş-12, Şen-1, Serr, Chandler, Pedro, Şebin, Midland, Hartley ve Fernor. Çeşitlere ait tohum sayıları Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Katlamaya Alınan Ceviz Çeşitleri ve Tohum Sayıları

Çeşitler	Tohum Sayıları (Adet)	Çeşitler	Tohum Sayıları (Adet)
Kaman-1	194	98/115	235
Serr	187	214/47	156
Hartley	197	230-37	197
Oğuzlar-77	168	77-H-1	210
Maraş-18	223	Fernor	215
Maraş-12	213	Şen-1	216
Şebin	187	KM-2	191
Midland	210	Antalya-3	203
Howard	186	Yalova-3	146
Sölez-1	207	Chandler	211
Pedro	207	-	-

3.1.1. Ceviz Çeşitlerinin Tohumlarının Katlamaya Alınması

Katlama işleminde, bir kişinin rahatlıkla taşıyabileceği boyutlarda olan meyve kasaları (eni 40 cm, boyu 60 cm, derinliği 40 cm) kullanılmıştır. Her bir kasanın tabanına yaklaşık 4 cm kalınlığında Nevşehir menşeli pomza serilmiş ve bu tabaka üzerine ceviz tohumları tek tek yerleştirilerek ekim gerçekleştirilmiştir. Her sırada 10 adet tohum bulunacak şekilde, yatayda 6 sıra oluşturulmuş ve böylece her katmanda toplam 60 adet ceviz tohumu ekilmiştir. Bu tohumların üzeri yaklaşık 3 cm kalınlığında pomza ile örtülmüş, ardından aynı düzen takip edilerek bir sıra tohum bir sıra pomza şeklinde kasa tamamen doluncaya kadar katlama işlemi sürdürülmüştür. Her bir kasa bu yöntemle yaklaşık 240 adet ceviz tohumu içerecek şekilde düzenlenmiştir. Katlamanın son

aşamasında, en üst kısma konulan pomza tabakasının diğer katmanlara kıyasla daha kalın olmasına özen gösterilmiştir.

Katlama işlemi tamamlandıktan sonra, kasalar süzgeçli kovalar yardımıyla yeterli oranda nemlendirilmiş ve ardından Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü'ne ait, sıcaklığı 4 °C'ye ayarlanmış olan soğuk hava deposuna yerleştirilmiştir (Şekil 3.1). Tohumların su kaybına uğramasını önlemek amacıyla, kasalar yaklaşık 10 günde bir yeniden sulanarak nem düzeyinin korunması sağlanmıştır. Katlama süreci boyunca düzenli kontroller yapılmış ve tohum kabuklarının çatlayarak kök ucunun (radikula) görünmesiyle birlikte katlamaya son verilmiştir.



Şekil 3.1. Ceviz tohumlarının katlamaya alınması ve katlamaya alınan ceviz tohumlarının depodaki görünümü

3.1.2. Çimlendirme Ortamının Hazırlanması ve Ceviz Çeşitlerine Ait Tohumların Ekimi

Denemede, katlamadan çıkarılan ceviz tohumları ilk önce Kokopit:Perlit (2:1) ortamı hazırlanmış viyollere ekilmiştir. Bu işlemin yapılmasının nedeni ceviz tohumlarının kök yapılarının ve oluşacak sürgünlerin hemen hemen aynı standartta olmasının sağlanmasıdır (Şekil 3.2 ; Şekil 3.3).



Şekil 3.2. Viyollere doldurulacak ortamın hazırlanması



Şekil 3.3. Viyollerin doldurulması ve katlamadan çıkarılan ceviz tohumunun görünümü

3.1.3. Çimlenen Ceviz Tohumları İçin Fidan Torbası Ortamının Hazırlanması ve Şaşırtma İşleminin Yapılması

Çimlenen ceviz tohumları için “Toprak: Nevşehir Pomzası: Çiftlik Gübresi (2:1:0.5)” karışımı hazırlanmıştır. Hazırlanan ortam fidan torbalarına doldurulmuş ve plastik sera içerisinde torbaların dik durmasının sağlanması için demir profilden yapılmış bölmelere konulmuştur (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Toprak: Nevşehir Pomzası: Çiftlik Gübresi (2:1:0.5) Ortamı ve Fidan Torbalarının Doldurularak Plastik Seraya Konulması

Ceviz tohumlarının viyollerde çimlenmesinin tamamlamasından sonra fidan torbasına şaşırtılmış ve hemen ardından can suyu verilmiştir (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Viyollerde çimlenen ceviz tohumlarının fidan torbalarına şaşırtılması

Viyollerde çimlenen ve fidan torbalarına şaşırtılan ceviz tohumlarının sayıları Çizelge 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Fidan torbalarına aktarılan ceviz tohumlarının sayıları

Çeşitler	Tohum Sayıları (Adet)	Çeşitler	Tohum Sayıları (Adet)
Chandler	101	Sölez-1	154
Serr	124	214/47	80
Yalova-3	109	Midland	102
Antalya-3	89	77-H-1	75
Fernor	135	Pedro	115
Oğuzlar-77	96	KM-2	127
Howard	115	Kaman-1	115
98-115	120	Maraş-18	107
Maraş-12	142	230-37	88
Şen-1	96	Hartley	104
Şebin	96	-	-

3.2. Metod

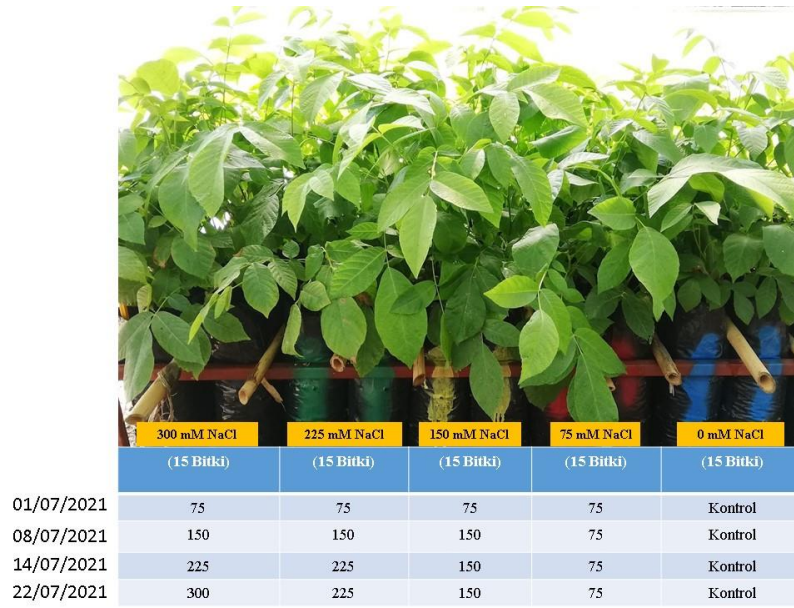
3.2.1. Fidanların Tuz Stresine Maruz Bırakılmaları

Denemede, ceviz çeşitlerine ait fidanlara NaCl (Sodyum Klorür) uygulanmıştır. NaCl çözeltisi 01.07.2021 tarihinde uygulanmaya başlanmış ve ceviz fidanlarına farklı dozlarda uygulanmıştır. Uygulama doz seviyeleri;

- 1) 0 mM (Kontrol)
- 2) 75 mM NaCl
- 3) 150 mM NaCl

- 4) 225 mM NaCl
- 5) 300 mM NaCl oranında uygulama yapılmıştır.

Denemede yer alan 0 mM (Kontrol) bitkilerine 500 ml sulama suyu verilmiş ve tuz uygulaması yapılacak bitkilere ise her bir fidan torbasına 500 ml NaCl solüsyonlu su verilerek fidan torbasından tamamen süzülüp tabanından akmaya başlayana kadar olacak şekilde yapılmıştır. NaCl seviyeleri, ilk hafta 75 mM dozundan başlayarak her dozun kendi seviyesine ulaşınca kadar artış göstererek devam edilmiştir (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. Ceviz fidanlarına tuz uygulama dozları ve uygulama tarihleri

3.2.2. Fidanlarda Tuz Stresi ve Uygun Doz Seviyesinin Belirlenmesine Yönelik Analizler

Tuzluluk stresinin belirlenmesi için ilk önce doz belirlemesi yapılmıştır. Doz belirlemek için her çeşitten 3 tekerrürlü 5 bitki seçilerek ve aşağıdaki analizler sonucunda uygun doz belirlenmiştir.

1. Skala ile genotiplerin görsel olarak değerlendirilmesi
2. Bitki boyu (cm)
3. Yaprak sayısı (Adet / Bitki)
4. Yaprak oransal su içeriği (RWC) (%)
5. Kök kuru madde miktarı (%)
6. Klorofil için SPAD metre ile ölçüm yapılması
7. Yaprak sıcaklığının belirlenmesi (°C)
8. Canlılık oranı (%)

Skala ile Genotiplerin Görsel Olarak Değerlendirilmesi

Bitkilerde tuz stresine bağlı zararlanma belirtilerini değerlendirmek amacıyla 0-5 arası bir skala kullanılmıştır. Genç bitkilerde tuz stresi etkisinin şiddetini, bitkilerin görünüşlerine dayanarak belirlemek için bu skala geliştirilmiştir. Skalalar, ön denemeler yapılarak oluşturulmuş ve bitkilerin zararlanma derecesine göre 0'dan 5'e kadar puanlama yapılmıştır.

Tuz stresine tolerans taraması çalışmalarında aşağıda belirtilen semptomlara göre 0'dan 5'e kadar puan verilmiştir. (Kusvuran ve ark. 2011; Daşgan ve ark., 2012; Akhoundnejad ve ark., 2013).

0: Hiç etkilenme yok (kontrol bitkileri)

1: Büyümede yavaşlama

2: Alt yapraklarda solgunluk başlangıcı

3: Üst yapraklarda kıvrılma (kapanma) ve solgunluk, sararmalar (yaprakların % 30 civarı)

4: Yaprakların %80 ve fazlasında şiddetli solgunluk ve sararma, yaprak kenarlarında kuruma başlangıcı

5: Bitkide tamamı ile solma ve alt yapraklarda kurumalar veya ölüm.

Bitki Boyu (cm)

Deneme sonunda bitkilerin kök boğazından büyüme ucuna kadar olan bölge cm cinsinden metre ile ölçülmüştür.

Yaprak Sayısı (adet / bitki)

Deneme tamamlandığında bitki üzerindeki tüm yapraklar sayılmıştır.

Yaprak Oransal Su İçeriği (RWC) (%)

Her bir bitki yaprağının yaş ağırlıkları (g), hassas terazide ± 0.1 hassasiyetle ölçülmüştür. Daha sonra, yaprak örnekleri saf su dolu kaplarda 24 saat süreyle bekletilmiş ve yeniden tartılarak turgor ağırlıkları (g) elde edilmiştir. Aynı yaprak örnekleri, 65°C'de bir etüvde 48 saat boyunca kurutularak kuru ağırlıkları (g) kaydedilmiştir. Stres altında bulunan ve kontrol grubu bitkilerine ait yaş, turgor ve kuru ağırlık verileri kullanılarak, bitkilerin tuzluluk stresine karşı etkinlik değerleri hesaplanmıştır. Yaprak oransal su içeriği (RWC), aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır:

$$RWC = \left(\frac{\text{Yaş Ağırlık (FW)} - \text{Kuru Ağırlık (DW)}}{\text{Turgor Ağırlık (TW)} - \text{Kuru Ağırlık (DW)}} \right) \times 100$$

Kök Kuru Madde Miktarı (%)

Her bir bitkiye ait kök kısımları hassas terazide tartılarak g olarak (± 0.1) yaş ağırlıkları tespit edilmiş, daha sonra 65 °C etüvde 48 saat kurutulduktan sonra kök kuru ağırlık g olarak

kaydedilmiştir. Stres ve kontrol bitkilerinin kök yaş ve kuru ağırlıkları kullanılarak bitkilerin tuz etkinlik değerleri hesaplanmıştır. Kök kuru madde miktarı aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\%KuruMadde = \left(\frac{\text{Kuru Ağırlık (KA)}}{\text{Taze Ağırlık (TA)}} \right) \times 100$$

SPAD Metre ile Klorofil Ölçümü

Tuz ve kontrol koşulları altında yetiştirilen ceviz bitkilerinde tepeden 5.yaprakta klorofil miktarına bağlı değişen yeşilin tonunu belirlemek amacı ile Minolta SPAD metre cihazı ile okumalar gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. SPAD Metre ile Klorofil Ölçümünün yapılması

Yaprak Sıcaklığının Belirlenmesi (°C)

Yaprak sıcaklıkları, Spectrum marka bir infrared termometre kullanılarak, bitkilerin üstten üçüncü veya dördüncü yapraklarında günün belirli bir zaman dilimi olan 11.00-15.00 saatleri arasında ölçülmüştür.

Canlılık Oranı (%)

Deneme sonunda elde kalan toplam bitkinin yüzde olarak ifadesi ile hesaplanmıştır.

3.2.3. Fidanlarda Tuz Stresi ve Uygun Doz Seviyesinin Belirlenmesinin Ardından Toleranslı ve Hassas Ceviz Çeşitlerinde Tuzluluk Stresine Yönelik Analizler

Tuzluluk stresine dayanımı belirlenen Serr, Sölez-1, Maraş-18, Hartley, Chandler ve Fernor ceviz çeşitlerine ait analizlerin yapılması amacı ile bu çeşitlerin tohumları Yalova Atatürk Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'nden temin edilmiştir ve Bahçe Bitkileri Bölümü

Araştırma ve Uygulama Alanında bulunan soğuk hava deposunda 01/11/2021 tarihinde katlamaya alınmıştır (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. Sölez-1, Serr, Maraş-18, Chandler, Fernor ve Hartley ceviz çeşitlerine ait tohumların Nevşehir pomzası dolu ortamda katlamaya alınmasının görünümü

Denemenin bir sonraki aşamasında belirlenen dayanıklı ve hassas çeşitlere ait tohumların katlamadan çıkartılarak fidan torbalarına şaşırtma işlemi yapılmıştır. Bu işlemin ardından fidanların yeterli büyüklüğe ulaştığında belirlenen tuz dozunun uygulanmasıyla birlikte fizyolojik ve morfolojik ölçümler yapılmıştır. Denemede belirlenen toleranslı ve hassas çeşitlere ait tohumlar fidan torbalarına 10/02/2022 tarihinde şaşırtılmıştır (Şekil 3.9).



Şekil 3.9. Tohumların Fidan Torbasına Şaşırtılması ve Cansuyu İşleminin Yapılması

Tohumların çimlenmesinin ardından tuz uygulaması (150 mM NaCl) yapılacak olan ve kontrol (0 mM) olarak uygulama yapılacak bitkiler belirlenmiştir (Şekil 3.10).



Şekil 3.10. Tohumların çimlenmesi ve tuz uygulaması yapılacak bitkilerin belirlenmesi (Sarı: 150 mM – Mavi: Kontrol (0 mM))

Denemede tuz uygulaması 07/06/2022 tarihinde kademeli olarak arttırılarak uygulanmaya başlanmıştır (Şekil 3.11).



Şekil 3.11. Denemede belirlenen cevizlere tuz uygulamasının (150 mM NaCl) yapılması

Bu çalışma Yang ve ark. (2017)'nin kullanmış olduğu tuz uygulama dönemleri baz alınarak yapılmıştır. Bu doğrultuda belirlediğimiz 3 adet hassas ve 3 adet tolerans olmak üzere toplam 6 adet ceviz çeşidinin tuzluluğa karşı belirti gösterme durumlarına göre 24. ve 48. saatlerde örnekler alınmıştır. Ancak 48. saat örneklerinde bitkide oluşan hasarların fazla olması sebebiyle 24. saat örneklerinde fizyolojik ve biyokimyasal analizler yapılmıştır.

Her bir çeşitten 3 tekerrürlü 5 bitki seçilerek aşağıdaki analizler yapılmıştır.

1. Yaprak sıcaklığının belirlenmesi ($^{\circ}\text{C}$)
2. SPAD metre ile klorofil ölçümü
3. Yaprak sayısı (adet/bitki)
4. Yaprak ozmotik potansiyelinin belirlenmesi (MPa)
5. Yaprak oransal su içeriği (%)

6. Yaprak hücrelerinde membran zararlanmasının belirlenmesi (%)
7. Yaprak su potansiyelinin belirlenmesi (MPa)
8. Yaprak kuru madde miktarı (%)
9. Yaprak alanı (cm² /bitki)
10. Prolin analizi
11. Yeşil aksamda ve köklerde potasyum, kalsiyum, sodyum ve klor konsantrasyonu (µg / g kuru ağırlık veya %)
12. İstatistiksel analizler

Yaprak Sıcaklığının Belirlenmesi (°C)

Yaprak sıcaklıkları, Spectrum marka bir infrared termometre kullanılarak, bitkilerin üstten üçüncü veya dördüncü yapraklarında günün belirli bir zaman dilimi olan 11.00-15.00 saatleri arasında ölçülmüştür.

SPAD metre ile Klorofil Ölçümü

Tuz ve kontrol koşullarında yetiştirilen ceviz bitkilerinde, tepeden beşinci yapraktaki klorofil miktarına bağlı olarak yeşil rengin tonlarındaki değişimi belirlemek için Minolta SPAD metre cihazı kullanılarak ölçümler yapılmıştır (Şekil 3.12).



Şekil 3.12. SPAD Metre ile Klorofil Ölçümünün yapılması

Yaprak Sayısı (adet / bitki)

Deneme tamamlandığında bitki üzerindeki tüm yapraklar adet olarak sayılmıştır.

Yaprak Ozmotik Potansiyelinin Belirlenmesi (MPa)

Denemede yer alan cevizlerin 3. ve 4. yapraklarından 1 gram örnek alınarak, 19 ml saf su ile porselen havanda homojenize edilmiştir. Elde edilen homojen karışım, mikro filtreden geçirildikten sonra Gonatec marka ozmometre cihazında, 50 µl örnek kullanılarak Cryoscopic prensibine göre

Osmomat 030 model ozmometrede ölçüm gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.13). Okumalar Osmol/ kg olarak cihazdan okunup kaydedildikten sonra, bu değerler MPa birimine dönüştürülmüştür (Daşgan ve ark., 2010).



Şekil 3.13. Yaprak ozmotik potansiyelinin belirlenmesi ile ilgili hazırlıklar ve Ozmometre Cihazının Görünümü

Yaprak Oransal Su İçeriğinin Belirlenmesi

Yaprak oransal su içeriği (YOSİ) hesaplaması, Sánchez ve ark. (2004) ile Türkan ve ark. (2005) yöntemlerine göre gerçekleştirilmiştir. Tuz uygulaması yapılan ve yapılmayan ceviz bitkilerinde, uygulama sonunda yaprak örnekleri alınmıştır. Oransal su içeriğini belirlemek için öncelikle yaprakların taze ağırlıkları ölçülmüştür. Daha sonra yapraklar, 4 saat boyunca saf su içerisinde bekletilmiş ve ardından yüzeyleri kurularak turgor ağırlıkları belirlenmiştir. Turgor ağırlıkları ölçülen yapraklar, 65 °C'de 48 saat boyunca etüvde kurutularak kuru ağırlıkları gram olarak kaydedilmiştir. Taze ve kuru ağırlıklar aşağıdaki formül kullanılarak oranlanmış ve yaprak oransal su içerikleri (%) hesaplanmıştır (Şekil 3.14).

$$(TA-KA)/(TuA-KA) \times 100$$

TA: Taze Ağırlık KA: Kuru Ağırlık TuA: Turgor Ağırlığı



Şekil 3.14. Yaprak oransal su içeriğinin belirlenmesi ile ilgili çalışmalar

Yaprak Hücrelerinde Membran Zararlanması (%)

Bitki yapraklarında stres durumunda, hücrelerden dışarıya verilen elektrolitlerin EC metre ile ölçülmesiyle membran zararlanma indeksi (MII) hesaplanmıştır (Dlugokecka ve Kacperska-Palacz, 1978; Fan ve Blake, 1994). Denemede yer alan çeşitlerden her bitkiden 2 tekrerrü olacak şekilde, büyüme ucundan itibaren 4. yapraklar bu işlem için seçilmiştir. Bunun için 1 cm çapındaki yaprak diskleri de-iyonize su içerisinde 4 saat bekletilmiş ve ardından EC değeri ölçülmüştür. Aynı yaprak diskleri, 121 °C’de 10 dakika bekletildikten sonra çözeltinin EC değeri yeniden ölçülmüştür. Aşağıdaki formül kullanılarak kontrole göre % olarak hesaplanmıştır (Şekil 3.15).

$$\text{Membran Zararlanma İndeksi} = (Lt - Lc / 1-Lc) \times 100$$

Lt: Tuz stresindeki yaprağın otoklav edilmeden önceki EC / Otoklav edildikten sonraki EC

Lc: Kontrol yaprağının otoklav edilmeden önceki EC / Otoklav edildikten sonraki EC



Şekil 3.15. Yaprak hücrelerinde membran zararlanmasının belirlenmesi ile ilgili yapılan analizden görünüm

Yaprak Su Potansiyeli (MPa)

Yaprak su potansiyeli, Soilmoisture marka taşınabilir basınç çemberi kullanılarak, bitkilerin büyüme ucundan itibaren 2. ve 3. yapraklarında ölçülmüştür. Ölçümler bar biriminde yapılmış ve daha sonra MPa birimine dönüştürülmüştür. (Şekil 3.16).



Şekil 3.16. Yaprak Su Potansiyelinin Ölçümünün Yapılması

Yaprak Kuru Madde Miktarı (%)

Her bir bitkiye ait yaprak kısımları hassas terazide tartılarak g olarak (± 0.1) yaş ağırlıkları tespit edilmiş, daha sonra 65 °C etüvde 48 saat kurutulduktan sonra yaprak kuru ağırlık g olarak kaydedilmiştir. Stres ve kontrol bitkilerinin yaprak yaş ve kuru ağırlıkları kullanılarak bitkilerin tuz etkinlik değerleri hesaplanmıştır. Yaprak kuru madde miktarı aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\%KuruMadde = \left(\frac{\text{Kuru Ağırlık (KA)}}{\text{Taze Ağırlık (TA)}} \right) \times 100$$

Yaprak Alanı (cm² /bitki)

Deneme sonunda, bir saksıdaki bitki üzerindeki tüm yapraklar taranarak “Digimizer Image Analysis Software” programı yardımıyla cm² cinsinden hesaplanmıştır (Şekil 3.17).



Şekil 3.17. Denemede Yer Alan Bitkiye Ait Yaprakların Tarandıktan Sonraki Durumu

Prolin Analizi

Bitki örnekleri (250 mg), 5 ml %3 sülfosalisilik asit çözeltisi içinde havanda ezilerek homojenize edilmiştir. Elde edilen karışım, 3000 devirde 4 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra, süpernatant kısmından 1 ml alınarak, üzerine 1 ml asit ninhidrin ve 1 ml glasiyel asetik asit eklenip reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. Bu karışım, 100 °C’de su banyosunda 1 saat boyunca reakte edilmiş ve işlem, buz banyosunda durdurulmuştur. Reaksiyon karışımı, buz banyosunda 2 ml toluen ile ekstrakte edilmiştir. Sonuç olarak, karışımın absorbansı 520 nm dalga boyunda spektrofotometre ile ölçülmüştür (Şekil 3.18).



Şekil 3.18. Prolin analizinin yapılma aşamaları

Yeşil Aksamda ve Köklerde Potasyum, Kalsiyum, Sodyum ve Klor Konsantrasyonu ($\mu\text{g} / \text{g}$ kuru ağırlık veya %)

Kurutulan bitki örnekleri öğütülmüş ve bu öğütülmüş örneklerden 200 mg alınarak, 5 saat boyunca 550 °C’de kül fırınında yakılmıştır. Yakma işlemi sonrasında oluşan kül, %33’lük HCl asit ile çözülmüş ve mavi bant filtre kağıdı kullanılarak filtre edilmiştir. Süzülen örnekler, gerektiğinde %33’lük HCl ile 1/10 oranında seyreltilmiştir. Seyreltme işleminin ardından, örneklerdeki Na, K ve Ca elementlerinin konsantrasyonları, Varian marka FS220 model Atomik Absorpsiyon Spektrofotometre cihazı ile belirlenmiştir (Şekil 3.19).



Şekil 3.19. Na, K, Ca elementlerinin konsantrasyonlarının belirlenmesi

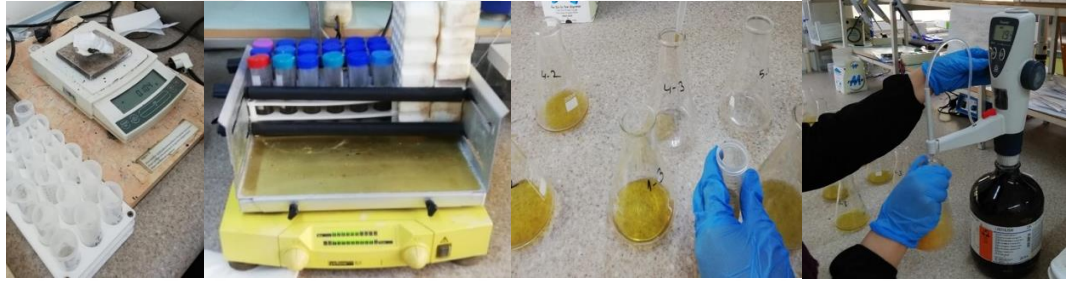
Tuzluluk çalışmalarında, bitkilerin yeşil aksamı ve köklerindeki Cl konsantrasyonu Johnson ve Ulrich (1959) 'e göre ve Mohr metodu ile belirlenmiştir. Bu amaçla, öğütülmüş bitki örneklerinden 100 mg tartılarak 50 ml kapasiteli santrifüj tüpüne yerleştirilmiştir. Üzerine 25 ml saf su eklenmiş, karışım 10 dakika çalkalandıktan sonra 4000 devirde santrifüj edilmiştir. Elde edilen eriyikten 20 ml alınarak erlenmayere konulmuş ve üzerine 1 ml potasyum kromat indikatörü eklenmiştir. Daha sonra, gümüş nitrat çözeltisi ile titrasyon yapılmıştır. Titrasyona, klorun tamamen gümüş klorür olarak çökeliş açık kahverengi bir renk oluştuğunda son verilmiştir (Şekil 3.20). Cl konsantrasyonu, aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\text{Klor \%} = (N-B) / A \times 100$$

N: Numune titrasyonunda kullanılan gümüş nitrat miktarı, ml

B: Blank titrasyonunda kullanılan gümüş nitrat miktarı, ml

A: Analiz için alınan bitki numunesi miktarı mg



Şekil 3.20. Cl Elementinin Konsantrasyonun Belirlenmesi

İstatistiksel Analizler

Denemenin kurulduğu her iki yılda da (2021-2022) deneme verileri, JMP 13 istatistik paket programında tesadüf blokları deneme desenine göre analizleri yapılmış ve uygulamalar sonucunda elde edilen veriler “LSD çoklu karşılaştırma testi” ile karşılaştırılmıştır ($p<0,001$). Birinci yılda (2021); 21 ceviz genotipinde, 4 farklı tuz dozu ve kontrol uygulamasında 3 tekerrür ve her tekerrürde 5 bitki olacak şekilde deneme kurulmuştur. İkinci yılda ise (2022) 6 adet (hassas ve tolerant) ceviz çeşidinde kontrol ve tuz uygulama (150 mM NaCl) olmak üzere 3 tekerrür ve her tekerrürde 5 bitki olacak şekilde deneme yapılmıştır. Deneme sonucunda Fernor ceviz çeşidi tuzluluğa “hassas” ve Serr ceviz çeşidi ise tuzluluğa “tolerans” olarak belirlenmiştir.

3.2.4. Yaprak Örneklerinin Alınması ve RNA İzolasyonu

Tuzluluğa hassas Fernor ve toleranslı Serr ceviz çeşitlerinden alınan yaprak örnekleri materyal olarak kullanılmıştır. Her iki çeşide tuz uygulaması yapılmış, uygulama ve kontrol bitkilerinden yaprak örnekleri, denemede Yang ve ark. (2017)'nin kullanmış olduğu tuz uygulama dönemleri baz alınarak yürütülmüştür. Yaprak örnekleri alınarak folyo kâğıdına sarılıp sıvı azot içerisinde laboratuvara getirilmiş ve zaman kaybedilmeden -80°C 'ye konulmuştur. Tolerant Serr ve

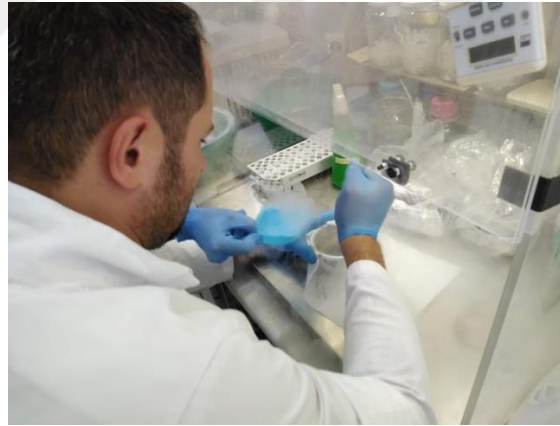
hassas Fernor ceviz çeşitlerinden her bir örnekte RNA izolasyonları ayrı ayrı yapılmıştır. Her bir çeşide ait RNA örnekleri uygulama ve kontrol olacak şekilde ayrı ayrı bulk yapılmıştır (Şekil 3.21).



Şekil 3.21. RNA izolasyonu için örneklerin alınması işlemi

RNA izolasyonu Carvalho ve ark. (2015)'na göre Topçu (2019)'nun minör modifikasyonlar gerçekleştirdiği protokole göre yapılmıştır. CTAB ekstraksiyon tampon çözeltisinin içeriği %2 PVP, 30 mM EDTA, 2 M NaCl, %2 CTAB, 100 mM TRIS ve %0,05 spermidine içermektedir.

RNA izolasyon işlemleri, kontaminasyon riskini en aza indirmek amacıyla steril bir kabin içerisinde gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.22).



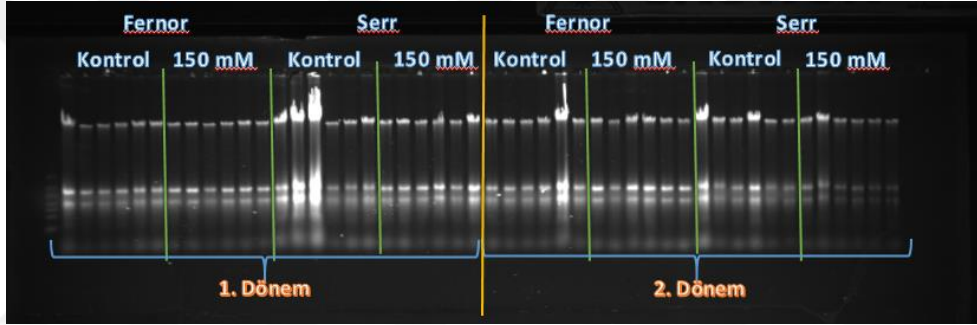
Şekil 3.22. RNA izolasyonu yapılacak yaprak örneklerinin sıvı azotta ezilmesi

RNA izolasyonu, aşağıdaki şekilde gerçekleştirilmiştir:

Bitki yaprak örnekleri sıvı azot yardımıyla havanda iyice ezilmiş, 100 mg'lık miktar alınarak 2 ml'lik tüplere aktarılmıştır. Her bir örneğe, %2 β -merkaptoetanol içeren ve önceden 65 °C'de ısıtılmış 1 ml CTAB çözeltisi eklenmiştir. Tüpler, 65 °C'ye ayarlanmış su banyosunda her 5 dakikada bir çalkalanarak toplamda 20 dakika inkübe edilmiştir. Ardından tüpler, su banyosundan alınıp 5 dakika buz üzerinde bekletilmiştir. Örneklerin üzerine 1 ml kloroform:izoamilalkol (24:1) karışımı eklenmiş ve tüpler, beyaz bir görünüm elde edilene kadar iyice karıştırılmıştır. Karışım, 4 °C'de 14.000 rpm hızında 20 dakika santrifüj edilerek süpernatant temiz 2 ml'lik tüplere aktarılmıştır. Kloroform:izoamilalkol ile karıştırma ve santrifüj işlemi toplamda üç kez tekrarlanmıştır. Son

işlemden sonra üst faz, temiz 1.5 ml'lik tüplere alınmış ve üst faz hacminin %10'u kadar 3M sodyum asetat (pH 5.2) ile 2.5-3 katı soğuk %100 etanol eklenmiştir. Tüpler nazikçe çalkalanarak -20 °C'de bir saat bekletilmiş, ardından +4 °C'de 14.000 rpm'de 30 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası oluşan RNA çökeltilerine soğuk %100 etanolden 250 µl eklenmiş ve 14.000 rpm'de 4 °C'de 3 dakika santrifüj edilmiştir. %100 etanol uzaklaştırıldıktan sonra tüpe 250 µl %75 etanol eklenmiş, çalkalanmış ve aynı koşullarda tekrar santrifüj edilmiştir. Bu işlemde sonra tekrar %100 etanol eklenerek benzer şekilde santrifüj edilmiştir. Son olarak tüplerden %100 etanol uzaklaştırılmış, RNA çökeltileri buz üzerinde kurutulmuş ve 50 µl DEPC (dietilprokarbonat) su eklenmiştir. İzole edilen RNA, miktar ve kalite kontrolüne kadar -80 °C'de saklanmıştır.

İzole edilen toplam RNA'ların miktarları Qubit flourometre cihazı ile Qubit RNA BR assay kiti kullanılarak belirlenmiştir. Ardından RNA'ların kalitelerine % 0.5'lik agaroz jelde bakılmıştır (Şekil 3.23).

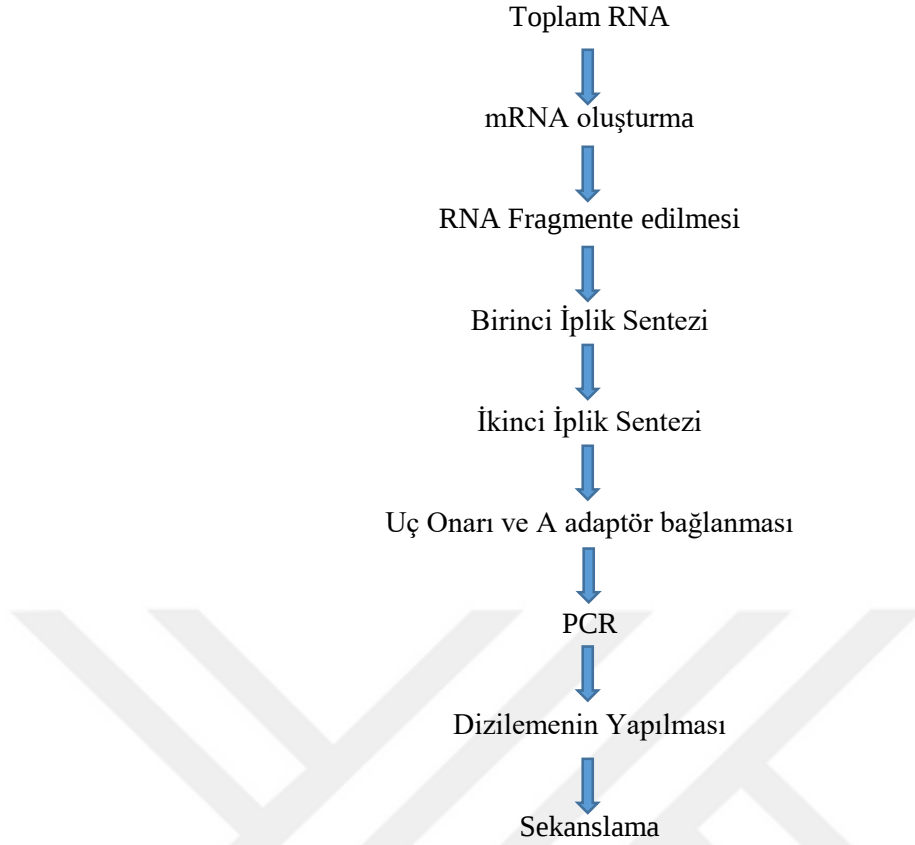


Şekil 3.23. RNA'ların kalitelerinin % 0.5'lik agaroz jeldeki görüntüsü

3.2.5. Kütüphane Oluşturma ve RNA Sekanslama

Denemede Yang ve ark. (2017)'nin kullanmış olduğu tuz uygulama dönemleri baz alınarak yapılmıştır. Bu doğrultuda belirlediğimiz hassas ve tolerans ceviz çeşitlerinin tuzluluğa karşı tam olarak semptom gösterme dönemi olarak 48. saatte alınan örnekleme grubu RNA sekanslamasına gönderilmiştir.

RNA sekanslama işlemleri hizmet alımı olarak BGI (Beijing Genomics Institute) firmasına yaptırılmıştır. Tolerant Serr ve hassas Fernor çeşitlerinde izole edilmiş RNA'lar Agilent 2100 Bio analyzer cihazında RNA konsantrasyonu, RIN değeri, 28S/18S ve tüm fragment uzunluk dağılımı belirlenmiş ve ardından kütüphane oluşturulmuştur. Sekanslama DNBseq platformunda çift yönlü (PE150) olarak gerçekleştirilmiştir. Her iki çeşide ait uygulama ve kontrol grubu olmak üzere üç tekerrürlü olarak oluşturulan toplam 12 bulk örneğinde RNA sekanslaması yapılmış ve biyoinformatik analizler ile tuzluluğa tolerans bakımından bulk örnekleri arasında farklı ekspresyon olan aday genler belirlenmiştir (Şekil 3.24).



Şekil 3.24. BGI tarafından gerçekleştirilen süreçlerin şematik genel görünümü

3.2.6. Biyoinformatik Analizler

Toplam RNA analizini yapmak için Agilent 2100 Bio analizör (Agilent RNA 6000 Nano Kit) kullanılmıştır. Örnek kalite kontrolü: RNA konsantrasyonu, RIN değeri, 28S/18S ve fragman uzunluğu dağılımında, bitki örneklerinin toplam RNA miktarını belirlemek için NanoDrop kullanılmıştır. Sekanslama sonrasında bir dizi filtreleme işlemleri yapılmıştır. rRNA'lara eşlenen okumaları kaldırılmıştır ve ham data elde edilmiştir. Ardından düşük kaliteli okumalar (okuma kalitesi %20 az ve %40 dan fazla olan okumalar), adaptörler ve bilinmeyen okumalar ($N > \%1$) temizlenmiştir. Elde edilen temiz okumalar Chandler ceviz çeşidinin referans genomuna (GCF_001411555.2_Walnut_2.0_NCBI) hizalanmış ve tuzluluğa tolerans bakımından farklı ifade olan genler tespit edilmiştir.

Her bir örnekten elde edilen temizlenmiş RNA dizileri ceviz referans genomu kullanılarak HISAT2 (Kim ve ark., 2015) programı ile haritalama yapılmıştır. StringTie (Pertea ve ark., 2015), Cufflinks (Trapnell ve ark., 2012) ve CPC (Kong ve ark., 2007) programları ile referans transkriptom dizileri de kullanılarak yeni referans transkriptom elde edilmiştir. Bowtie2 (Langmead ve Salzberg, 2012) programı kullanılarak her bir örneğe ait temiz okumalar yeni oluşturulan referans transkriptom dizilerine haritalanmış ve RSEM (Li ve Devey, 2011) programı ile gen ekspresyon seviyeleri (FPKM) belirlenmiştir. Mfuzz (de Hoon ve ark., 2004) programı ile clustering analizleri yapılmıştır. Örnekler arasında DEG'ler DEseq2 ($\text{Fold Change} \geq 2.00$ ve $\text{adjusted } p \leq 0.05$) (Love ve ark., 2014)

ve PossionDis (Fold Change ≥ 2.0 ve FDR ≤ 0.001) (Audic ve Claverie, 1997) algortimaları ile belirlenmiştir. DEG'lerin GO (Gen Ontoloji) ile KEGG pathway (Kanehisa ve ark., 2007) analizleri R programının phyper fonksiyonu ile yapılmıştır. DEG'lerin transkripsiyon faktörlerinin (TF) belirlenmeleri için önce ORF'ler getorf ile belirlenmiş ve sonra hmmsearch programı (Mistry ve ark., 2013) ile ORF'ler TF domain ile hizalanmıştır.

3.2.7. RNA-Seq Datasının Validasyonu

RNA-Seq verilerinin doğrulanması amacıyla tuzluluk stresiyle ilişkili olan genlerden farklı fold-change değerlerine sahip rastgele genler seçilmiştir. Bu seçilen genlerin ekspresyon seviyelerinin qPCR ile belirlenmesi ve RNA-Seq datasıyla karşılaştırılması amacıyla Primer3 (You ve ark., 2008) web aracı kullanılarak primerler tasarlanmıştır (Çizelge 3.3). Primer tasarlanırken normal belirlenmiş (default setting) ayarlar kullanılmıştır. Ancak primer uzunluğu (Min:20, Opt: 24, Max:28), primer erime derecesi (Min:60, Opt: 64, Max:70), primer GC oranı (Min:30, Opt: 45, Max:65) ve primer 3' ucu GC sayısı (CG Clamp=1) parametrelerinde değişiklik yapılmıştır. Primerler tasarlanırken genomik DNA kontaminasyonundan ve genin diğer transkriptlerinden etkilenmemesi amacıyla gen üzerindeki exon-exon junction bölgelerinden izoformlar spesifik olarak geliştirilmiştir. Toplam 14 adet bağlantılı genlerden tasarlanan primerlere ek olarak referans genlerden tasarlanan dört adet primer ile birlikte toplam 18 adet primer tasarlanmıştır.

Çizelge 3.3. Primer3 web Aracı Kullanılarak Oluşturulan Primerlerin İsimleri ve Baz Dizisi 5'-3'

No	Primer Adı	Baz Dizisi 5'-3'
1	Jr_Salt_005-F	GGGTTTATGTGACCACCTGAGATGC
	Jr_Salt_005-R	GCGACTTTCCTGTTTCTGTACATC
2	Jr_Salt_006-F	AGCACTGCATCACCATGTAGAAC
	Jr_Salt_006-R	CGGGCATCTCAGGTGGTCAC
3	Jr_Salt_007-F	CTTCAATCACCGAATCGGCTGAG
	Jr_Salt_007-R	GAGAAGGTTTGATAGGAAAAGTGG
4	Jr_Salt_008-F	GTGCTGTATCCATCGAGTTTGAAG
	Jr_Salt_008-R	CAGCCGATTTCGGTGATTGAAGACC
5	Jr_Salt_009-F	TCTGCAACTCTACCATCACTGAGGAC
	Jr_Salt_009-R	CTGAGTTTAAGGGCTGTACTGTATG
6	Jr_Salt_010-F	TGCCTTCACTAGGTGTTTCACAAG
	Jr_Salt_010-R	GGTCCTCAGTGATGGTAGAGTTGC
7	Jr_Salt_011-F	GGACCACTGAGCAGAATCTGATCATCC
	Jr_Salt_011-R	CTCATTTCAACCCACTGAAGAAG
8	Jr_Salt_012-F	CTGACGATTGAAGTCCAATGATAC
	Jr_Salt_012-R	ATCAAGGATGATCAGATTCTGCTCAG
9	Jr_Salt_2.011-F	CATGTAAAAATTGGTCAGCTTCAC
	Jr_Salt_2.011-R	GCTTTGCTGAGTTGTAATGCAGGTTATG
10	Jr_Salt_2.012-F	AATTTGAAGATATTGCAACCACTG
	Jr_Salt_2.012-R	CTGCTTTGCTGAGTTGTAATGCAGG
11	Jr_Salt_013-F	ATGCGGCATTGCACAAAGTCATTAC
	Jr_Salt_013-R	CACAAGATCTATCACATCATCAAGC
12	Jr_Salt_014-F	CCCTGGTACAGATAGCTTCACTTG
	Jr_Salt_014-R	TGGGATTGCTGAAGTAATGACCTTGTGC
13	Jr_Salt_015-F	ATATTGCCTTGCATCAACTGCACTAGC
	Jr_Salt_015-R	GGATCAGTTTCAACAGCACAGAC

(Çizelge 3.3'ün devamı)

14	Jr_Salt_016-F	GAAGATTCTCCAGGTTCTGAGATG
	Jr_Salt_016-R	TGCAAGAGGCTAGTGCAGTTGATGC
15	Jr_Ref_ARP3_001-F (referans gen)	CGTGTTTATTGAACTCCTTGACG
	Jr_Ref_ARP3_001-R (referans gen)	GGAAGGATGTTACTCTTTTGTCC
16	Jr_Ref_ARP3_002-F (referans gen)	CGTTCATAGCCAATATCACAAGAG
	Jr_Ref_ARP3_002-R (referans gen)	GTTCTGATATCGTCAAGGAGTTC
17	Jr_Ref_GRIK2_001-F(referans gen)	CAGGTGTTTGAGGATGACAATG
	Jr_Ref_GRIK2_001-R (referans gen)	AGAAATGGATAATGTCCCAGAATC
18	Jr_Ref_GRIK2_002-F(referans gen)	ATATTGTGCATGGCGATATTAAAC
	Jr_Ref_GRIK2_002-R (referans gen)	GCTCATCATTGTCATCCTCAAAC

3.2.8. Farklı Ekspirese Olan Genlerin qPCR ile Validasyonu

Tuzluluk bakımından farklı ifade olan genlerin validasyonu dayanıklı ve hassas örnek gruplarına ait tuzluluk stresine maruz bırakıldıktan sonraki 24. saatte örneklenen RNA'lar kullanılarak qPCR analizleri RealTime-PCR cihazında (Roche Lightcycler® 96) gerçekleştirilmiştir. Çalışmada farklı ekspirese olan genlerin tuzluluk ile bağlantılı olup olmadıklarını belirlemek için yüksek ilişkili genlerden tasarlanmış primerler kullanılarak qPCR analizleri yapılmıştır.

Miktarları 100 ng'a ayarlanan RNA'lar, High Capacity cDNA RT Kit (Applied Biosystems) kullanılarak cDNA sentezi için kullanılmıştır. Bu işlemde, reaksiyon için 5 µl 100 ng RNA örneği alınmıştır. Reaksiyon karışımında 2 µl 10X RT buffer, 2 µl 10X RT random primer ve 0.8 µl 100 mM dNTP yer almıştır. Toplam reaksiyon hacmi 20 µl olarak ayarlanmış ve kalan hacim, RNase-free su ile tamamlanmıştır. High Capacity cDNA RT Kit (Applied Biosystems) ile oluşturulan cDNA PCR döngü koşulları Çizelge 3.4'de verilmiştir.

Çizelge 3.4. High Capacity cDNA RT Kit (Applied Biosystems) ile oluşturulan cDNA PCR döngü koşulları

	Sıcaklık (°C)	Zaman (sn)	Döngü
1. Adım	25	10	1
2. Adım	37	60	1
3. Adım	85	5	
4. Adım	4	-	-

Daha sonra cDNA örnekleri 5 kat seyreltilerek qPCR reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. qPCR işlemleri, Ampliqon (Denmark) tarafından üretilen Real Q Plus 2X Master Kit kullanılarak, firmanın talimatlarına uygun şekilde yapılmıştır. Transkriptom analizleri ise Roche Lightcycler® 96 (Roche Life Science) cihazında gerçekleştirilmiştir. Real Q Plus 2X Master Kit ile yapılan RT-qPCR için kullanılan döngü koşulları Çizelge 3.5'te sunulmuştur.

Çizelge 3.5. Real Q Plus 2X Master Kit (Ampliqon, Denmark) ile oluşturulan RT-qPCR döngü koşulları

	Sıcaklık (°C)	Zaman	Döngü
1. Adım	50	2 dk	1
2. Adım	94	15 dk	1
3. Adım	94	15 sn	45
4. Adım	55	30 sn	
5. Adım	70	30 sn	
6. Adım	37	30 sn	1

LinRegPCR versiyon 2017.1 yazılımı kullanılarak, her bir döngüde elde edilen ekspresyon değerlerinden yola çıkarak RNA'ların kalite (efficiency) düzeyleri hesaplanmıştır. Kalite değeri 1.95'ten düşük veya 2'den yüksek olan RNA örnekleri yeniden izole edilerek, cDNA sentezi ve ekspresyon analizleri tekrar gerçekleştirilmiş ve kalite kontrolü yapılmıştır.

LinRegPCR ile kalite belirlenen örnekler, 6 farklı referans gen kullanılarak ekspresyon analizine tabi tutulmuştur. Referans genlerin analiz sonuçları doğrultusunda, en iyi referans gen seçimi için RefFinder adlı web tabanlı yazılım kullanılarak delta-Ct (Silver ve ark., 2006), BestKeeper (Pfaff ve ark., 2004), geNorm (Vandesompele ve ark., 2002) ve NormFinder (Andersen ve ark., 2004) algoritmaları ile en uygun referans gen belirlenmiştir.

Ekspresyon analizleri sonucunda elde edilen Ct değerleri, seçilen referans gen ile normalize edilerek, her bir örnekteki her bir gen için ekspresyon seviyeleri $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi ile hesaplanmıştır (Livak ve Schmittgen, 2001; Goni ve ark., 2009; Topçu, 2019).



4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu çalışmada, farklı ceviz genotiplerinin tuz stresine karşı morfolojik, fizyolojik ve moleküler düzeyde verdiği yanıtları ortaya konmuş ve elde edilen bulgular literatürle karşılaştırılmalı olarak verilmiştir. Çalışmanın ilk yılında (2021 yılı), 21 farklı ceviz genotipine dört farklı NaCl konsantrasyonu uygulanmış; bitki boyu, yaprak sıcaklığı, yaprak sayısı, SPAD değeri, görsel skala ile değerlendirme, yaprak oransal su içeriği, kök kuru madde miktarı ve canlılık oranı gibi çeşitli morfolojik ve fizyolojik parametreler üzerinden tuz stresine verilen tepkiler değerlendirilmiştir. Elde edilen veriler doğrultusunda, tuza tolerans düzeyleri bakımından farklılık gösteren altı genotip belirlenmiş ve denemenin ikinci yıl (2022 yılı) uygulamaları bu seçilen genotipler ile sürdürülmüştür.

İkinci yıl, seçilen altı genotipe kontrol (0 mM) ve 150 mM NaCl olacak şekilde tuz dozu uygulanarak, klorofil içeriği, bitki gelişim özellikleri, yaprak sıcaklığı, stomal iletkenlik, fotosentetik pigmentler, membran stabilitesi, iyon birikimi ve prolin düzeyleri gibi çok sayıda fizyolojik ve biyokimyasal parametre analiz edilmiştir. Bu çok yönlü analizler sonucunda, Serr çeşidi tuza toleranslı, Fernor çeşidi ise tuza hassas olarak belirlenmiş ve bu iki çeşit üzerinde RNA-Seq temelli gen ifade analizleri gerçekleştirilmiştir. Böylece, çalışmada sadece fizyolojik değerlendirmeler değil, aynı zamanda moleküler yanıtların da bütüncül bir yaklaşımla ortaya konması hedeflenmiştir.

4.1. Ceviz Çeşitlerinin Tuza Tolerans Durumlarının Belirlenmesi

Denemenin ilk yılında 21 farklı ceviz genotipine dört farklı NaCl dozu (75, 150, 225 ve 300 mM) ve kontrol (0 mM) uygulanarak elde edilen morfolojik ve fizyolojik verilere göre ceviz genotiplerinin tuz stresine karşı gösterdiği tolerans düzeyleri değerlendirilmiştir. Bitki boyu, yaprak sıcaklığı, yaprak sayısı, görsel skala ile değerlendirme, SPAD değeri, yaprak oransal su içeriği, kök kuru madde miktarı ve canlılık oranı gibi parametreler kullanılarak genotipler arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak analiz edilmiş ve genotiplerin tuzluluk stresine verdikleri yanıtlar karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar, ikinci yıl denemelerine dahil edilecek genotiplerin seçiminde temel teşkil etmiştir.

4.1.1. Bitki Boyu (cm)

Bu çalışmada, 21 farklı ceviz genotipine uygulanan dört farklı tuz konsantrasyonunun (75, 150, 225 ve 300 mM NaCl) bitki boyu üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir (Çizelge 4.1). Elde edilen bulgular, artan tuz konsantrasyonunun bitki boyu üzerinde genotipe bağlı olarak farklılık gösteren ancak genel olarak baskılayıcı bir etki oluşturduğunu ortaya koymuştur. Kontrol grubu ortalaması 31.01 cm iken, bu değer 75 mM NaCl uygulamasında 29.18 cm, 150 mM NaCl dozunda 27.10 cm, 225 mM NaCl uygulamasında 23.65 cm ve 300 mM NaCl dozunda 21.44 cm olarak belirlenmiştir. Bitki boyundaki bu azalma eğilimi, tuz stresinin büyüme üzerindeki olumsuz etkisinin tuzluluğa bağlı olarak arttığını ve yüksek tuz konsantrasyonlarında büyümenin ciddi şekilde

sınırlandığını göstermektedir. Ceviz çeşitleri açısından değerlendirildiğinde, tuz stresine karşı tolerans düzeylerinin istatistiki açıdan önemli ölçüde farklılık gösterdiği gözlemlenmiştir. Yalova-3, Serr ve Sölez-1 ceviz çeşitleri, yüksek tuz konsantrasyonlarında dahi büyüme performanslarını büyük ölçüde koruyarak yüksek düzeyde tuzluluğa tolerans göstermiştir. Yalova-3 ceviz çeşidi 300 mM NaCl uygulamasında 32.7 cm'lik bitki boyuna ulaşmış, Serr ceviz çeşidi ise 150 mM ve 75 mM NaCl uygulamalarında sırasıyla 42.5 cm ve 43.1 cm ile öne çıkmıştır. Sölez-1 ceviz çeşidi ise genel tuzluluk ortalamasında 32.7 cm ile toleranslı ceviz çeşitleri arasında yer almıştır. Buna karşın Fernor, Hartley ve Pedro ceviz çeşitleri, artan tuz konsantrasyonlarına bağlı olarak belirgin büyüme kayıpları yaşamış ve bu durum bu çeşitlerin tuz stresine karşı duyarlılığını açıkça ortaya koymuştur. Özellikle Hartley ceviz çeşidi, 300 mM NaCl uygulamasında 10.2 cm'lik bitki boyuna ulaşabilmiştir.

Çizelge 4.1. Farklı ceviz çeşitlerinde tuz dozlarının bitki boyu üzerine etkisinin değerlendirilmesi

Bitki Boyu (cm)	Tuz Dozları				Tuzluluk Ortalama	Kontrol
Çeşitler	300 mM	225 mM	150 mM	75 mM		
Chandler	20.8 ±2.88	23.9 ±1.18	25.6 ±1.26	26.2 ±3.13	24.1 gh	27.9 ±3.54
Antalya-3	24.0 ±3.25	24.9 ±1.13	26.6 ±3.39	27.0 ±1.39	25.6 e-g	30.6 ±3.83
Fernor	12.6 ±1.25	12.9 ±1.99	14.6 ±1.15	13.2 ±0.36	13.3 j	15.8 ±2.32
Oğuzlar-77	22.0 ±1.09	23.5 ±2.14	31.7 ±1.01	33.6 ±4.25	27.7 d-f	34.9 ±0.8
Howard	19.6 ±0.52	21.9 ±2.4	23.2 ±4.27	30.2 ±3.83	23.7 gh	30.2 ±1.63
98-115	23.6 ±0.76	23.9 ±4.73	24.2 ±2.79	24.8 ±0.5	24.1 gh	25.6 ±2.43
Şen-1	29.1 ±2.98	29.9 ±4.64	34.0 ±1.09	35.1 ±2.75	32.0 bc	35.5 ±4.39
Şebin	19.6 ±3.17	19.6 ±1.01	20.8 ±2.52	21.7 ±2.98	20.4 ı	24.4 ±3.09
Maraş-18	24.9 ±3.84	27.5 ±2.08	28.4 ±0.95	28.9 ±6.02	27.4 d-f	30.3 ±2.02
Hartley	10.2 ±0.95	11.3 ±1.3	14.00 ±2.18	16.6 ±2.5	13.0 j	20.6 ±5.89
230/37	24.6 ±1.94	27.3 ±7.95	29.0 ±1.25	30.8 ±6	27.9 de	31.6 ±6.83
77-H-1	17.8 ±1.7	23.9 ±1.38	25.4 ±1.01	26.7 ±1.26	23.5 gh	26.7 ±0.38
Kaman-1	21.0 ±3.83	20.3 ±0.13	21.9 ±3.91	27.3 ±5.49	22.6 hı	27.3 ±2.44
KM-2	25.3 ±2.25	25.8 ±4.83	33.2 ±5.07	35.3 ±4.6	29.9 cd	37.3 ±4.01
Maraş-12	17.4 ±5.21	22.6 ±4.31	28.6 ±4.75	31.2 ±5.59	25.0 f-h	31.3 ±4.72
Midland	26.7 ±8.36	27.9 ±5.89	30.1 ±1.76	33.1 ±3.22	29.5 cd	37.3 ±7.47
Yalova-3	32.7 ±6.43	33.7 ±6.63	34.9 ±2.99	40.5 ±4.93	35.5 a	44.2 ±5.09
Serr	22.6 ±8.06	29.5 ±7.17	42.5 ±3.73	43.1 ±9.39	34.4 a	44.4 ±9.93
Sölez-1	26.3 ±9.08	32.1 ±10.07	34.5 ±5.77	37.8 ±4.93	32.7 ab	37.9 ±3.13
214/47	16.8 ±3.21	20.9 ±1.4	28.8 ±6.03	29.8 ±3.82	24.1 gh	31.7 ±4.14
Pedro	12.6 ±6.2	13.3 ±3.69	17.2 ±5.95	19.8 ±1.64	15.7 j	25.8 ±3.1
Genel Ort.	21.44 d	23.65 c	27.10 b	29.18 a		31.01 a

*Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasında istatistiki düzeyde önemli farklılık bulunmaktadır ((p<0.0001) (LSD %5= 2.84)) ((p<0.0001) (LSD %5= 1.29)).

Tuzluluk stresi, bitkilerde fotosentez, solunum ve protein sentezi gibi temel fizyolojik süreçleri olumsuz etkileyerek, bitki boyu, sürgün ve kök gelişimi gibi vegetatif büyüme parametrelerinde önemli gerilemelere yol açmaktadır (Boyer, 1982; Pal ve ark., 2004; Saadatmand

ve ark., 2007; Bressan, 2008). Bu durum, yalnızca ceviz gibi sert kabuklu meyve türlerinde değil, farklı bitki türlerinde de benzer şekilde gözlenmiştir. Kamiab ve ark. (2012) tarafından yapılan çalışmada, antepfıstığı anaçlarında yüksek tuz konsantrasyonlarının sürgün uzunluğunda belirgin azalmalar oluşturduğu bildirilmiştir.

Bu çalışmada elde edilen bulgular da, tuzluluk stresinin ceviz fidanlarının vegetatif büyümesi üzerinde olumsuz etkiler oluşturduğu açıkça ortaya koymuştur. Tuz konsantrasyonunun artışıyla birlikte bitki boyu değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı azalmalar meydana gelmiş, 300 mM NaCl uygulamasında ortalama bitki boyu 21.44 cm'ye kadar düşmüştür. Cevizde tuz stresi ile büyüme performansı arasındaki negatif ilişkiyi doğrulamakta ve literatürdeki önceki çalışmalarla büyük ölçüde örtüşmektedir.

Lotfi ve ark. (2009a, 2009b) tarafından yapılan çalışmalarda, 50–250 mM NaCl uygulanan farklı ceviz genotiplerinde büyüme parametrelerinde önemli azalmalar raporlanmış ve genotipler arası tuzluluk tolerans farklılıkları belirlenmiştir. Bu çalışmalarda Chandler ceviz çeşidi tuzluluğa yüksek tolerans göstermiş, Serr ve Lara gibi çeşitler ise tuzluluk stresine daha duyarlı sınıfta değerlendirilmiştir. Ancak bu çalışmada elde edilen veriler, özellikle Serr ceviz çeşidinin 75 ve 150 mM NaCl konsantrasyonlarında gösterdiği yüksek büyüme performansı ile literatürde bildirilen duyarlılık sınıflandırmalarından farklılık göstermektedir. Bu durum, tuz stresine verilen yanıtların stresin şiddeti, uygulama süresi, kullanılan ortam koşulları ve genetik varyasyonlar gibi faktörlerden etkilenebileceğini ortaya koymaktadır.

Benzer şekilde, Akça ve Şahin (2022) tarafından yapılan bir başka çalışmada da, artan tuz konsantrasyonlarının (0.3–5 dS/m) Chandler fidanlarının sürgün ve kök gelişimini baskıladığı bildirilmiş ve tuzluluğun vegetatif büyüme üzerindeki sınırlayıcı etkisi vurgulanmıştır. Bu bulgular, özellikle bu çalışmada gözlenen 300 mM NaCl uygulamasına bağlı büyüme gerilemesi ile doğrudan paralellik göstermektedir.

Özellikle Yalova-3 ve Sölez-1 çeşitlerinin yüksek tuz konsantrasyonlarında dahi büyüme performanslarını koruyabilmeleri, literatürde daha önce doğrudan çalışılmamış olması nedeniyle bilimsel açıdan özgün bir katkı sunmaktadır. Bu yerli çeşitlerin, tuz stresine toleranslı genetik materyaller olarak ıslah programlarında kullanım potansiyeline sahip oldukları değerlendirilmektedir.

Öte yandan, Hartley, Fernor ve Pedro gibi bazı çeşitlerin tuzluluk stresine karşı gösterdiği düşük büyüme performansı, daha önce yarı toleranslı olarak tanımlanan bu çeşitlerin özellikle yüksek şiddette stres koşullarında daha hassas hale gelebileceğini göstermektedir. Bu durum, stres yanıtlarının yalnızca genotipik özelliklerle sınırlı kalmayıp, çevresel koşullar ve uygulama parametreleri ile karmaşık bir etkileşim içerisinde şekillendiğini bir kez daha teyit etmektedir.

4.1.2. Yaprak Sıcaklığı (°C)

Bu çalışmada, 21 farklı ceviz genotipinde dört farklı tuz dozu (75, 150, 225 ve 300 mM NaCl) uygulanarak yaprak sıcaklığı üzerindeki etkiler değerlendirilmiştir (Çizelge 4.2). Elde edilen bulgular, yaprak sıcaklığının artan tuz konsantrasyonlarıyla birlikte genel olarak yükseldiğini ve bu etkinin genotiplere bağlı olarak farklılık gösterdiğini ortaya koymuştur. Tüm genotipler dikkate alındığında, yaprak sıcaklığı 75 mM NaCl uygulamasında ortalama 36.58 °C iken, bu değer 150 mM NaCl dozunda 37.73 °C, 225 mM NaCl uygulamasında 38.37 °C ve 300 mM NaCl dozunda 39.29 °C olarak ölçülmüştür. Kontrol grubunda ise ortalama sıcaklık 35.33 °C düzeyinde tespit edilmiştir. Bu artış, tuzluluk stresinin bitkilerde terleme etkinliğini düşürerek ısı birikimine yol açtığını ve stomal aktiviteyi kısıtladığını göstermektedir.

Yaprak sıcaklığı, ceviz genotipleri açısından değerlendirildiğinde tuzluluk dozlarına duyarlılık açısından istatistiki açıdan önemli farklılıklar sergilediği gözlemlenmiştir. En yüksek yaprak sıcaklığı, 40.9 °C ile Oğuzlar-77 çeşidinde kaydedilirken, bunu 40.3 °C ile Fernor ve 39.3–39.0 °C aralığıyla Howard ve Chandler ceviz çeşitleri takip etmiştir. Bu ceviz çeşitlerinde yaprak sıcaklığının yüksek olması, tuz stresine bağlı olarak stomal kapanmanın belirgin olduğunu ve bu nedenle terleme yoluyla yeterli soğutmanın gerçekleşemediğini göstermektedir. Bu durum, bu ceviz çeşitlerinin tuz stresine karşı fizyolojik anlamda daha duyarlı olduğunu düşündürmektedir.

Buna karşılık, Serr ceviz çeşidinde yaprak sıcaklığı diğer ceviz genotiplerine kıyasla istatistiki açıdan anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur. Serr çeşidinde 300 mM NaCl uygulamasında yaprak sıcaklığı 36.1 °C'ye, 75 mM NaCl dozda ise yalnızca 30.8 °C'ye kadar düşmüştür. Benzer şekilde, Yalova-3 çeşidinde de 75 mM NaCl dozda yaprak sıcaklığı 35.3 °C, kontrol grubunda ise 30.7 °C olarak ölçülmüştür. Bu sonuçlar, özellikle Serr ve Yalova-3 ceviz çeşitlerinde tuz stresini altında bile stomal açıklığın korunabildiğini, böylece transpirasyon yoluyla sıcaklık düzenlemesinin etkin bir şekilde sürdürülebildiğini göstermektedir. Bu durum, bu çeşitlerin tuz stresine karşı daha toleranslı fizyolojik özelliklere sahip olduğunu ortaya koymaktadır.

Çizelge 4.2. Farklı ceviz genotiplerinde 4 farklı tuz dozunun yaprak sıcaklığına etkisinin değerlendirilmesi

Yaprak Sıcaklığı (°C)	Tuz Dozları				Tuzluluk Ortalama	Kontrol
Çeşitler	300 mM	225 mM	150 mM	75 mM		
Chandler	40.3 ±0.41	39.0 ±1.85	39.7 ±0.56	37.0 ±0.37	39.0 bc	36.1 ±0.4
Antalya-3	39.0 ±1.03	38.4 ±0.77	37.7 ±1.23	36.0 ±1.45	37.8 d-g	32.4 ±1.93
Fernor	42.0 ±1.32	40.3 ±1.16	39.5 ±0.35	39.4 ±0.41	40.3 a	38.9 ±0.32
Oğuzlar-77	42.3 ±1.43	40.8 ±0.39	40.6 ±1.05	39.9 ±1.05	40.9 a	38.7 ±2.09
Howard	40.4 ±1.31	39.7 ±1.92	39.4 ±1.8	37.7 ±3.4	39.3 b	36.6 ±1.28
98-115	39.0 ±2.23	38.2 ±0.73	37.9 ±1.71	37.8 ±1.71	38.2 c-e	35.6 ±1.98
Şen-1	40.4 ±0.57	38.4 ±1.56	38.2 ±0.41	37.6 ±1.93	38.7 b-d	35.1 ±1.39
Şebin	39.1 ±0.37	38.3 ±1.57	38.1 ±1.98	37.7 ±1.46	38.3 c-e	36.9 ±0.54
Maraş-18	39.8 ±0.37	38.7 ±0.53	38.7 ±0.48	38.3 ±0.36	38.9 bc	38.3 ±0.16

(Çizelge 4.2'nin devamı)

Hartley	39.2 ±0.54	38.7 ±0.64	38.6 ±0.47	37.3 ±0.97	38.5 b-d	36.0 ±1.06
230/37	37.8 ±1.32	37.7 ±0.26	37.4 ±1.48	36.3 ±0.55	37.3 e-h	36.0 ±0.8
77-H-1	39.2 ±0.93	38.9 ±1.55	37.8 ±1.15	36.7 ±2.44	38.2 c-f	36.3 ±0.92
Kaman-1	39.1 ±0.78	37.3 ±1.11	36.9 ±0.58	36.0 ±0.83	37.3 e-h	35.6 ±0.78
KM-2	38.6 ±1.73	38.4 ±1.72	35.9 ±0.83	35.8 ±1.08	37.2 f-h	34.1 ±0.92
Maraş-12	39.7 ±2.86	38.9 ±0.6	37.3 ±1.94	36.4 ±1.26	38.1 c-f	36.3 ±0.29
Midland	38.8 ±2.1	38.7 ±0.26	38.4 ±0.4	33.3 ±0.99	37.3 e-h	33.2 ±1.56
Yalova-3	38.4 ±0.29	37.0 ±1.14	36.1 ±0.36	35.3 ±0.92	36.7 h	30.7 ±0.71
Serr	36.1 ±0.95	35.9 ±1.25	33.8 ±2.52	30.8 ±0.71	34.2 ı	30.6 ±0.35
Sölez-1	38.7 ±0.3	37.6 ±0.76	35.9 ±0.73	35.3 ±0.39	36.9 gh	35.0 ±1.2
214/47	38.2 ±1.01	37.9 ±0.61	37.5 ±0.18	37.4 ±0.69	37.8 d-g	34.5 ±0.48
Pedro	39.0 ±0.99	36.9 ±0.53	36.8 ±0.93	36.3 ±0.65	37.3 f-h	35.1 ±1.11
Genel ort.	39.29 a	38.37 b	37.73 c	36.58 d		35.33 e

*Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasında istatistiki düzeyde önemli farklılık bulunmaktadır ((p<0.0001) (LSD %5= 0.98)) ((p<0.0001) (LSD %5= 0.42)).

Bitkiler, stres koşullarına maruz kaldıklarında ilk belirtilerden biri olarak yaprak sıcaklıklarında artış göstermektedir. Bu durum, transpirasyon oranının azalması veya tamamen durması ile birlikte yaprakların radyatif ısı yükünün artmasına bağlanmaktadır (Buschmann ve Lichtenthaler, 1998; Chaerle ve Van Der Straeten, 2000). Tuz stresinin etkisi altında, fotosentez oranındaki azalma, osmotik potansiyelin bozulması ve bitki besin elementlerinin alımındaki kısıtlamalar da yaprak sıcaklığının yükselmesine katkı sağlayan başlıca faktörler arasında yer almaktadır.

Bu çalışmada, artan NaCl konsantrasyonlarının ceviz genotiplerinde terleme mekanizmalarını baskılayarak yaprak düzeyinde ısı birikimine yol açtığını açık bir şekilde göstermiştir. Kontrollü koşullarda gerçekleştirilen deneylerde, tuz stresine maruz kalan bitkilerde yaprak sıcaklıklarının yükseldiği ve bunun bitkilerin su kaybını azaltmak adına stomalarını kısmen ya da tamamen kapatması sonucu fotosentetik soğutmanın azalmasına bağlı olduğu belirlenmiştir. Yaprak sıcaklığındaki bu artış, stresin fizyolojik etkilerinin termal parametreler aracılığıyla izlenebileceğini göstermekte olup, stres şiddetinin doğrudan bir göstergesi olarak değerlendirilmektedir (Chaerle ve Van Der Straeten, 2000).

Cevizde yaprak sıcaklığı ile ilgili özgün çalışmalar sınırlı olmakla birlikte, farklı meyve türlerinde benzer etkiler gözlemlenmiştir. Garriga ve ark. (2015) çilek bitkisinde tuzluluk stresinin terleme etkinliğini azaltarak yaprak sıcaklığını yükselttiğini bildirmiştir. Benzer şekilde, Yu-peng ve ark. (2018) tarafından *Actinidia* türlerinde yapılan çalışmada, yüksek tuz konsantrasyonlarının yaprak hasarı ve sıcaklık artışına yol açtığı, bunun da stresin fizyolojik şiddetini artırdığı vurgulanmıştır.

Çalışmada, Oğuzlar-77, Fernor, Howard ve Chandler gibi ceviz çeşitlerinde 300 mM NaCl uygulaması altında yaprak sıcaklıklarının sırasıyla 40.9°C, 40.3°C, 39.3°C ve 39.0°C seviyelerine

ulaştığı belirlenmiştir. Bu sonuçlar, ilgili çeşitlerde stomal kapanmanın daha yoğun gerçekleştiğini ve transpirasyon yoluyla ısı düzenlemesinin büyük ölçüde bozulduğunu göstermektedir. Özellikle Oğuzlar-77 ceviz çeşidinin en yüksek yaprak sıcaklığına ulaşması, bu çeşitte tuz stresine bağlı su düzenlemesinin yetersiz kaldığını açıkça ortaya koymaktadır.

Buna karşın, Serr ve Yalova-3 ceviz çeşitlerinde, yüksek tuz konsantrasyonlarına rağmen yaprak sıcaklıklarının diğer genotiplere göre anlamlı şekilde düşük kalması dikkat çekicidir. Serr çeşidinde 300 mM NaCl uygulamasında yaprak sıcaklığı 36.1 °C düzeyinde kalmış, Yalova-3 çeşidinde ise 75 mM NaCl uygulamasında yaprak sıcaklığı yalnızca 35.3 °C'ye yükselmiş ve kontrol grubunda 30.7 °C olarak ölçülmüştür. Bu durum, söz konusu çeşitlerin stomal açıklığı belirli ölçüde koruyabildiğini ve etkin transpirasyon mekanizmalarını sürdürerek yaprak sıcaklığını düzenleyebildiklerini göstermektedir.

Ceviz genotipleri arasında stres koşullarında ortaya çıkan stomal davranış ve su yönetimi farklılıklarının önemli olduğunu göstermektedir. Vahdati (2013) ve Karimi ve ark. (2018) tarafından tuzluluk toleransında antioksidatif enzim aktiviteleri, prolin birikimi ve stomal regülasyon gibi fizyolojik mekanizmalar kritik rol oynamaktadır. Bu bağlamda, bu çalışmada elde edilen yaprak sıcaklığı verileri, özellikle Serr ve Yalova-3 çeşitlerinin tuz stresine karşı üstün fizyolojik adaptasyon kabiliyetine sahip olduğunu desteklemektedir.

4.1.3. Klorofil İçin Spad Değerleri

Bu çalışmada, 21 farklı ceviz genotipinde uygulanan dört farklı NaCl konsantrasyonunun (75, 150, 225 ve 300 mM) yaprak klorofil içeriği üzerine etkileri SPAD ölçümleri aracılığıyla değerlendirilmiştir (Çizelge 4.3). Genel ortalamalar dikkate alındığında, klorofil içerik değerleri artan tuz konsantrasyonları ile birlikte azalma eğilimi göstermiştir. Kontrol grubunda ortalama SPAD değeri 28.75 iken, bu değer 75 mM NaCl uygulamasında 23.74, 150 mM NaCl dozunda 20.44, 225 mM NaCl uygulamasında 16.99 ve 300 mM NaCl dozunda 14.80 olarak kaydedilmiştir. Bu sonuçlar, tuzluluk stresinin fotosentetik pigmentler üzerinde olumsuz etkiler oluşturduğunu ve bu etkinin doza bağımlı olarak arttığını ortaya koymaktadır. Yüksek tuz konsantrasyonları, klorofil sentezini baskılamakta veya klorofilin bozunmasını hızlandırarak yapraklarda renk açılmalarına neden olabilmektedir.

Genotip düzeyinde yapılan değerlendirmeler, tuz stresine karşı klorofil stabilitesinin genotipler arasında önemli düzeyde farklılık gösterdiğini ortaya koymuştur. En yüksek SPAD ortalamasına sahip ceviz genotipi, 28.2 değeriyle Sölez-1 çeşidi olurken, bu çeşidin 75 mM NaCl uygulamasında 31.1 ve 300 mM NaCl dozunda 22.8 gibi yüksek klorofil düzeylerini koruduğu gözlemlenmiştir. Sölez-1 çeşidini sırasıyla 214/47 (24.7) ve 230/37 (24.2) genotipleri takip etmiş, bu genotipler de yüksek tuz dozlarında dahi SPAD değerlerini belirgin şekilde muhafaza etmiştir. Bu durum, söz konusu genotiplerin klorofil stabilitesini koruyarak fotosentetik performanslarını sürdürdüklerini ve tuz stresine karşı fizyolojik dayanıklılık sergilediklerini göstermektedir.

Buna karşın, Antalya-3, Howard ve Fernor gibi çeşitlerde SPAD değerleri önemli düzeyde düşmüş, özellikle 300 mM NaCl uygulamasında bu değerlerin sırasıyla 10.6, 10.3 ve 14.9 olduğu gözlenmiştir. Bu düşüş, klorofil kaybının ciddi seviyelere ulaştığını ve bu çeşitlerin tuz stresine karşı fotosentetik açıdan daha duyarlı olduğunu ortaya koymaktadır. Özellikle Antalya-3 çeşidi, kontrol grubundaki 27.8'lik değerine kıyasla yaklaşık %45'e varan bir kayıp göstermiştir.

Çizelge 4.3. Farklı ceviz genotiplerinin 4 farklı tuzluluk konsantrasyonunda klorofil içeriğinin SPAD değerleri üzerindeki değişimi

SPAD	Tuz Dozları				Tuzluluk Ortalama	Kontrol
Çeşitler	300 mM	225 mM	150 mM	75 mM		
Chandler	14.6 ±1.82	17.3 ±0.2	18.6 ±2.85	24.1 ±1.68	18.7 c-e	28.3 ±0.83
Antalya-3	10.6 ±2.15	11.3 ±2.09	19.1 ±1.23	19.9 ±4.82	15.2 gh	27.8 ±5.07
Fernor	14.9 ±2.38	15.2 ±2.47	15.2 ±1.22	16.7 ±2.7	15.5 f-h	28.9 ±5.08
Oğuzlar-77	17.1 ±2.85	18.3 ±3.96	22.8 ±7.32	24.1 ±4.53	20.56 c	26.9 ±3.93
Howard	10.3 ±0.88	13.4 ±2.75	15.9 ±4.03	20.0 ±3.8	14.9 h	28.8 ±3.73
98-115	11.3 ±0.43	14.6 ±3.08	20.5 ±5.18	26.1 ±4.54	18.1 c-f	32.1 ±1.27
Şen-1	11.9 ±1.13	12.6 ±3.78	17.2 ±3.38	18.9 ±4.8	15.2 gh	29.6 ±3
Şebın	14.3 ±3.56	14.9 ±0.21	16.5 ±6.24	24.8 ±5.52	17.6 d-g	26.0 ±2.02
Maraş-18	11.8 ±4.22	13.8 ±1.03	21.2 ±5.77	26.6 ±1.71	18.4 c-e	29.9 ±1.18
Hartley	13.4 ±3.84	16.00 ±4.4	20.2 ±1.76	26.9 ±3.2	19.1 c-e	29.3 ±4.07
230/37	18.5 ±2.34	22.9 ±4.3	27.4 ±2.75	27.9 ±2.17	24.2 b	28.6 ±1.9
77-H-1	18.7 ±5.04	19.6 ±4.25	20.9 ±3.6	21.8 ±2.54	20.3 cd	29.4 ±4.05
Kaman-1	14.5 ±3.2	15.3 ±1.25	15.4 ±4.22	24.3 ±3.79	17.4 e-h	29.8 ±1.21
KM-2	14.2 ±3.82	16.9 ±3.58	17.8 ±2.21	21.4 ±1.95	17.6 d-g	26.9 ±1.01
Maraş-12	11.7 ±3.44	14.2 ±3.67	20.3 ±1.79	24.4 ±4.26	17.7 d-g	25.5 ±4.97
Midland	11.8 ±1.15	17.4 ±2.79	18.7 ±4.51	21.5 ±1.75	17.4 e-h	29.2 ±4.96
Yalova-3	16.2 ±2.64	18.3 ±4.32	23.2 ±2.81	24.8 ±2.9	20.6 c	26.9 ±0.52
Serr	19.0 ±2.02	20.6 ±2.65	20.7 ±2.49	21.7 ±1.41	20.5 c	27.1 ±3.41
Sölez-1	22.8 ±0.76	28.3 ±3.6	30.6 ±1.57	31.1 ±2.76	28.2 a	33.8 ±1.53
214/47	20.9 ±1.6	23.2 ±4.29	25.8 ±4.79	28.7 ±2.97	24.7 b	30.8 ±5.65
Pedro	12.3 ±1.57	12.6 ±3.76	21.2 ±2.68	23.2 ±1.95	17.3 e-h	28.2 ±1.58
Genel ort.	14.80 e	16.99 d	20.44 c	23.74 b		28.75 a

*Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasında istatistiki düzeyde önemli farklılık bulunmaktadır ((p<0.0001) (LSD %5= 2.64)) ((p<0.0001) (LSD %5= 1.15)).

Bu çalışmada, artan NaCl konsantrasyonlarının ceviz genotiplerinde yaprak klorofil içeriği üzerinde belirgin şekilde azaltıcı etkiler oluşturduğu belirlenmiştir. Özellikle 300 mM NaCl düzeyinde ortalama SPAD değerinin 14.80'ne kadar gerilemesi, yüksek tuz stresinin fotosentetik pigment sentezini baskıladığı veya mevcut pigmentlerin bozunmasını hızlandırdığına işaret etmektedir. Bu sonuçlar, tuzluluk stresinin bitkilerin fotosentez kapasiteleri üzerinde doğrudan ve olumsuz bir etki oluşturduğunu açıkça ortaya koymaktadır.

Akça ve Şahin (2022), *Juglans* anaçlarına aşılanan Chandler ceviz fidanlarında 5 dS/m tuzlu su uygulamasının klorofil içeriğinde ciddi azalmalar oluşturduğunu bildirmiştir. Ji ve ark. (2022a)

ise *Juglans microcarpa* fidelerinde 200–300 mmol/L NaCl uygulamalarının klorofil içeriğini anlamlı şekilde düşürdüğünü, bunun da yapraklarda kloroz ve erken dökülme belirtilerine yol açtığını belirtmiştir. Ayrıca, Ranjbar ve ark. (2002) ile Karimi ve ark. (2009) *Pistacia vera* üzerinde yürüttükleri çalışmalarda, tuzluluk stresinin fotosentez oranını düşürdüğünü ve buna bağlı olarak klorofil içeriğinde azalmaya neden olduğunu göstermişlerdir.

Bu çalışmada yapılan değerlendirmelerde, klorofil içeriklerini yüksek düzeyde koruyabilen genotipler arasında Sölez-1, 214/47 ve 230/37 genotipleri ön plana çıkmıştır. Özellikle Sölez-1 çeşidi, 300 mM NaCl uygulamasında bile 22.8 SPAD değeriyle dikkat çekmiş ve kontrol grubundaki ortalamaya (28.75) oldukça yakın bir performans sergilemiştir. Bu durum, Sölez-1 ceviz çeşidinin fotosentetik kapasitesini tuz stresi altında dahi büyük ölçüde koruyabildiğini ve bu sayede fizyolojik dayanıklılık gösterdiğini ortaya koymaktadır. Sölez-1 çeşidinin tuzluluk stresine diğer ceviz genotiplerine göre daha toleranslı olduğunu ve ıslah çalışmaları için değerli bir genetik kaynak olabileceğini düşündürmektedir.

Diğer taraftan, Antalya-3, Howard ve Fernor gibi ceviz çeşitlerinde 300 mM NaCl uygulamasının ardından klorofil içeriklerinde ciddi düşüşler gözlenmiştir. Özellikle Antalya-3 çeşidinde klorofil içeriği kontrol grubunda 27.8 iken, stres koşulunda 10.6'ya gerilemiş ve yaklaşık %45'lik bir pigment kaybı meydana gelmiştir. Bu sonuç, ilgili çeşitlerde klorofil yapısının tuzluluk kaynaklı oksidatif stres karşısında yeterli dayanıklılık sergileyemediğini göstermektedir.

Fotosentetik pigmentler, yalnızca bitkilerin enerji üretiminde değil, aynı zamanda çevresel stres faktörlerine karşı verdikleri ilk fizyolojik tepkilerin de önemli kriterleri olduğu saptanmıştır. Vahdati (2013) ve Karimi ve ark. (2018) gibi araştırmacılar da, tuz stresinin fotosentez etkinliği üzerindeki olumsuz etkilerinin antioksidan savunma sistemleri ve ozmotik regülasyon mekanizmaları ile yakından ilişkili olduğunu ortaya koymuştur.

Bu çalışma, ceviz genotiplerinin tuz stresi altında klorofil içeriklerini koruma kapasitelerinin, bu genotiplerin fizyolojik dayanıklılık düzeyleri açısından önemli bir gösterge olduğunu ortaya koymaktadır. Özellikle Sölez-1 ve benzeri toleranslı çeşitler, ileride yapılacak ıslah çalışmaları için umut vadeden materyaller olarak değerlendirilebilirken; klorofil kaybı yüksek olan genotiplerin, tuzluluk riski taşıyan bölgelerde kullanılmadan önce dikkatle seçilmesi gerektiği sonucuna varılmıştır.

4.1.4. Genotiplerin Görsel Olarak Skala İle Değerlendirilmesi

Bu çalışmada, 21 farklı ceviz genotipine uygulanan dört farklı NaCl konsantrasyonunun (75, 150, 225 ve 300 mM) oluşturduğu tuzluluk stresinin, bitkilerde oluşturduğu görsel zarar düzeyi üzerinden değerlendirilmesi amacıyla görsel skala puanlaması yapılmıştır (Çizelge 4.4). Görsel skala, 0 (zarar yok) ile 5 (çok şiddetli zarar) arasında derecelendirilmiş ve artan tuz dozu ile birlikte bitkilerde gözlenen nekroz, kloroz ve yaprak deformasyonları gibi stres belirtileri sayısallaştırılmıştır. Elde edilen bulgular, tuz konsantrasyonundaki artışın bitkilerde gözle görülür

şekilde zararı artırdığını göstermiştir. Tüm genotipler dikkate alındığında, görsel zarar skoru 75 mM NaCl uygulamasında ortalama 2.40 iken; 150 mM NaCl dozunda 2.87, 225 mM NaCl dozunda 3.20 ve 300 mM NaCl uygulamasında 3.46 olarak tespit edilmiştir. Kontrol grubunda ise ortalama görsel zarar skoru yalnızca 0.12 olup, bu sonuçlar tuzluluk stresinin bitki sağlığı üzerinde doza bağımlı olumsuz etkisini açıkça ortaya koymaktadır.

Ceviz genotipleri açısından, Fernor (4.35), Antalya-3 (3.64) ve Chandler (3.57) ceviz çeşitleri, tuz stresine karşı en yüksek görsel zarar skorlarını göstermiştir. Bu çeşitlerde özellikle 300 mM NaCl uygulaması sonrası skorların 4.6 düzeyinde seyretmesi, ileri düzeyde yaprak sararması, kıvrılma ve kurumaların meydana geldiğini işaret etmektedir. Dolayısıyla bu çeşitler, morfolojik ve fizyolojik düzeyde tuzluluk stresine karşı yüksek derecede duyarlılık göstermiştir.

Buna karşın, Sölez-1 (2.10), Serr (2.45) ve Yalova-3 (2.42) ceviz çeşitlerinde tuz stresi altında gözlemlenen zarar düzeyleri istatistiki açıdan anlamlı şekilde düşük bulunmuştur. Bu çeşitlerde 300 mM NaCl uygulamasında dahi görsel skala puanlarının düşük seyretmesi, tuz stresine karşı daha yüksek düzeyde dayanıklılık gösterdiklerini ortaya koymaktadır. Özellikle Sölez-1 çeşidinde 300 mM NaCl konsantrasyonunda 2.25, Serr ceviz çeşidinde ise 2.58 değerinde zarar skoru kaydedilmiş olup, bu skorlar diğer genotiplere kıyasla oldukça düşük olduğu saptanmıştır.

Çizelge 4.4. Farklı ceviz çeşitlerinin 4 farklı tuz dozunda görsel olarak skala ile değerlendirilmesi

Görsel Skala İle Değ. (1-5)	Tuz Dozları				Tuzluluk Ortalama	Kontrol
Çeşitler	300 mM	225 mM	150 mM	75 mM		
Chandler	4.65 ±0.24	4.33 ±0.25	3.21 ±0.04	2.08 ±0.36	3.57 bc	0.13 ±0.22
Antalya-3	4.63 ±0.11	4.52 ±0.13	3.27 ±0.2	2.13 ±0.8	3.64 b	0.19 ±0.32
Fernor	4.64 ±0.2	4.63 ±0.14	4.49 ±0.16	3.64 ±0.52	4.35 a	0.06 ±0.11
Oğuzlar-77	3.48 ±0.34	3.08 ±0.31	3.02 ±0.25	2.54 ±0.34	3.03 ef	0.13 ±0.22
Howard	4.04 ±0.42	3.94 ±0.54	3.15 ±0.2	3.00 ±0.63	3.53 bc	0.19 ±0.32
98-115	3.77 ±0.26	3.17 ±0.18	3.10 ±0.19	2.23 ±0.47	3.07 d-f	0.06 ±0.11
Şen-1	3.52 ±0.47	3.21 ±0.47	3.00 ±0.47	2.88 ±0.11	3.15 de	0.25 ±0.43
Şebin	3.96 ±0.07	3.75 ±0.45	3.52 ±0.22	2.69 ±0.29	3.48 bc	0.13 ±0.22
Maras-18	3.56 ±0.06	3.23 ±0.16	2.31 ±0.17	1.77 ±0.66	2.72 gh	0.25 ±0.43
Hartley	3.48 ±0.44	3.29 ±0.56	3.08 ±0.2	2.60 ±0.14	3.11 d-f	0.19 ±0.32
230/37	2.71 ±0.85	2.69 ±0.66	2.31 ±0.56	2.23 ±0.04	2.49 h-j	0.13 ±0.22
77-H-1	2.79 ±0.19	2.54 ±0.16	2.31 ±0.17	1.83 ±0.38	2.37 jk	0.06 ±0.11
Kaman-1	2.88 ±0.05	2.78 ±0.3	2.56 ±0.11	2.48 ±0.84	2.68 g-ı	0.13 ±0.22
KM-2	3.11 ±0.15	2.91 ±0.17	2.90 ±0.34	2.44 ±0.38	2.84 fg	0.19 ±0.32
Maras-12	3.39 ±0.13	3.17 ±0.07	2.81 ±0.14	2.74 ±0.23	3.03 ef	0.09 ±0.16
Midland	3.75 ±0.22	3.52 ±0.19	3.33 ±0.5	2.75 ±0.47	3.34 cd	0.13 ±0.22
Yalova-3	3.15 ±0.1	2.56 ±0.23	2.25 ±0.41	1.71 ±0.04	2.42 ij	0.13 ±0.22
Serr	2.58 ±0.18	2.43 ±0.26	2.43 ±0.38	2.34 ±0.34	2.45 h-j	0.03 ±0.05
Sölez-1	2.25 ±0.11	2.09 ±0.08	2.06 ±0.06	1.99 ±0.11	2.10 k	0.03 ±0.05
214/47	3.00 ±0.75	2.73 ±0.91	2.44 ±0.17	2.19 ±0.06	2.59 g-j	0.00 ±0
Pedro	3.31 ±0.46	2.66 ±0.16	2.66 ±0.19	2.07 ±0.2	2.68 g-ı	0.06 ±0.11
Genel ort	3.46 a	3.20 b	2.87 c	2.40 d		0.12 e

*Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasında istatistiki düzeyde önemli farklılık bulunmaktadır ((p<0.0001) (LSD %5= 0.28)) ((p<0.0001) (LSD %5= 0.11)) .

Bu çalışmada, ceviz genotiplerinin tuzluluk stresine karşı gösterdiği morfolojik tepkiler, görsel zarar skoru yöntemi kullanılarak sistematik biçimde değerlendirilmiştir. Görsel skala yöntemi, bitkilerde tuz stresine bağlı olarak ortaya çıkan yaprak nekrozu, kloroz, deformasyon ve kurumalar gibi stres belirtilerinin sayısal olarak derecelendirilmesine olanak sağlamaktadır. Tuz uygulamalarına maruz bırakılan bitkilerde zarar skorlarının artan tuz dozlarına paralel olarak yükselmesi, tuzluluk stresinin fizyolojik etkilerinin dışsal semptomlar aracılığıyla doğrudan gözlemlenebileceğini göstermektedir.

Çalışmada 300 mM NaCl uygulaması altında ortalama görsel zarar skorunun 3.46'ya yükselmesi, yüksek tuz konsantrasyonlarının ceviz fidanlarında ciddi doku bozulmalarına yol açtığını ve fotosentetik alanın kısıtlandığını ortaya koymuştur. Ji ve ark. (2022a) tarafından *Juglans microcarpa* türü üzerinde yürütülen bir çalışmada rapor edilen yaprak solması, kıvrılması ve erken yaprak dökümü gibi şiddetli stres belirtileri ile paralellik göstermektedir.

Görsel zarar skorları genotip bazında incelendiğinde, Fernor, Antalya-3 ve Chandler ceviz çeşitleri, 300 mM NaCl seviyesinde 4.6 düzeylerine kadar çıkan skorlarla en yüksek zararı göstermiştir. Bu çeşitlerde gözlemlenen yüksek zarar düzeyleri, aynı zamanda klorofil içeriğinde ciddi azalmalar ve yaprak sıcaklığında belirgin artışlarla da desteklenmiş, bu çeşitlerin çok yönlü fizyolojik kırılganlığa sahip olduğunu ortaya koymuştur. Özellikle Fernor ceviz çeşidinde artan tuz konsantrasyonları altında belirgin kuruma ve hatta bitki ölümüne kadar ilerleyen stres semptomları gözlenmiştir.

Öte yandan, Sölez-1, Serr ve Yalova-3 gibi çeşitler, stres koşullarında dahi düşük görsel zarar skorları ile ön plana çıkmıştır. Özellikle Sölez-1 ceviz çeşidi, 300 mM NaCl koşulunda yalnızca 2.25 puanlık zarar skoru ile en düşük değerlerden birini göstermiştir. Bu durum, bu çeşidin morfolojik olarak tuz stresini tolere edebilme kapasitesine sahip olduğunu ve stres koşullarında yapısal bütünlüğünü koruyabildiğini göstermektedir. Serr ve Yalova-3 ceviz çeşitlerinde de benzer şekilde sınırlı semptom gelişimi gözlenmiştir.

Görsel değerlendirme yöntemi, daha önce farklı bitki türlerinde de tuzluluk stresinin etkilerini belirlemek amacıyla başarıyla kullanılmıştır. Karanlık (2001) tuz stresinin yaşlı yapraklarda sararma, kloroz ve nekroz gibi belirtilerle kendini gösterdiğini rapor etmiş; Karipçin (2009), Daşgan ve Koç (2009), Aktaş (2002) ve Kuşvuran (2010) gibi araştırmacılar ise tuzluluk stresine karşı bitki toleransının belirlenmesinde görsel skala yönteminin güvenilir bir parametre olduğunu vurgulamışlardır.

Bu çalışmada, ceviz genotiplerinin tuzluluk stresine karşı gösterdikleri morfolojik duyarlılık düzeylerinin görsel skala yöntemiyle etkili bir şekilde değerlendirilebileceğini göstermiştir. Sölez-1, Serr ve Yalova-3 gibi düşük zarar skorlarına sahip çeşitler, stres koşullarında morfolojik bütünlüklerini koruyarak yüksek tolerans göstermekte ve bu özellikleri sayesinde ilerideki ıslah programlarında hem fizyolojik hem de morfolojik dayanıklılık göstergeleri bakımından önemli adaylar olarak değerlendirilebilmektedir.

4.1.5. Yaprak Sayısı (adet/ bitki)

Bu çalışmada, 21 farklı ceviz genotipine dört farklı NaCl konsantrasyonu (75, 150, 225 ve 300 mM) uygulanarak, tuzluluk stresinin yaprak sayısı üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir (Çizelge 4.5). Elde edilen bulgular, artan tuz konsantrasyonlarının yaprak sayısında genel olarak azalmaya yol açtığını göstermektedir. Kontrollere kıyasla, tüm tuz uygulamalarında yaprak sayısında düşüş gözlenmiş olup, bu azalışın tuzluluk seviyenin artmasıyla birlikte olduğu tespit edilmiştir. Genel ortalamalar incelendiğinde, kontrol grubunda 7.36 adet/bitki olan yaprak sayısı, 75 mM NaCl uygulamasında 6.39 adet/bitki, 150 mM NaCl dozunda 5.92 adet/bitki, 225 mM NaCl uygulamasında 5.40 adet/bitki ve 300 mM NaCl ise 4.82 adet/bitki olarak belirlenmiştir.

Genotip bazında değerlendirildiğinde, Sölez-1, Yalova-3, Serr ve Midland ceviz çeşitlerinin yaprak sayısı bakımından yüksek performans sergilediği belirlenmiştir. Özellikle Sölez-1 ceviz çeşidi, genel tuzluluk ortalamasında 7.76 adet/bitki ile en yüksek değeri göstermiştir. Yalova-3 (7.39 adet/bitki) ve Serr (7.23 adet/bitki) çeşitleri de yaprak sayısını yüksek düzeyde korumuş, bu da bu ceviz çeşitlerinin tuz stresine karşı dayanıklı morfolojik özelliklere sahip olduğunu göstermektedir.

Buna karşılık, Fernor, Hartley ve Pedro gibi ceviz çeşitleri yaprak sayısında belirgin düşüşler yaşamıştır. Fernor ceviz çeşidinde genel ortalama 3.34 adet/bitki olarak kaydedilmiş olup, bu durum bu çeşidin tuz stresine karşı yüksek düzeyde duyarlılık gösterdiği belirlenmiştir. Pedro ve Hartley ceviz çeşitlerinde de benzer şekilde düşük yaprak sayıları gözlemlenmiştir.

Çizelge 4.5. Farklı ceviz genotiplerinin 4 farklı tuz konsantrasyonun yaprak sayısı üzerine etkisinin değerlendirilmesi

Yaprak Sayısı (adet/ bitki)	Tuz Dozları				Tuzluluk Ortalama	Kontrol
Çeşitler	300 mM	225 mM	150 mM	75 mM		
Chandler	4.33 ±0.76	4.42 ±0.38	5.67 ±1.26	6.92 ±0.58	5.34 c-e	7.58 ±0.52
Antalya-3	4.33 ±0.38	4.75 ±0.5	5.58 ±0.76	5.83 ±0.63	5.12 d-f	7.83 ±0.63
Fernor	3.21 ±1.13	3.29 ±0.73	3.42 ±0.52	3.46 ±0.56	3.34 g	4.83 ±4.22
Oğuzlar-77	3.58 ±1.46	4.83 ±1.04	6.08 ±0.8	6.83 ±1.01	5.33 c-e	7.42 ±0.38
Howard	3.67 ±0.63	4.92 ±0.14	5.25 ±0	5.33 ±1.18	4.79 ef	6.08 ±0.29
98-115	3.50 ±1.32	4.58 ±0.88	5.08 ±0.88	5.67 ±0.52	4.70 ef	8.00 ±0.43
Şen-1	5.25 ±1.39	6.08 ±0.76	6.25 ±0.5	7.17 ±1.7	6.18 b	9.42 ±0.63
Şebin	3.83 ±0.63	4.50 ±0.25	4.58 ±1.01	4.67 ±0.14	4.39 f	7.75 ±0.75
Maraş-18	5.42 ±0.52	5.67 ±1.01	6.75 ±0.66	7.17 ±0.76	6.25 b	7.58 ±0.29
Hartley	3.92 ±0.95	4.33 ±0.29	4.42 ±0.52	5.58 ±1.42	4.56 f	6.42 ±0.14
230/37	5.50 ±0.25	5.75 ±0.5	6.08 ±0.76	6.33 ±1.18	5.91 bc	7.75 ±0.5
77-H-1	5.00 ±1.39	5.58 ±0.72	6.00 ±0	6.42 ±0.29	5.75 b-d	6.83 ±0.14
Kaman-1	3.83 ±1.06	4.42 ±0.64	5.13 ±0.7	5.83 ±0.71	4.80 ef	6.04 ±0.94
KM-2	5.17 ±0.75	5.29 ±1.08	5.54 ±0.85	6.08 ±0.95	5.78 b-d	6.33 ±0.51
Maraş-12	5.40 ±0.52	5.73 ±1.29	6.04 ±0.9	6.13 ±0.22	5.94 bc	6.50 ±1
Midland	6.33 ±0.95	6.58 ±1.01	7.42 ±1.53	8.25 ±0.75	7.14 a	10.33 ±0.95
Yalova-3	6.17 ±0.8	7.67 ±1.63	7.75 ±0.5	8.00 ±0.66	7.39 a	9.00 ±2.46

(Çizelge 4.5'in devamı)

Serr	6.75 ±1.31	7.13 ±0.82	7.38 ±0.9	7.67 ±0.97	7.23 a	7.83 ±1.37
Sölez-1	6.63 ±0.98	7.46 ±0.69	8.04 ±1.28	8.88 ±0.78	7.76 a	8.92 ±0.56
214/47	5.17 ±1.88	5.75 ±1.75	6.75 ±2.25	6.83 ±1.01	6.18 b	7.08 ±0.95
Pedro	4.33 ±1.49	4.58 ±0.63	5.04 ±1	5.08 ±2.89	4.77 ef	5.13 ±0.88
Genel ort	4.82 e	5.40 d	5.92 c	6.39 b		7.36 a

*Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasında istatistiki düzeyde önemli farklılık bulunmaktadır ((p<0.0001) (LSD %5= 0.76)) ((p<0.0001) (LSD %5= 0.37)).

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar, artan NaCl konsantrasyonlarının ceviz genotiplerinde yaprak sayısında sistematik bir azalmaya yol açtığını göstermiştir. Kontrollere kıyasla tüm tuz uygulamalarında yaprak sayısında düşüş gözlenmiş ve bu düşüşün uygulanan tuz dozunun artmasıyla birlikte daha da belirgin hale geldiği belirlenmiştir. Kontrollü koşullarda 7.36 adet/bitki olan ortalama yaprak sayısının, 300 mM NaCl uygulamasında 4.82 adet/bitki düzeyine gerilemesi, tuzluluk stresinin bitkisel büyüme süreçleri üzerindeki baskılayıcı etkilerini açıkça ortaya koymaktadır.

Lotfi ve ark. (2009a, 2009b) tarafından ceviz tohumlarında yürütülen çalışmalarda, artan NaCl konsantrasyonlarının çimlenme performansı ve vegetatif gelişim üzerinde belirgin olumsuz etkiler yarattığı rapor edilmiştir. Özellikle hassas genotiplerde kök ve sürgün büyümesinin ciddi şekilde sınırlandığı, dolayısıyla yaprak sayısında da azalma yaşandığı belirtilmiştir. Akça ve Samsunlu (2012) çalışmasında da, farklı ceviz çeşitlerinde tuzluluk stresinin canlı bitki ağırlığı, kuru madde birikimi ve klorofil içeriği gibi büyüme parametrelerini olumsuz etkilediği bildirilmiş olup, yaprak sayısındaki azalma bu genel büyüme gerilemesinin doğrudan bir yansıması olarak değerlendirilmektedir.

Benzer sonuçlar diğer türlerde de gözlemlenmiştir. Karimi ve ark. (2009) ve Kamiab ve ark. (2012), antepfıstığı çöğürlerinde artan tuzluluk seviyelerinin yaprak sayısında azalma ve vegetatif büyümede gerilemeye neden olduğunu belirtmişlerdir. Parsa ve Karimian (1975), Spiegel-Roy ve ark. (1997), Glenn ve ark. (1997), Mehdi ve ark. (2010) ve Adish ve ark. (2010) tarafından yapılan araştırmalarda da antepfıstığı anaçlarında artan tuzluluk seviyelerinin benzer şekilde yaprak sayısını azalttığı ve büyüme performansını olumsuz etkilediği rapor edilmiştir. Ayrıca, Ouraei ve ark. (2010) tarafından Ferragnes, GF677 ve Tuono badem anaçlarında yapılan bir çalışmada, 50 mM NaCl seviyesinde yaprak sayısında artış gözlenmiş olsa da, daha yüksek tuz seviyelerinde bu artışın azaldığı ve olumsuz etkilerin belirginleştiği ifade edilmiştir.

Bu çalışma kapsamında genotip bazında yapılan değerlendirmede, Sölez-1, Yalova-3 ve Serr ceviz çeşitlerinin yaprak sayılarını stres koşullarında dahi yüksek düzeyde koruyabildikleri belirlenmiştir. Öte yandan, Fernor, Hartley ve Pedro gibi ceviz çeşitlerinde yaprak sayısında belirgin düşüşler gözlemlenmiş ve bu durum, söz konusu çeşitlerin tuzluluk stresine karşı daha yüksek düzeyde duyarlılık gösterdiğini ortaya koymuştur. Lotfi ve ark. (2009a) çalışmasında da Hartley ve Pedro çeşitlerinin yarı duyarlı veya hassas sınıfta değerlendirildiği bildirilmiştir. Fernor çeşidinde

düşük yaprak sayısının yanında, düşük klorofil içeriği ve yaprak su içeriği gibi diğer fizyolojik bozulmaların da eşlik ettiği görülmüştür. Bu sonuçlar, tuz stresinin bitkilerde sadece büyüme üzerinde değil, çok boyutlu fizyolojik sistemler üzerinde de baskı oluşturduğunu göstermektedir.

Bu çalışmada, ceviz genotiplerinde tuzluluk stresine karşı verilen morfolojik yanıtların, yaprak sayısı gibi parametreler üzerinden güvenilir şekilde değerlendirilebileceğini ortaya koymuştur. Sölez-1, Yalova-3 ve Serr gibi çeşitlerin stres koşullarında dahi yaprak sayılarını koruyabilmeleri, bu çeşitlerin ileri seleksiyon programlarında stres toleransı yüksek çeşitler olarak değerlendirilmesi gerektiğini desteklemektedir. Elde edilen bulgular, farklı türlerde yapılan önceki çalışmalarla tutarlılık göstermekte ve cevizde tuz stresine karşı dayanıklılık mekanizmalarının büyük ölçüde genetik temelli olduğunu ortaya koymaktadır.

4.1.6. Yaprak Oransal Su İçeriği

Bu çalışmada, 21 farklı ceviz genotipine uygulanan dört farklı NaCl konsantrasyonunun (75, 150, 225 ve 300 mM) yaprak oransal su içeriği (RWC) üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir (Çizelge 4.6). Yaprak oransal su içeriği, bitkinin su tutma kapasitesini ve hücre içi su dengesini yansıtan önemli bir fizyolojik parametre olup, stres koşullarına karşı bitkisel tepkileri belirlemede yaygın olarak kullanılmaktadır. Elde edilen veriler, artan tuz konsantrasyonlarının yaprak su içeriğinde kademeli bir azalmaya neden olduğunu ortaya koymuştur. Kontrol grubunda ortalama RWC değeri %81.45 olarak belirlenmişken, bu değer 75 mM NaCl dozunda %79.25, 150 mM NaCl uygulamasında %77.03, 225 mM NaCl dozunda %73.92 ve 300 mM NaCl uygulamasında ise %70.90'a kadar gerilemiştir. Bu yaprak oransal su içeriği azalma eğilimi, tuz stresinin osmotik baskı oluşturarak yaprak dokularındaki su dengesini bozduğunu ve su kaybına yol açtığını göstermektedir.

Ceviz genotipleri bazında yapılan değerlendirmede, yaprak oransal su içeriğini stres koşullarında en yüksek düzeyde koruyan çeşitlerin Sölez-1 (%79.01), Serr (%78.95), 230/37 (%78.76) ve 77-H-1 (%78.24) olduğu belirlenmiştir. Bu ceviz çeşitlerinde 300 mM NaCl uygulamasında bile yaprak su içeriği %73'ün üzerinde kalmış, bu durum su kaybının sınırlı düzeyde gerçekleştiğini ve çeşitlerin hücresel su tutma yeteneklerinin yüksek olduğunu göstermektedir.

Buna karşılık, özellikle Chandler (%69.20), Antalya-3 (%71.42) ve Fernor (%70.75) gibi çeşitlerde, yaprak oransal su içeriğinde önemli düzeyde düşüşler meydana gelmiştir. Chandler ceviz çeşidinde 300 mM NaCl uygulaması sonrası RWC değeri %60.64'e kadar gerilemiştir. Bu değer, çeşidin su tutma kapasitesinin düşük olduğunu ve tuz stresine karşı su kaybını önlemede yetersiz kaldığını göstermektedir.

Çizelge 4.6. Farklı ceviz genotiplerinin 4 farklı tuzluluk konsantrasyonunun yaprak oransal su içeriği üzerine etkisinin değerlendirilmesi

Yaprak Oransal Su İçeriği (%)	Tuz Dozları				Tuzluluk Ortalama	Kontrol
Çeşitler	300 mM	225 mM	150 mM	75 mM		
Chandler	60.64 ±9.34	65.84 ±3.24	72.50 ±3.21	77.81 ±0.45	69.20 j	81.31 ±0.36
Antalya-3	65.69 ±1.74	66.78 ±5.88	76.42 ±2.18	76.78 ±0.34	71.42 h-j	81.14 ±0.26
Fernor	67.93 ±0.91	68.06 ±10.86	71.78 ±1.93	75.21 ±0.45	70.75 ij	80.91 ±0.13
Oğuzlar-77	72.23 ±6.11	72.43 ±3.81	78.01 ±0.81	78.64 ±0.49	75.33 c-f	81.37 ±0.51
Howard	71.73 ±3.69	74.81 ±0.53	75.16 ±0.35	79.73 ±0.47	75.36 c-f	81.28 ±0.08
98-115	71.43 ±4.78	73.72 ±0.8	79.72 ±0.91	79.99 ±0.2	76.22 b-d	81.34 ±0.41
Şen-1	72.54 ±6.59	73.10 ±1.77	75.86 ±0.31	81.52 ±0.57	75.76 c-e	81.54 ±0.25
Şebin	73.63 ±0.39	74.12 ±4.23	77.04 ±2.79	77.81 ±0.33	75.65 c-e	81.79 ±0.45
Maraş-18	67.73 ±5.3	68.65 ±4.13	73.08 ±3.4	80.03 ±0.09	72.37 g-i	80.99 ±0.22
Hartley	65.70 ±3.95	71.93 ±1.11	77.72 ±1.03	79.38 ±0.76	73.68 e-h	82.09 ±0.13
230/37	73.87 ±0.71	79.34 ±0.17	80.87 ±0.06	80.97 ±0.17	78.76 a	81.44 ±0.15
77-H-1	73.36 ±1.34	79.56 ±0.37	79.71 ±0.67	80.33 ±0.16	78.24 ab	81.70 ±0.07
Kaman-1	71.92 ±4.57	74.58 ±2.52	76.50 ±2.59	79.81 ±0.19	75.70 c-e	81.87 ±0.45
KM-2	72.10 ±1.56	76.03 ±0.44	78.59 ±2.71	78.67 ±0.53	76.35 b-d	81.62 ±0.08
Maraş-12	66.40 ±4.5	74.42 ±1.05	75.78 ±1.78	76.87 ±1.56	73.37 f-h	81.45 ±0.31
Midland	67.98 ±3.85	75.48 ±2.76	75.79 ±0.59	78.34 ±1.68	74.40 d-g	81.27 ±0.26
Yalova-3	74.54 ±1.82	78.02 ±1.9	79.65 ±0.92	80.76 ±0.21	78.24 ab	81.44 ±0.16
Serr	76.09 ±1.83	78.75 ±1.74	80.34 ±0.08	80.61 ±0.7	78.95 a	81.44 ±0.26
Sölez-1	77.71 ±2.38	77.97 ±0.26	79.17 ±0.39	81.18 ±0.16	79.01 a	81.42 ±0.28
214/47	74.57 ±1.14	75.59 ±0.52	78.05 ±1.16	80.59 ±0.25	77.20 a-c	81.68 ±0.27
Pedro	71.15 ±1.68	73.10 ±4.29	75.80 ±1.64	79.09 ±0.42	74.79 d-f	81.46 ±0.24
Genel ort	70.90 e	73.92 d	77.03 c	79.25 b		81.45 a

*Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasında istatistiki düzeyde önemli farklılık bulunmaktadır ((p<0.0001) (LSD %5= 2.27)) ((p<0.0001) (LSD %5= 0.88)) .

Bu çalışmada, ceviz genotiplerinin tuzluluk stresi altındaki su durumları, yaprak oransal su içeriği (RWC) parametresi üzerinden değerlendirilmiştir. RWC, bitkilerin su tutma kapasitelerini ve hücresel düzeyde osmotik dengeyi koruyabilme yeteneklerini doğrudan yansıtan kritik bir fizyolojik belirteçtir. Elde edilen bulgular, NaCl konsantrasyonunun artışı ile birlikte RWC değerlerinde belirgin bir azalma eğilimi olduğunu göstermiştir. Özellikle 300 mM NaCl uygulamasında ortalama RWC'nin %70.90'a kadar gerilemesi, tuzluluk stresinin bitkilerde ciddi su kaybına yol açtığını ve hücresel su düzeninin önemli ölçüde bozulduğunu ortaya koymaktadır.

Vahdati (2013), ceviz fidelerinde ozmotik stres koşulları altında RWC değerlerinde azalma meydana geldiğini ve bu azalmanın özellikle stres toleransı düşük genotiplerde daha belirgin olduğunu belirtmiştir. Ayrıca, prolin birikimi ile RWC arasındaki pozitif korelasyon vurgulanarak, su kaybını daha etkin şekilde dengeleyebilen genotiplerin stres toleransı bakımından üstünlük sağladığı ifade edilmiştir. Benzer şekilde, Ji ve ark. (2022b) de farklı *Juglans* genotiplerinde

yürüttükleri çalışmada, NaCl stresinin RWC üzerinde olumsuz etkiler oluşturduğunu ve bu etkinin genotipler arasında anlamlı farklılıklar gösterdiğini bildirmiştir.

Diğer türlerde yürütülen araştırmalar da bu sonuçları desteklemektedir. Shah ve ark. (2011), badem anaçlarına uygulanan dört farklı tuz dozu sonucunda yaprak, gövde ve kök kuru ağırlıklarında azalmalar meydana geldiğini belirtmiş; Ouraei ve ark. (2010) ise tuz stresinin farklı seviyelerinde taze ve kuru yaprak ağırlığında değişimler gözlemlemişlerdir. Ayrıca, Şahin (2018) ceviz anaçları üzerinde gerçekleştirdiği çalışmada, genetik çeşitliliğin tuz stresine dayanıklılıkta önemli bir rol oynadığını vurgulamış ve Chandler çeşidinin düşük yaprak oransal su içeriği (%71.62) ile stres koşullarına karşı daha hassas olduğunu rapor etmiştir.

Bu çalışmada da benzer şekilde, Chandler, Antalya-3 ve Fernor çeşitlerinde RWC değerleri 300 mM NaCl uygulamasında %70'in altına düşmüş ve özellikle Chandler çeşidinde bu değer %60.64'e kadar gerilemiştir. Bu durum, söz konusu çeşitlerin su yönetimi mekanizmalarının stres koşullarında yetersiz kaldığını ve hücreler arası su dengesinin bozulduğunu göstermektedir. Chandler ceviz çeşidinin bu düşük su tutma kapasitesi, aynı zamanda yaprak sıcaklığında artış ve klorofil içeriğinde azalma gibi diğer fizyolojik stres göstergeleriyle de desteklenmiştir.

Öte yandan, 300 mM NaCl koşulunda dahi RWC değerlerini %73'ün üzerinde koruyabilen Sölez-1, Serr, 230/37 ve 77-H-1 çeşitleri ön plana çıkmıştır. Bu çeşitlerde yüksek RWC düzeylerinin korunması, hücresel su kaybının sınırlandırıldığını ve osmotik dengenin etkin bir şekilde sağlandığını göstermektedir. Ayrıca, bu çeşitlerin düşük görsel zarar skorları, yüksek klorofil içerikleri ve daha stabil yaprak sıcaklıkları ile desteklenen çok yönlü stres tolerans mekanizmalarına sahip oldukları anlaşılmaktadır.

Bu çalışmada, yaprak oransal su içeriğinin ceviz genotiplerinin tuzluluk stresine karşı dayanıklılık düzeylerini belirlemede güvenilir bir fizyolojik gösterge olduğunu ortaya koymuştur. Özellikle Sölez-1, Serr ve 230/37 gibi çeşitlerin güçlü RWC profilleri, bu çeşitlerin kurak ve tuzlu ortamlarda yetiştiricilik potansiyeline sahip olduklarını ve ıslah programlarında öncelikli olarak değerlendirilmesi gerektiğini göstermektedir.

4.1.7. Kök Kuru Madde Miktarı

Bu çalışmada, 21 farklı ceviz genotipine uygulanan dört farklı tuz konsantrasyonunun (75, 150, 225 ve 300 mM NaCl) kök kuru madde miktarı üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir (Çizelge 4.7). Kök kuru madde miktarı, bitkinin tuz stresine karşı kök düzeyinde verdiği morfolojik yanıtların önemli bir göstergesidir. Elde edilen bulgular, artan tuz konsantrasyonlarının kök kuru madde birikimini baskıladığını ve bu etkinin genotipten genotipe istatistiki açıdan anlamlı farklılıklar gösterdiğini ortaya koymuştur. Genel ortalamalar incelendiğinde, kontrol grubundaki kök kuru madde miktarı %28.65 iken, bu değer 75 mM NaCl uygulamasında %26.83, 150 mM NaCl dozunda %25.47, 225 mM NaCl uygulamasında %24.26 ve 300 mM NaCl dozunda %22.42'ye kadar

düşmüştür. Bu kök kuru madde azalma eğilimi, yüksek tuz konsantrasyonlarının kök gelişimini inhibe ettiğini ve bitki dokularında biyokütle üretiminin sınırlandığını göstermektedir.

Genotip bazında yapılan değerlendirmede, tuz stresine karşı kök kuru madde miktarını en yüksek düzeyde koruyan çeşitler arasında Serr (%28.68), Şen-1 (%27.12), Yalova-3 (%27.02), Maraş-18 (%27.44) ve Sölez-1 (%27.17) ceviz çeşitleri öne çıkmıştır. Bu ceviz çeşitlerinde 300 mM NaCl uygulamasında bile kök kuru madde değerleri %25'in üzerinde kalmış, bu durum bu çeşitlerin tuz stresi altında dahi kök dokularında madde birikimini sürdürebildiklerini göstermektedir.

Buna karşın, Hartley (%19.17), Howard (%22.41), Fernor (%21.68) ve Midland (%22.13) ceviz çeşitlerinde, kök kuru madde miktarının düşük seviyelerde kaldığı belirlenmiştir. Özellikle Hartley ceviz çeşidinde 300 mM NaCl uygulaması sonrası kök kuru madde miktarı %12.96 ile en düşük değer olarak ölçülmüştür. Bu ceviz çeşitlerinde, tuz stresinin kök dokusunda madde birikimini ciddi düzeyde sınırladığı ve bu nedenle tuz stresine duyarlılıklarının yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.7. Farklı ceviz genotiplerinin 4 farklı tuz dozunun kök kuru madde miktarı üzerine etkisinin değerlendirilmesi

<u>Kök Kuru Madde Miktarı (%)</u>	Tuz Dozları				Tuzluluk Ortalama	Kontrol
Çeşitler	300 mM	225 mM	150 mM	75 mM		
Chandler	24.90 ±1.18	26.16 ±2.03	28.01 ±0.61	28.04 ±1.93	26.78 b	30.66 ±1.27
Antalya-3	22.06 ±1.16	22.71 ±0.77	25.20 ±0.68	27.82 ±0.63	24.45 de	30.75 ±0.98
Fernor	21.23 ±2.14	21.62 ±1.43	21.85 ±1.2	22.02 ±3.04	21.68 g	22.19 ±1.41
Oğuzlar-77	21.08 ±2.48	22.69 ±1.88	23.21 ±0.6	23.83 ±1.02	22.70 f	26.04 ±1.56
Howard	18.86 ±0.89	22.17 ±2.21	22.79 ±1.8	25.83 ±1.31	22.41 fg	27.36 ±1.12
98-115	20.69 ±2.76	23.30 ±1.49	23.40 ±1.32	24.51 ±2.1	22.98 f	24.59 ±1.56
Şen-1	25.03 ±1.32	25.25 ±1.91	26.66 ±1.66	31.53 ±1.06	27.12 b	32.94 ±0.44
Şebin	23.22 ±2.89	25.15 ±0.68	25.57 ±0.17	26.30 ±1.8	25.06 c-e	26.97 ±1.77
Maraş-18	25.27 ±2.88	27.73 ±0.42	28.00 ±1.11	28.75 ±1.63	27.44 b	29.79 ±1.45
Hartley	12.96 ±1.2	20.92 ±1	20.98 ±2.01	21.80 ±0.47	19.17 h	22.38 ±1.16
230/37	23.78 ±1.24	25.00 ±1.55	26.02 ±1.58	27.39 ±0.43	25.55 c	28.05 ±1.79
77-H-1	22.16 ±1.57	24.45 ±0.24	26.72 ±0.3	26.72 ±0.29	25.01 c-e	29.07 ±2.27
Kaman-1	23.94 ±1.73	24.77 ±1.82	25.31 ±1.51	26.03 ±1.32	25.01 c-e	28.56 ±1.47
KM-2	23.96 ±0.75	24.53 ±2.29	26.74 ±1.06	26.92 ±0.93	25.54 c	33.58 ±0.94
Maraş-12	19.46 ±1.19	25.59 ±2	25.29 ±2.08	26.42 ±1.1	24.19 e	31.54 ±0.83
Midland	20.51 ±1.25	21.29 ±1.11	21.40 ±1.19	25.30 ±1.31	22.13 fg	27.09 ±0.96
Yalova-3	24.88 ±2.46	25.14 ±1.81	27.59 ±1.44	30.48 ±1.72	27.02 b	32.35 ±3.02
Serr	26.60 ±1.68	27.14 ±1.13	29.93 ±0.92	31.05 ±3.3	28.68 a	31.77 ±0.29
Sölez-1	23.33 ±1.89	26.24 ±1.71	28.20 ±1.57	30.90 ±1.12	27.17 b	31.85 ±1.11
214/47	22.76 ±2.87	23.49 ±1.92	27.68 ±1.28	26.72 ±2.05	25.16 cd	27.86 ±1.34
Pedro	24.14 ±2.38	24.16 ±0.42	24.28 ±2.21	25.13 ±1.74	24.43 de	26.33 ±0.96
Genel ort	22.42 e	24.26 d	25.47 c	26.83 b		28.65 a

*Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasında istatistiki düzeyde önemli farklılık bulunmaktadır ((p<0.0001) (LSD %5= 0.96)) ((p<0.0001) (LSD %5= 0.45)).

Kök kuru madde miktarı, bitkilerin stres koşulları altındaki büyüme performanslarını ve özellikle kök bölgesindeki biyokütle birikimini değerlendirmek açısından önemli bir morfolojik parametre olarak kabul edilmektedir. Bu çalışma kapsamında elde edilen bulgular, artan NaCl konsantrasyonlarının ceviz genotiplerinde kök kuru madde miktarını sistematik şekilde azalttığını ortaya koymuştur. Özellikle 300 mM NaCl uygulamasında ortalama kök kuru madde oranının %22.42'ye kadar gerilemesi, yüksek tuz stresinin kök gelişimi ve dokusal birikimi belirgin şekilde inhibe ettiğini göstermektedir.

Lotfi ve ark. (2009a, 2009b), cevizlerde uygulanan kuraklık ve tuz stresinin şiddeti arttıkça kök uzunluğu ve kuru kök ağırlığında belirgin azalmalar meydana geldiğini rapor etmişlerdir. Ayrıca, farklı ceviz genotiplerinin tuz stresine verdikleri kök-sürgün oranı ve madde birikimi tepkilerinin önemli düzeyde çeşitlilik gösterdiği bildirilmiştir. Bu çalışmada Hartley ceviz çeşidinde tespit edilen düşük kök kuru madde miktarı (%12.96), bu çeşidin yüksek tuz stresine karşı daha hassas olduğunu ve Lotfi ve ark. (2009b) tarafından bildirilen bulgularla uyumlu olduğunu göstermektedir. Benzer şekilde, Adish ve ark. (2010) tarafından antepfıstığı çöğürlerinde yapılan çalışmada da tuzluluk stresinin kök yaş ve kuru ağırlığını olumsuz etkilediği ve artan tuzluluk seviyeleriyle birlikte kök ağırlığında ciddi azalmaların meydana geldiği rapor edilmiştir.

Bu çalışmada, 300 mM NaCl uygulaması altında dahi kök kuru madde miktarını %25'in üzerinde koruyabilen çeşitler arasında Serr, Şen-1, Yalova-3, Maraş-18 ve Sölez-1 ceviz çeşitleri öne çıkmaktadır. Bu ceviz çeşitlerinde kök dokularında madde birikiminin sürdürülebilmesi, bu çeşitlerin tuz stresine karşı kök düzeyinde adaptif büyüme stratejileri geliştirdiklerini göstermektedir. Yüksek kök kuru madde oranı, tuz stresine rağmen su ve mineral alımını destekleyecek yapısal devamlılığın sağlandığını ve kök sisteminin fizyolojik işlevlerini sürdürebildiğini işaret etmektedir.

Öte yandan, Hartley, Howard, Fernor ve Midland gibi ceviz çeşitlerinde, kök kuru madde miktarında belirgin azalmalar gözlemlenmiştir. Özellikle Hartley çeşidinde kök kuru madde miktarının %12.96'ya kadar düşmesi, kök dokusunun stres koşullarında ciddi şekilde tahrip olduğunu ve madde birikiminin neredeyse durma noktasına geldiğini ortaya koymuştur. Bu durum, Hartley ceviz çeşidinde aynı zamanda düşük yaprak oransal su içeriği ve yüksek görsel zarar skoru gibi diğer stres göstergeleriyle de desteklenmiş olup, çoklu fizyolojik parametreler aracılığıyla stres duyarlılığı olduğu belirlenmiştir.

Bu çalışmada, kök kuru madde miktarının, ceviz genotiplerinin tuzluluk stresine karşı dayanıklılık düzeylerinin belirlenmesinde güvenilir bir morfolojik gösterge olduğunu ortaya koymuştur. Sölez-1, Serr ve Yalova-3 gibi ceviz çeşitlerinin kök dokularında madde birikimini sürdürebilmesi, bu çeşitlerin sürdürülebilir ceviz yetiştiriciliği için stres toleransı yüksek adaylar olarak değerlendirilmesini desteklemektedir.

4.1.8. Canlılık Oranları

Bu çalışmada, 21 farklı ceviz genotipinin dört farklı NaCl konsantrasyonuna (75, 150, 225 ve 300 mM) maruz bırakılmasının ardından canlılık oranları değerlendirilmiş ve tuz stresine karşı genotiplerin hayatta kalma kapasiteleri araştırılmıştır (Çizelge 4.8). Canlılık oranı, tuz stresinin bitki üzerindeki ölümcül etkilerini doğrudan yansıtan temel fizyolojik parametrelerden biri olup, stres toleransı bakımından genotipler arasında ayırım yapılmasına olanak tanımaktadır.

Genel ortalama değerlere göre, kontrol grubunda canlılık oranı tüm genotiplerde %100 olarak kaydedilmiş ve stres faktörünün yokluğunda tüm bitkilerin yaşadığı görülmüştür. Tuz uygulamalarında ise canlılık oranı 75 mM NaCl uygulamasında %96.66, 150 mM NaCl dozunda %90.19, 225 mM NaCl uygulamasında %83.85 ve 300 mM NaCl dozunda %77.42'ye kadar düşmüştür. Bu sonuçlar, artan tuz konsantrasyonunun bitki yaşama oranı üzerinde belirgin baskılayıcı bir etki oluşturduğunu göstermektedir.

Ceviz genotipleri düzeyinde değerlendirildiğinde, Sölez-1 ceviz çeşidi uygulanan tüm tuz dozlarında %100 canlılık oranı göstermiştir. Bu durum, bu ceviz çeşidinin tuz stresine karşı tam tolerans sergilediğini ve hayati fonksiyonlarını kesintisiz sürdürebildiğini ortaya koymaktadır. Sölez-1 ceviz çeşidini, %97.75 canlılık oranı ile Serr ve Maraş-18 ceviz çeşitleri, %95.5 ile 77-H-1, %93.5 ile 230/37, %93.25 ile 214/47 ceviz genotipleri takip etmiş; bu ceviz çeşitlerinin de yüksek dozlarda dahi canlılık oranını büyük ölçüde koruduğu tespit edilmiştir.

Buna karşın, Fernor ceviz çeşidi en düşük ortalama canlılık oranını (%60.25) göstermiştir. Özellikle 300 mM NaCl uygulamasında %41 oranında canlılık göstermesi, bu çeşidin tuz stresine karşı oldukça hassas olduğunu ve yoğun fizyolojik zarar gördüğünü göstermektedir. Maraş-12 (%78.75) ve Midland (%81.00) gibi ceviz çeşitlerinde de yüksek dozlarda canlılık oranı düşmüş, bu durum bu ceviz çeşitlerinin stres koşullarında yaşama kapasitesinin sınırlı olduğunu ortaya koymuştur.

Çizelge 4.8. Farklı ceviz genotiplerinin 4 farklı NaCl dozunun canlılık oranı üzerine etkisinin değerlendirilmesi

Canlılık Oranı (%)	Tuz Dozları				Tuzluluk Ortalama	Kontrol
Çeşitler	300 mM	225 mM	150 mM	75 mM		
Chandler	% 83 ±0.29	% 83 ±0.29	%100 ±0	%100 ±0	% 91.5 ab	%100 ±0
Antalya-3	% 75 ±0.43	% 83 ±0.29	% 83 ±0.29	%100 ±0	% 85.25 ab	%100 ±0
Fernor	% 41 ±0.52	% 50 ±0.5	% 75 ±0.43	% 75 ±0.43	% 60.25 c	%100 ±0
Oğuzlar-77	% 83 ±0.29	% 91 ±0.14	% 75 ±0.43	%100 ±0	% 87.25 ab	%100 ±0
Howard	% 75 ±0.43	% 83 ±0.29	% 91 ±0.14	% 91 ±0.14	% 85 ab	%100 ±0
98-115	%66 ±0.58	% 83 ±0.29	% 91 ±0.14	%100 ±0	% 85 ab	%100 ±0
Şen-1	% 83 ±0.29	% 83 ±0.29	% 83 ±0.29	%100 ±0	% 87.25 ab	%100 ±0
Şebin	%75 ±0.43	% 83 ±0.29	% 91 ±0.14	%100 ±0	% 85.25 ab	%100 ±0
Maraş-18	% 91 ±0.14	%100 ±0	%100 ±0	%100 ±0	% 97.75 ab	%100 ±0
Hartley	% 75±0.43	%75 ±0.43	% 91 ±0.14	% 91 ±0.14	% 83 ab	%100 ±0

(Çizelge 4.8'in devamı)

230/37	% 83 ±0.29	% 91 ±0.14	%100 ±0	%100 ±0	% 93.5ab	%100 ±0
77-H-1	% 91 ±0.14	% 91 ±0.14	%100 ±0	%100 ±0	% 95.5 ab	%100 ±0
Kaman-1	%66 ±0.58	% 75 ±0.43	%100 ±0	%100 ±0	% 85.25 ab	%100 ±0
KM-2	% 75 ±0.43	% 91 ±0.14	% 91 ±0.14	%100 ±0	% 89.25 ab	%100 ±0
Maraş-12	%66 ±0.58	% 75 ±0.43	% 75 ±0.43	% 91 ±0.14	% 78.75 bc	%100 ±0
Midland	% 75 ±0.43	% 75 ±0.43	% 83 ±0.29	% 91 ±0.14	% 81 abc	%100 ±0
Yalova-3	%66 ±0.58	% 83 ±0.29	% 91 ±0.14	%100 ±0	% 85 ab	%100 ±0
Serr	% 91 ±0.14	%100 ±0	%100 ±0	%100 ±0	% 97.75 ab	%100 ±0
Sölez-1	%100 ±0	%100 ±0	%100 ±0	%100 ±0	% 100 a	%100 ±0
214/47	% 91 ±0.14	% 91 ±0.14	% 91 ±0.14	%100 ±0	% 93.25 ab	%100 ±0
Pedro	% 75 ±0.43	% 75 ±0.43	% 83 ±0.29	% 91 ±0.14	% 81 abc	%100 ±0
Genel ort	% 77.42 e	% 83.85 d	% 90.19 c	% 96.66 b		% 100 a

*Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasında istatistiki düzeyde önemli farklılık bulunmaktadır ((p=0.008) (LSD %5= 0.18)) ((p=0.0002) (LSD %5= 0.11)).

Bu çalışmada, artan tuz konsantrasyonlarının canlılık oranlarını istatistiki açıdan anlamlı şekilde azalttığını ve tuz stresinin bitkisel yaşamsal süreçler üzerinde doğrudan baskılayıcı etkiler yarattığını açıkça ortaya koymuştur. Özellikle 300 mM NaCl uygulamasında ortalama canlılık oranının %77.42'ye kadar gerilemesi, yüksek tuz konsantrasyonlarının bitkilerde fizyolojik bozulmalara ve metabolik dengesizliklere neden olduğunu göstermektedir.

Ji ve ark. (2022a), *Juglans microcarpa* fidelerinde yüksek NaCl dozlarının hayatta kalma oranını düşürdüğünü ve bu etkinin stres süresi ve dozuyla doğrudan ilişkili olduğunu rapor etmiştir. Ayrıca, Wang ve ark. (2021), ceviz genotiplerinde yüksek tuz konsantrasyonlarının yaprak klorozu, su kaybı ve sistemik fizyolojik bozulmalara yol açarak canlılık oranını olumsuz etkilediğini bildirmiştir. Benzer şekilde, Javadisaber ve ark. (2014) tarafından yapılan çalışmada, Ankara armudu, Ayva ve Ahlat genotiplerine uygulanan dört farklı NaCl dozu (75, 150, 225 ve 300 mM) sonucunda, canlılık oranlarının genel olarak yüksek (%80.5–%100) seviyelerde korunduğu, ancak stres düzeyine bağlı olarak azalmalar gözlemlendiği belirtilmiştir. Bu çalışmalar, canlılık oranı parametresinin stresin bitkisel sistemler üzerindeki etkilerinin belirlenmesinde önemli bir fizyolojik gösterge olduğunu desteklemektedir.

Bu çalışma kapsamında, Sölez-1 ceviz çeşidinin uygulanan tüm tuz dozlarında %100 canlılık oranını koruduğu gözlemlenmiştir. Sölez-1 ceviz çeşidinin tuzluluk stresine karşı üstün fizyolojik adaptasyon mekanizmalarına sahip olduğunu ve stres koşullarında hem dokusal bütünlüğünü hem de hayati fonksiyonlarını kesintisiz sürdürebildiğini göstermektedir. Sölez-1 ceviz çeşidi dışında Serr, Maraş-18, 77-H-1, 230/37 ve 214/47 ceviz çeşitlerinin de yüksek canlılık oranlarını muhafaza etmeleri, bu çeşitlerin tuz stresine karşı yüksek düzeyde toleranslı olduklarını ortaya koymaktadır. Bu ceviz çeşitlerinde canlılık oranlarının, daha önce ölçülen yüksek klorofil içerikleri, yüksek yaprak oransal su içerikleri ve düşük görsel zarar skorları ile desteklenmesi, stres toleransının çoklu fizyolojik parametreler ile desteklendiği belirlenmiştir.

Buna karşın, Fernor, Maraş-12 ve Midland gibi ceviz çeşitlerinde, özellikle 300 mM NaCl uygulaması altında canlılık oranlarının belirgin şekilde düştüğü tespit edilmiştir. Özellikle Fernor ceviz çeşidinde canlılık oranının %41'e kadar gerilemesi, bu ceviz çeşidinin tuzluluk stresine karşı yüksek duyarlılık sergilediğini ve hem metabolik hem de yapısal bütünlüğü korumakta yetersiz kaldığını göstermektedir. Fernor ceviz çeşidinin aynı zamanda düşük klorofil içeriği, yüksek yaprak sıcaklığı ve yüksek görsel zarar skoru gibi diğer parametrelerde de olumsuz performans göstermesi, stresin çoklu fizyolojik bozulmalara yol açtığını ve canlı kalma yeteneğinin ciddi ölçüde zayıfladığını ortaya koymaktadır.

Bu çalışma, ceviz genotiplerinin tuzluluk stresine karşı canlılık oranları bakımından farklı tolerans profilleri sergilediğini açıkça göstermektedir. Sölez-1, Serr ve Maraş-18 gibi ceviz çeşitleri, yüksek tuz konsantrasyonlarında dahi canlı kalma kapasitelerini büyük ölçüde koruyarak potansiyel "stres toleranslı anaç/genotip" adayları olarak ön plana çıkmaktadır. Buna karşılık, Fernor gibi hassas çeşitlerin ise tuz stresinin yoğun olduğu yetiştiricilik koşullarında dikkatle değerlendirilmesi gerektiği anlaşılmaktadır.

İlk yıl elde edilen bulgular doğrultusunda, 21 farklı ceviz genotipi üzerinde gerçekleştirilen analizler sonucunda, çeşitlerin tuzluluk stresine karşı tolerans ve hassasiyet seviyeleri belirlenmiştir. Yapılan ölçümler, uygulanan dört farklı tuz dozu arasında 150 mM NaCl konsantrasyonunun kritik tuz seviyesi olduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca, ceviz çeşitleri arasında belirgin farklılıklar tespit edilmiş olup, Sölez-1, Serr ve Maraş-18 çeşitlerinin tuzluluk stresine daha toleranslı, Fernor, Chandler ve Hartley çeşitlerinin ise daha hassas olduğu belirlenmiştir. (Şekil 4.1 ve Şekil 4.2).



Şekil 4.1. Sölez-1, Serr ve Maraş-18 ceviz çeşitlerine ait tohumlarının tuz uygulaması yapıldıktan sonraki görünüşleri, (Siyah: 300 mM – Yeşil: 225 mM – Sarı: 150 mM – Kırmızı: 75 mM – Mavi: 0 mM)



Şekil 4.2. Chandler, Fernor ve Hartley ceviz çeşitlerine ait tohumlarının tuz uygulaması yapıldıktan sonraki görünüşleri, (Siyah: 300 mM – Yeşil: 225 mM – Sarı: 150 mM – Kırmızı: 75 mM – Mavi: 0 mM)

Bu sonuçlar doğrultusunda, ikinci yıl analizlerinde altı ceviz çeşidi (Serr, Maraş-18, Sölez-1, Chandler, Hartley ve Fernor) ile çalışılması ve 150 mM NaCl dozu ile kontrol uygulamasının karşılaştırmalı olarak yürütülmesi planlanmıştır. Bu yaklaşım, seçilen ceviz çeşitlerinin tuzluluk stresine karşı dayanıklılık düzeylerini daha ayrıntılı ve karşılaştırmalı bir şekilde değerlendirmek amacıyla planlanmıştır.

4.1.9. Ceviz Çeşitlerinin Tuzluluk Stresine Tolerans Durumlarının Genel Değerlendirilmesi

Birinci yıl yürütülen çalışmada, 21 farklı ceviz genotipi üzerinde morfolojik ve fizyolojik parametreler dikkate alınarak yapılan değerlendirmeler sonucunda, tuz stresine karşı çeşitlerin tolerans seviyelerinde belirgin farklılıklar gözlemlenmiştir. Bu farklılıklar istatistiksel analizlerle desteklenmiş ve genotiplerin tuz stresine verdikleri tepkiler detaylı olarak ortaya konmuştur.

Yaprak sıcaklığı, SPAD değeri, görsel skala, yaprak oransal su içeriği, kök kuru madde miktarı ve canlılık oranı gibi parametrelerin bütüncül değerlendirilmesi sonucunda; Sölez-1, Serr ve Maraş-18 çeşitlerinin tuzluluk stresine karşı daha toleranslı olduğu tespit edilmiştir. Bu çeşitler yüksek tuz konsantrasyonlarında dahi yüksek SPAD ve yaprak su içeriği değerleri, düşük görsel stres skoru ve yüksek canlılık oranı göstermiştir.

Buna karşılık, Fernor, Chandler ve Hartley ceviz çeşitlerinin ise birçok parametrede düşük performans sergilediği, özellikle Fernor ceviz çeşidinin yüksek tuz stresi seviyelerinde tamamen kuruma gösterdiği ve genel olarak tuz stresine duyarlı olduğu belirlenmiştir.

Bu değerlendirmeler sonucunda, ikinci yıl yürütülecek denemelerde genetik varyasyonu daha ayrıntılı değerlendirmek amacıyla; toleranslı (Sölez-1, Serr, Maraş-18) ve hassas (Fernor, Chandler, Hartley) olmak üzere toplam altı ceviz çeşidi seçilmiş, stresin etkilerini en belirgin biçimde ortaya koyabilecek kontrol (0 mM NaCl) ve 150 mM NaCl (kritik tuz seviyesi) konsantrasyonuyla çalışmaların devam ettirilmesine karar verilmiştir.

4.2. Seçilen Toleranslı ve Hassas Ceviz Çeşitlerinin 2. Yıl Tuza Tolerans Durumlarının Belirlenmesi

4.2.1. Klorofil İçin Spad Değerleri

Bu çalışmada, 150 mM NaCl uygulamasının ceviz çeşitlerinin yaprak klorofil içeriği üzerindeki etkileri SPAD değerleri üzerinden değerlendirilmiştir (Çizelge 4.9). Uygulanan tuz konsantrasyonunun tüm çeşitlerde SPAD değerlerinde düşüşe neden olduğunu, ancak bu azalmanın çeşide bağlı olarak değişkenlik gösterdiğini ortaya koymuştur.

Tuzluluğa hassas olarak belirlenen Chandler, Fernor ve Hartley çeşitlerinde, 150 mM NaCl uygulamasına bağlı olarak SPAD değerlerinde belirgin düşüşler gözlenmiştir. Söz konusu çeşitlerin 150 mM NaCl altında sırasıyla 29.23, 27.33 ve 28.72 SPAD değerlerine ulaştıkları, bu değerlerin kontrol koşullarında elde edilen 31.82, 29.27 ve 31.50 değerlere kıyasla daha düşük olduğu belirlenmiştir. Bu üç ceviz çeşidinin 150 mM NaCl uygulamasında ortalama SPAD değeri 28.43 olup, klorofil içeriğinin stres koşullarında daha fazla azaldığı hassas grubu yansıtmaktadır.

Buna karşılık, tuzluluğa toleranslı olarak tanımlanan Serr, Sölez-1 ve Maraş-18 çeşitlerinde 150 mM NaCl uygulaması altında da SPAD değerlerinin yüksek düzeyde korunduğu tespit edilmiştir. Serr çeşidinde 30.52, Sölez-1 çeşidinde 30.00 ve Maraş-18 çeşidinde 29.73 SPAD değerleri ölçülmüş olup, bu grubun 150 mM NaCl uygulaması altında genel ortalaması 30.09 olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, toleranslı çeşitlerin klorofil yapısını ve dolayısıyla fotosentetik kapasitesini tuz stresi altında da muhafaza edebildiğini göstermektedir. Kontrol koşullarında elde edilen SPAD değerleri de bu eğilimi destekler niteliktedir. Toleranslı çeşitler arasında yer alan Serr, Sölez-1 ve Maraş-18, sırasıyla 33.49, 32.39 ve 32.13 SPAD değerleriyle hassas çeşitlere kıyasla daha yüksek düzeyde klorofil içeriği sergilemiştir. Kontrollere ait ortalama SPAD değeri, hassas ceviz çeşitlerinde 30.87, toleranslı ceviz çeşitlerinde ise 32.67 olarak saptanmıştır.

Çizelge 4.9. Toleranslı ve Hassas ceviz çeşitlerinin 150 mM NaCl uygulamasının klorofil için Spad değeri üzerine etkisi

Çeşitler	150 mM NaCl	Kontrol
Chandler	29.23 ef $\pm$ 1.18	31.82 abc $\pm$ 0.59
Fernor	27.33 f $\pm$ 0.88	29.27 ef $\pm$ 1.33
Hartley	28.72 ef $\pm$ 0.74	31.50 bcd $\pm$ 0.54
Genel ortalama	28.43 c	30.87 b
Serr	30.52 bcde $\pm$ 2.22	33.49 a $\pm$ 0.79
Sölez-1	30.00 cde $\pm$ 0.34	32.39 ab $\pm$ 1.90
Maraş-18	29.73 de $\pm$ 1.17	32.13 ab $\pm$ 0.88
Genel ortalama	30.09 bc	32.67 a

*Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasında istatistiki düzeyde önemli farklılık bulunmaktadır ((p $\leq$ 0.05) (LSD %5= 1.95)) ((p $\leq$ 0.05) (LSD %5= 1.78))

Bu çalışmada, 150 mM NaCl konsantrasyonuna maruz bırakılan ceviz çeşitlerinde SPAD değerlerinde meydana gelen değişiklikler, çeşitlerin tuzluluğa karşı fizyolojik dayanıklılık

düzeylerinin anlaşılmasında önemli bir gösterge olmuştur. Elde edilen bulgular, tuzluluğa duyarlı olarak belirlenen Chandler, Fernor ve Hartley çeşitlerinde klorofil içeriğinde belirgin azalmalar meydana geldiğini, buna karşılık Serr, Sölez-1 ve Maraş-18 gibi toleranslı çeşitlerde bu azalmanın minimum düzeyde gerçekleştiğini ortaya koymuştur. Özellikle toleranslı grupta yer alan çeşitlerin, stres koşulları altında dahi kontrol grubuna yakın SPAD değerlerini sürdürebilmesi, bu çeşitlerin fotosentetik sistemlerini daha etkin koruyabildiğini göstermektedir.

Tuz stresi, bitkilerin kök bölgesinde NaCl yoğunluğunun artmasına ve Na⁺ iyonunun yapraklarda birikmesine neden olmaktadır. Bu durum, Mg²⁺ iyonlarının yer değiştirmesine yol açarak klorofillerin yapısını bozmakta ve klorozis oluşumuna neden olmaktadır (Avcıoğlu ve Gürel, 2000). Tuzluluk stresinin artmasıyla birlikte klorofil içeriğinde meydana gelen azalma, Ranjbar ve ark. (2002) tarafından antepfıstığında; Karimi ve ark. (2009) tarafından ise *Pistacia vera* üzerinde yapılan çalışmalarda da açıkça ortaya konmuştur. Bu bulgular, tuz stresinin doğrudan fotosentetik pigmentleri etkilediğini ve bu durumun bitkilerin fotosentez etkinliğini sınırladığını göstermektedir. Benzer biçimde, Ji ve ark. (2022a) tarafından yürütülen bir çalışmada, *Juglans microcarpa* fidelerinde 100 mmol/L NaCl uygulamasına kadar SPAD değerlerinde yalnızca sınırlı azalma gözlemlenirken, 200 mmol/L ve üzerindeki konsantrasyonlarda klorofil içeriğinde istatistiksel olarak anlamlı düşüşler meydana geldiği bildirilmiştir. Ji ve ark. (2022b) ise dört farklı ceviz anacı (J1–J4) üzerinde gerçekleştirdikleri çalışmada, NaCl uygulaması altında genotipler arasında klorofil içeriği bakımından anlamlı farklılıklar gözlemlenmiş ve J4 genotipinin klorofil stabilitesini koruyarak yüksek düzeyde tuz toleransı gösterdiğini rapor etmiştir. Bu bulgular, genetik varyasyonun klorofil bozunmasını sınırlandırma kapasitesi üzerinde belirleyici olduğunu göstermektedir.

Wang ve ark. (2021) tarafından erken ve geç gelişen ceviz çeşitlerinde yürütülen bir başka çalışmada ise, geç gelişen genotipin stres koşulları altında daha yüksek net fotosentetik oran ve klorofil içeriği sergilediği ortaya konmuştur. Bu durum, klorofil düzeyinin yalnızca yapısal değil, aynı zamanda fizyolojik sürdürülebilirlik için de kritik bir belirleyici olduğunu göstermektedir. Vahdati (2013), tuz ve kuraklık stresine toleranslı ceviz genotiplerinde prolin birikimi ve antioksidatif enzim aktivitesinin yanında klorofil içeriğinin de daha stabil kaldığını belirtmiş ve bu parametrelerin stres adaptasyonunda sinerjik rol oynadığını vurgulamıştır.

Bu bağlamda, çalışmada yer alan Serr, Sölez-1 ve Maraş-18 çeşitlerinin yüksek SPAD değerlerini stres koşullarında da sürdürebilmesi, klorofil bozunmasının engellendiğini ve fotosentez kapasitesinin korunduğunu göstermektedir. Diğer taraftan, Akça ve Şahin (2022) tarafından yapılan çalışmada, farklı ceviz anaçlarının yapraklarında biriken Na⁺ iyonu ile SPAD değerleri arasında negatif bir ilişki olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada *Juglans sieboldiana* anaçlarının yapraklarında yüksek Na⁺ ve Cl⁻ birikimine bağlı olarak klorofil içeriğinde belirgin azalmalar gözlenmiş; bu durum, bizim çalışmada hassas grup olarak belirlenen Chandler, Fernor ve Hartley gibi çeşitlerin yapraklarında iyon toksisitesine bağlı olarak klorofil yıkımının meydana geldiğini destekler niteliktedir.

Bu çalışmada yapılan SPAD ölçümleri, ceviz genotiplerinin tuz stresine verdikleri fizyolojik yanıtların karakterizasyonunda güvenilir ve ayırt edici bir parametre olarak öne çıkmıştır. Toleranslı genotiplerin klorofil içeriğini yüksek düzeyde sürdürebilmesi, bu çeşitlerin tuz stresi altında fotosentez etkinliğini koruma kapasitelerinin yüksek olduğuna işaret ederken, hassas çeşitlerdeki klorofil kaybı, stresin fotosentetik yapı üzerindeki baskılayıcı etkisini açıkça ortaya koymaktadır.

4.2.2. Yaprak Sıcaklığı (°C)

Bu çalışmada, 150 mM NaCl uygulamasının ceviz çeşitlerinde yaprak sıcaklığı üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir (Çizelge 4.10). Elde edilen bulgular, tuz stresinin yaprak sıcaklığında artışa yol açtığını ve bu artışın çeşitlere göre değişkenlik gösterdiğini ortaya koymuştur. Genel olarak, stres uygulaması altında ortalama yaprak sıcaklığı hassas çeşitlerde 40.68 °C iken, toleranslı çeşitlerde bu değer 38.24 °C olarak belirlenmiştir. Kontrol koşullarında ise bu ortalamalar (hassas ve toleranslı) sırasıyla 39.23 °C ve 36.76 °C olarak tespit edilmiştir. Bu farklar, tuzluluk koşullarında ısı regülasyonu bakımından çeşitler arasında belirgin farklılıklar olduğunu göstermektedir.

Tuzluluğa hassas olarak sınıflandırılan Chandler, Fernor ve Hartley çeşitleri, hem 150 mM NaCl uygulamasında hem de kontrol koşullarında en yüksek yaprak sıcaklıklarına sahip çeşitler olarak öne çıkmıştır. Çalışmada, 150 mM NaCl uygulaması altında Chandler, Fernor ve Hartley çeşitlerinde sırasıyla 40.60 °C, 40.86 °C ve 40.56 °C değerleri kaydedilmiş olup, bu yüksek sıcaklık değerleri, stres koşullarında bu çeşitlerin yaprak seviyesinde etkin bir buharlaşma soğutması gerçekleştirmediğini ve su kaybı regülasyonunun zayıf olduğunu göstermektedir.

Buna karşılık, tuzluluğa toleranslı olarak tanımlanan Serr, Sölez-1 ve Maraş-18 çeşitleri, 150 mM NaCl uygulamasında yaprak sıcaklıklarını görece daha düşük seviyelerde tutabilmişlerdir. Serr çeşidi 37.13 °C, Sölez-1 ve Maraş-18 çeşitleri ise 38.80 °C değerleriyle hassas gruba göre anlamlı şekilde daha düşük yaprak sıcaklıklarına ulaşmıştır. Bu çeşitlerin stres altında daha düşük yaprak sıcaklıklarını koruyabilmeleri, muhtemelen daha etkin stomal kontrol ve transpirasyon yoluyla sıcaklık düzenleme kapasitesine sahip olduklarını göstermektedir.

Kontrol koşullarında da benzer eğilim sürmektedir. Hassas çeşitler arasında yer alan Fernor ve Chandler, kontrol grubunda dahi 40.20 °C ve 39.32 °C gibi görece yüksek yaprak sıcaklıkları sergilerken, toleranslı çeşitlerden Serr ve Sölez-1 sırasıyla 35.91 °C ve 36.47 °C ile daha düşük düzeylerde kalmıştır. Bu durum, toleranslı çeşitlerin fizyolojik olarak daha dengeli bir ısı yönetimi mekanizmasına sahip olduğunu desteklemektedir.

Çizelge 4.10. Toleranslı ve Hassas ceviz çeşitlerinin 150 mM NaCl uygulamasının yaprak sıcaklığı üzerine etkisi (°C)

Çeşitler	150 mM NaCl	Kontrol
Chandler	40.60 a $\pm$ 0.7	39.32 abc $\pm$ 0.9
Fernor	40.86 a $\pm$ 0.4	40.20 ab $\pm$ 0.1
Hartley	40.56 a $\pm$ 1.3	38.17 cde $\pm$ 0.8
Genel ortalama	40.68 a	39.23 ab
Serr	37.13 def $\pm$ 1.2	35.91 f $\pm$ 1.8
Sölez-1	38.80 bcd $\pm$ 0.7	36.47 ef $\pm$ 0.6
Maraş-18	38.80 bcd $\pm$ 1.2	37.90 cde $\pm$ 1.3
Genel ortalama	38.24 bc	36.76 c

*Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasında istatistiki düzeyde önemli farklılık bulunmaktadır (($p \leq 0.05$) (LSD %5= 1.72)) (($p \leq 0.05$) (LSD %5= 1.64)).

Bu çalışmada, 150 mM NaCl konsantrasyonuna maruz bırakılan ceviz çeşitlerinin yaprak sıcaklıklarında gözlemlenen değişiklikler, tuz stresinin bitki su ilişkileri ve ısı regülasyonu üzerindeki etkilerini değerlendirmek açısından önemli bulgular sunmuştur. Tuz stresi altında, özellikle stomaların kapanması ile transpirasyonun azalması sonucunda yaprak yüzeyinde ısı birikimi meydana gelmekte; bu da yaprak sıcaklıklarında artışa neden olmaktadır. Birçok araştırmacı, bitkilerin stres koşullarına maruz kaldıklarında yaprak sıcaklığının arttığını, fotosentez oranının azaldığını, ozmotik potansiyelin bozulduğunu ve radyasyon emiliminin yükseldiğini tespit etmiştir (Buschmann ve Lichtenthaler, 1998; Chaerle ve Van Der Straeten, 2000).

Elde edilen veriler, tuzluluğa hassas olarak tanımlanan Chandler, Fernor ve Hartley çeşitlerinde yaprak sıcaklıklarının hem stres hem de kontrol koşullarında toleranslı çeşitlere kıyasla daha yüksek seyrettiğini göstermiştir. Çalışmada, 150 mM NaCl uygulaması altında hassas çeşitlerde ortalama yaprak sıcaklığı 40.68 °C olarak tespit edilirken, bu değer toleranslı çeşitlerde 38.24 °C düzeyinde kalmıştır. Bu farklılık, hassas çeşitlerin stres koşullarında stomal açıklığı kontrol etmede ve evaporatif soğutmayı sürdürmede yetersiz kaldıklarını, dolayısıyla yaprak sıcaklığının arttığını ortaya koymaktadır. Benzer şekilde, kontrol grubunda da hassas çeşitlerin yaprak sıcaklıkları toleranslılara göre daha yüksektir; bu durum, söz konusu çeşitlerin normal koşullarda dahi daha zayıf su düzenleme kapasitesine sahip olabileceğini düşündürmektedir.

Wang ve ark. (2021) tarafından bildirilen sonuçlar da bu bulgularla paralellik göstermektedir. Araştırmada, geç gelişen ceviz çeşidinin stres altında daha düşük yaprak sıcaklığı ve daha yüksek fotosentetik performans sergilediği, bunun da gelişmiş stomal kontrol ve osmoregülasyon kapasitesiyle ilişkili olduğu belirtilmiştir. Bu paralellik, Serr ve Sölez-1 gibi toleranslı çeşitlerin etkin transpirasyon yoluyla yaprak ısını daha iyi düzenleyebildiği yönündeki bulguları desteklemektedir.

Benzer şekilde, Ji ve ark. (2022b) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, tuz stresine maruz kalan farklı *Juglans* genotiplerinde yaprak yüzey sıcaklığı ile su kaybı parametreleri arasında doğrudan ilişki kurulmuştur. Daha toleranslı genotiplerde, transpirasyonun daha uzun süre

sürdürülebilmesi sayesinde yaprak sıcaklıklarının daha düşük tutulabildiği, bu genotiplerin tuz stresıyla daha etkin mücadele edebildiği vurgulanmıştır.

Ayrıca Vahdati (2013), ceviz genotiplerinde antioksidan savunma ve osmotik ayarlama kapasitesinin, su kaybı yönetimini doğrudan etkileyerek yaprak sıcaklığı gibi stres belirteçleri üzerinde farklılıklara yol açtığını raporlamıştır. Bu durum, çalışmada gözlenen yaprak sıcaklığı farklılıklarının yalnızca stomal davranıştan değil, aynı zamanda içsel su potansiyeli ve hücresel su tutma kapasitesinden de kaynaklanabileceğini düşündürmektedir.

Yaprak sıcaklığı ölçümleri ceviz çeşitlerinin tuz stresine karşı geliştirdiği fizyolojik adaptasyonların değerlendirilmesinde önemli bir gösterge olarak öne çıkmaktadır. Serr, Sölez-1 ve Maraş-18 gibi toleranslı ceviz çeşitlerinin, hem kontrol hem de stres koşullarında yaprak sıcaklıklarını daha düşük düzeyde tutabilmeleri, bu çeşitlerin daha etkin bir buharlaşmalı soğutma mekanizmasına ve dolayısıyla gelişmiş bir su kullanımı verimliliğine sahip olduğunu göstermektedir. Bu fizyolojik avantajlar, söz konusu çeşitlerin tuz stresine karşı dayanıklılığının altında yatan temel adaptif mekanizmalardan biri olarak değerlendirilebilir.

4.2.3. Yaprak Alanı (cm²)

Bu çalışmada, 150 mM NaCl uygulamasının ceviz çeşitlerinde yaprak alanı üzerindeki etkileri değerlendirilmiş; elde edilen veriler, tuz stresinin yaprak gelişimi üzerinde baskılayıcı bir etki oluşturduğunu ortaya koymuştur (Çizelge 4.11). Genel olarak değerlendirildiğinde, kontrol grubunda yaprak alanı ortalamaları toleranslı çeşitlerde 172.9 cm² iken, hassas çeşitlerde bu değer 149.4 cm² olarak belirlenmiştir. Çalışmada, 150 mM NaCl uygulaması altında ise bu ortalamalar sırasıyla 168.1 cm² (toleranslı ceviz çeşitleri) ve 143.54 cm² (hassas ceviz çeşitleri) olarak kaydedilmiştir.

Tuzluluğa hassas olarak sınıflandırılan Chandler, Fernor ve Hartley çeşitlerinde, 150 mM NaCl uygulamasıyla birlikte yaprak alanında belirgin azalmalar gözlenmiştir. Özellikle Fernor çeşidi 127.1 cm² ile en düşük değeri göstererek, yaprak gelişiminde tuz stresine karşı en olumsuz tepkiyi vermiştir. Chandler ve Hartley çeşitleri ise sırasıyla 152.2 cm² ve 151.3 cm² değerleriyle Fernor çeşidine görece daha yüksek ancak yine de kısıtlanmış yaprak gelişimi sergilemiştir.

Buna karşılık, tuzluluğa toleranslı olarak belirlenen Serr, Sölez-1 ve Maraş-18 çeşitlerinde, yaprak alanı değerlerinin 150 mM NaCl uygulamasına rağmen yüksek düzeyde korunduğu gözlenmiştir. Serr çeşidinde stres koşullarında dahi yaprak alanı değişmemiş (180.2 cm²), Sölez-1 çeşidinde ise sadece sınırlı bir azalma gözlenmiştir (180.2 cm² → 171.0 cm²). Maraş-18 çeşidi ise 158.3 cm²'den 153.1 cm²'ye düşerek görece daha stabil bir yapı sergilemiştir. Bu çeşitlerin, yaprak büyüme süreçlerini stres koşullarında sürdürebildikleri görülmektedir.

Çizelge 4. 11. Toleranslı ve Hassas ceviz çeşitlerinin 150 mM NaCl uygulamasının yaprak alanı üzerine etkisi(cm²)

Çeşitler	150 mM NaCl	Kontrol
Chandler	152.2 cd $\pm$ 1.6	152.2 cd $\pm$ 1.6
Fernor	<u>127.1 e $\pm$ 1.9</u>	138.9 de $\pm$ 1.8
Hartley	151.3 cd $\pm$ 1.3	157.1 bc $\pm$ 1.5
Genel ortalama	<u>143.54 b</u>	149.4 ab
Serr	<u>180.2 a $\pm$ 0.7</u>	<u>180.2 a $\pm$ 0.7</u>
Sölez-1	171.0 ab $\pm$ 1.2	<u>180.2 a $\pm$ 0.7</u>
Maraş-18	153.1 cd $\pm$ 1.3	158.3 bc $\pm$ 1.3
Genel ortalama	168.1 a	<u>172.9 a</u>

*Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasında istatistiki düzeyde önemli farklılık bulunmaktadır ((p $\leq$ 0.05) (LSD %5= 14.5) (Ö.D.= Önemli Değil)) ((p $\leq$ 0.05) (LSD %5= 23.8)).

Bu çalışmada, 150 mM NaCl konsantrasyonunun ceviz çeşitlerinin yaprak gelişimi üzerindeki etkileri değerlendirilmiş ve yaprak alanı parametresi üzerinden tuz stresine karşı genotipik tepkiler ortaya konulmuştur. Elde edilen sonuçlar, tuzluluk koşullarının yaprak gelişimini baskıladığını ve bu etkinin çeşide göre istatistikî açıdan anlamlı farklılıklar gösterdiğini ortaya koymuştur. Özellikle tuzluluğa hassas olarak sınıflandırılan Fernor, Chandler ve Hartley çeşitlerinde yaprak alanında belirgin azalmalar gözlenirken; toleranslı çeşitler olan Serr, Sölez-1 ve Maraş-18 çeşitlerinin yaprak gelişimini büyük ölçüde koruyabildikleri tespit edilmiştir.

Benzer sonuçlar farklı türlerde yapılan çalışmalarda da rapor edilmiştir. Ouraei ve ark. (2010), Ferragnes, GF677 ve Tuono badem genotiplerine uygulanan üç farklı tuz dozu (0, 50 ve 100 mM NaCl) sonucunda, artan tuzluluk seviyesinin yaprak alanında anlamlı azalmalar oluşturduğunu belirtmiştir. Ayrıca, Kumari ve ark. (2007) tarafından dut genotiplerinde yapılan çalışmada, %1.0'dan %2.0 NaCl'ye kadar artan tuz dozlarının yaprak alanını olumsuz etkilediği tespit edilmiştir. Bu bulgular, yaprak alanı gibi morfolojik parametrelerin, tuz stresinin büyüme üzerindeki baskılayıcı etkilerini yansıtmakta etkili olduğunu göstermektedir.

Ji ve ark. (2022a), *Juglans microcarpa* fidelerinde yüksek NaCl konsantrasyonlarının yaprak büyümesini sınırladığını ve bunun fotosentetik yüzeyde azalma ile sonuçlandığını rapor etmiştir. Bu çalışmada da benzer şekilde, özellikle Fernor çeşidinde gözlenen minimum yaprak alanı (127.1 cm²), bu genotipin tuz stresi altında yaprak büyümesini sürdüremediğini ve büyüme süreçlerinin ciddi şekilde baskılandığını ortaya koymaktadır. Ji ve ark. (2022b) tarafından yapılan bir diğer çalışmada ise, tuza daha toleranslı genotiplerin yaprak alanında daha düşük düzeyde daralma yaşadığı, bu durumun hücre bölünmesi ve genişlemesi süreçlerinin stres altında sürdürülebilmesine bağlı olduğu ifade edilmiştir. Bu doğrultuda, çalışmada Serr ve Sölez-1 gibi toleranslı genotiplerde yaprak alanının büyük ölçüde korunması, muhtemelen hücre büyümesi ve turgor basıncının daha etkin bir şekilde sürdürülebilmesiyle ilişkilendirilebilir. Özellikle Serr çeşidinde yaprak alanının stres

koşullarında değişmemesi (180.2 cm²), bu genotipin tuz stresine karşı morfolojik olarak en dirençli yapıya sahip olduğunu göstermektedir.

Vahdati (2013), stres toleransı yüksek ceviz genotiplerinde ozmotik düzenleme kapasitesinin daha gelişmiş olduğunu ve bunun hücrel su kaybını sınırlayarak yaprak büyümesini desteklediğini bildirmiştir. Bu bağlamda, toleranslı çeşitlerde yaprak alanının korunması yalnızca fizyolojik direnç göstergesi değil, aynı zamanda fotosentez kapasitesinin ve transpirasyon yüzeyinin sürdürülebilirliği açısından da önem arz etmektedir. Wang ve ark. (2021) ise, geç gelişen ceviz genotiplerinin stres altında daha geniş yaprak alanına sahip olduklarını ve bunun daha yüksek karbon kazanımı ile ilişkili olduğunu ifade etmiştir.

Ayrıca, Akça ve Şahin (2022) tarafından üç farklı ceviz anacı üzerinde yürütülen çalışmada, tuz stresinin sürgün ve kök büyümesi kadar yaprak yüzey alanı üzerinde de sınırlandırıcı etkiler yarattığı; ancak bu etkinin anaç türüne bağlı olarak farklılık gösterdiği vurgulanmıştır. Bununla birlikte, cevizde genotipik varyasyonun stres altındaki yaprak gelişimi üzerinde belirleyici bir unsur olduğunu desteklemektedir.

Bu çalışmada, ceviz genotipleri arasında yaprak gelişimi bakımından tuzluluğa karşı farklı adaptasyon mekanizmalarının bulunduğu tespit edilmiştir. Yaprak alanının korunması, stres toleransının hem morfolojik hem de fizyolojik bir göstergesi olup, Serr, Sölez-1 ve Maraş-18 gibi çeşitlerin yapısal sürdürülebilirlikleri ve fotosentetik performansları açısından önemli bir avantaj sağladığı söylenebilir.

4.2.4. Yaprak Kuru Madde Miktarı

Bu çalışmada, 150 mM NaCl uygulamasının ceviz çeşitlerinin yaprak kuru madde içerikleri üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir (Çizelge 4.12). Genel olarak, tuz uygulaması altında yaprak kuru madde oranlarında azalma eğilimi gözlenmiştir; bu etkinin çeşide bağlı olarak istatistiki açıdan farklılık gösterdiği belirlenmiştir.

Tuzluluğa hassas olarak sınıflandırılan Chandler, Fernor ve Hartley çeşitlerinde, 150 mM NaCl uygulaması yaprak kuru madde oranını kontrol koşullarına kıyasla düşürmüştür. Fernor çeşidi %19.58 ile en düşük değeri göstermiş ve bu durum, bu çeşidin tuz stresine karşı yaprak dokusunda madde birikimini sürdüremediğini ortaya koymuştur. Chandler ve Hartley çeşitlerinde de yaprak kuru madde oranı sırasıyla %20.70 ve %20.03 olarak belirlenmiş olup, bu çeşitlerin ortalaması %20.1 olarak tespit edilmiştir.

Tuzluluğa toleranslı olarak belirlenen Serr, Sölez-1 ve Maraş-18 çeşitlerinde ise yaprak kuru madde oranlarının 150 mM NaCl uygulaması altında dahi yüksek düzeyde korunduğu görülmüştür. Serr çeşidi %23.26, Sölez-1 %22.67 ve Maraş-18 %22.21 oranında yaprak kuru madde içeriğine ulaşmıştır. Bu çeşitlerin 150 mM NaCl uygulaması altında ortalama değeri %22.71 olarak tespit edilmiş, hassas çeşitlere kıyasla istatiki açıdan anlamlı düzeyde daha yüksek olduğu saptanmıştır. Bu

durum, toleranslı çeşitlerin yaprak dokularında madde birikimini stres koşullarında da sürdürebildiğini gösterdiği tespit edilmiştir.

Kontrol uygulamaları değerlendirildiğinde benzer bir eğilim dikkat çekmektedir. Toleranslı çeşitlerde kontrol koşullarındaki ortalama kuru madde oranı %23.31 ile yüksek seyrederken, hassas grupta bu değer %20.6'ya düşmektedir. Bu farklılık, tuz stresi uygulandığında toleranslı çeşitlerin hücresel yapısını daha iyi koruyabildiğini ve biyokütle kaybını sınırlayabildiğini göstermektedir.

Çizelge 4.12. Toleranslı ve Hassas ceviz çeşitlerinin 150 mM NaCl uygulamasının yaprak kuru madde miktarı üzerine etkisi (%)

Çeşitler	150 mM NaCl	Kontrol
Chandler	20.70 ab $\pm$ 0.55	21.69 ab $\pm$ 1.61
Fernor	19.58 b $\pm$ 2.88	19.79 b $\pm$ 4.32
Hartley	20.03 b $\pm$ 1.28	20.34 ab $\pm$ 3.41
Genel ortalama	20.1 b	20.6 b
Serr	23.26 ab $\pm$ 0.83	24.09 a $\pm$ 1.63
Sölez-1	22.67 ab $\pm$ 1.02	23.61 ab $\pm$ 0.66
Maraş-18	22.21 ab $\pm$ 0.78	22.22 ab $\pm$ 1.65
Genel ortalama	22.71 a	23.31 a

*Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasında istatistiki düzeyde önemli farklılık bulunmaktadır (($p \leq 0.05$) (LSD %5= 3.87) (Ö.D.= Önemli Değil)) (($p \leq 0.05$) (LSD %5= 1.47)).

Bu çalışmada, 150 mM NaCl uygulamasının ceviz çeşitlerinin yaprak kuru madde içerikleri üzerindeki etkileri değerlendirilmiş ve elde edilen sonuçlar, tuz stresinin yaprak dokularında madde birikimi üzerine baskılayıcı bir etki oluşturduğunu ortaya koymuştur. Özellikle tuzluluğa hassas olarak sınıflandırılan Chandler, Fernor ve Hartley çeşitlerinde, yaprak kuru madde oranlarının kontrol koşullarına kıyasla istatistiki açıdan anlamlı düzeyde azaldığı gözlenmiştir. Fernor çeşidinin %19.58 ile en düşük değeri göstermesi, bu genotipin stres koşullarında metabolik süreçleri sürdüremediğine ve hücresel düzeyde biyokütle kaybına daha duyarlı olduğuna işaret etmektedir. Chandler ve Hartley çeşitlerinde de benzer şekilde düşük kuru madde oranları kaydedilmiş, bu da hassas çeşitlerin yaprak dokularında madde birikimini sürdüremediğini göstermiştir.

Benzer şekilde, Javadisaber (2014), Ankara armudu, Ayva (*Quince A*) ve Ahlat (*Pyrus elaeagnifolia*) genotiplerine uygulanan dört farklı tuz dozu (75, 150, 225 ve 300 mM NaCl) sonucunda, tuz stresi şiddeti arttıkça tüm genotiplerde yaş ağırlıkta azalma meydana geldiğini rapor etmiştir. Aynı şekilde, Mahouachi (2018), mango anaçları üzerinde gerçekleştirdiği bir çalışmada, 175 gün süresince uygulanan 50 mM NaCl tuz stresi altında 'Gomera-3' anacında yaprak yaş ve kuru ağırlıklarının azaldığını; buna karşın, '13/1' anacında bu parametrelerde bir değişiklik olmadığını bildirmiştir. Bu bulgular, farklı türlerde de benzer şekilde tuz stresinin yaprak biyokütlesi üzerinde baskılayıcı etkiler yarattığını ve bu etkinin genotipe bağlı olarak farklılık gösterdiğini ortaya koymaktadır.

Çalışmada, Serr, Sölez-1 ve Maraş-18 gibi tuzluluğa toleranslı çeşitlerde yaprak kuru madde içeriklerinin stres koşullarında da yüksek düzeyde korunabilmesi, bu genotiplerin yapısal stabiliteyi ve metabolik aktiviteyi daha etkin bir şekilde sürdürebildiklerini göstermektedir. Özellikle Serr çeşidinin %23.26 oranındaki kuru madde değeri, bu genotipin stres koşullarında bile madde birikimini ve hücre bütünlüğünü koruyabildiğini açıkça ortaya koymaktadır. Bu durum, toleranslı çeşitlerde gelişmiş hücrel savunma mekanizmalarının devreye girdiğini düşündürmektedir.

Ji ve ark. (2022a, 2022b), *Juglans* türlerinde tuz stresi altında yaprak dokularının su kaybına paralel olarak kuru madde birikiminin azaldığını ve bu azalmanın genotipik düzeyde farklılık gösterdiğini belirtmiştir. Özellikle toleranslı genotiplerde, osmoprotektan birikimi ve hücre çeperi sağlamlığı gibi faktörlerin, su kaybına rağmen kuru madde dengesinin korunmasına olanak tanıdığı ifade edilmiştir. Wang ve ark. (2021) ise geç gelişen ceviz genotiplerinin tuz stresine karşı daha yüksek yapısal bütünlük sergilediklerini ve bu durumun yaprak kuru ağırlıklarını kontrol altında tutma yeteneklerinden kaynaklandığını bildirmiştir. Bu bulgu, toleranslı genotiplerin daha güçlü hücre duvarı yapısına ve daha iyi düzenlenmiş ozmotik dengeye sahip olduklarını desteklemektedir.

Bu çalışma kapsamında gözlenen yaprak kuru madde içeriği farklılıkları, ceviz genotiplerinin tuz stresine karşı geliştirdiği yapısal ve fizyolojik savunma mekanizmalarının bir yansımasıdır. Serr, Sölez-1 ve Maraş-18 gibi toleranslı çeşitlerin, stres koşullarında dahi yaprak kuru madde içeriklerini yüksek düzeyde sürdürebilmeleri, bu genotiplerin metabolik esnekliğini ve dokusal dayanıklılığını ortaya koymaktadır. Dolayısıyla, yaprak kuru madde oranı, tuz stresine karşı ceviz genotiplerinin adaptasyon kapasitesini değerlendirmede güvenilir bir fizyolojik gösterge olarak öne çıkmaktadır.

4.2.5. Yaprak Sayısı (adet/bitki)

Bu çalışmada, 150 mM NaCl uygulamasının farklı ceviz çeşitlerinde yaprak sayısı üzerine etkisi incelenmiş ve sonuçlar çeşitlerin tuz stresine karşı tolerans düzeyleriyle ilişkilendirilmiştir (Çizelge 4.13).

Tuzluluğa hassas olarak sınıflandırılan Chandler, Fernor ve Hartley çeşitlerinde 150 mM NaCl uygulaması altında yaprak sayısında belirgin azalmalar tespit edilmiştir. Chandler, Fernor ve Hartley çeşitleri sırasıyla 8.08, 7.00 ve 8.00 adet/bitki yaprak sayısı ile en düşük değerlerde tespit edilmiştir. Kontrol koşullarında ise bu değerler biraz daha yüksek olmakla birlikte Chandler, Fernor ve Hartley çeşitlerinde sırasıyla 8.25, 7.08 ve 8.75 adet/bitki olarak belirlenmiştir. Hassas grubun 150 mM NaCl uygulaması altında genel ortalaması, stres koşullarında 7.70 adet/bitki iken, kontrol koşullarında 8.03 adet/bitki olarak tespit edilmiştir. Bu bulgular, tuz stresinin hassas çeşitlerde yaprak oluşumunu baskıladığını göstermektedir.

Tuzluluğa toleranslı olarak değerlendirilen Serr, Sölez-1 ve Maraş-18 çeşitleri ise stres koşullarında yaprak sayısını büyük ölçüde koruyabilmişlerdir. Çalışmada, 150 mM NaCl uygulaması altında Serr 10.08, Sölez-1 9.58 ve Maraş-18 8.80 adet yaprak sayısı ile öne çıkarken, bu çeşitlerin

kontrol koşullarındaki değerleri sırasıyla 10.66, 10.58 ve 9.83 adet/bitki olarak belirlenmiştir. Toleranslı çeşitlerin ortalama yaprak sayısı stres koşullarında 9.49 adet, kontrol koşullarında ise 10.36 adet/bitki olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 4.13. Toleranslı ve Hassas ceviz çeşitlerinin 150 mM NaCl uygulamasının yaprak sayısı üzerine etkisi (adet/bitki)

Çeşitler	150 mM NaCl	Kontrol
Chandler	8.08 cd $\pm$ 0.80	8.25 cd $\pm$ 0.90
Fernor	7.00 d $\pm$ 1.64	7.08 d $\pm$ 0.52
Hartley	8.00 cd $\pm$ 0.10	8.75 bc $\pm$ 0.75
Genel ortalama	<u>7.70 b</u>	<u>8.03 b</u>
Serr	<u>10.08 a $\pm$ 0.63</u>	<u>10.66 a $\pm$ 0.76</u>
Sölez-1	9.58 ab $\pm$ 0.38	<u>10.58 a $\pm$ 0.88</u>
Maraş-18	8.80 bc $\pm$ 0.43	9.83 ab $\pm$ 0.29
Genel ortalama	<u>9.49 a</u>	<u>10.36 a</u>

*Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasında istatistiki düzeyde önemli farklılık bulunmaktadır (($p \leq 0.05$) (LSD %5= 1.31) (Ö.D.= Önemli Değil)) (($p \leq 0.05$) (LSD %5= 1.24)).

Bu çalışmada, 150 mM NaCl konsantrasyonuna maruz bırakılan ceviz çeşitlerinde yaprak sayısında meydana gelen değişimler incelenmiş ve elde edilen sonuçlar, tuz stresine karşı genotipik tolerans düzeyleriyle ilişkilendirilmiştir. Elde edilen bulgular, yaprak sayısının tuz stresine duyarlılıkla doğrudan ilişkili olduğunu ortaya koymuştur. Özellikle Chandler, Fernor ve Hartley gibi hassas çeşitlerde yaprak sayısında istatistiki açıdan anlamlı düşüşler tespit edilmiş; Serr, Sölez-1 ve Maraş-18 gibi toleranslı çeşitlerde ise yaprak sayısının stres koşullarında dahi yüksek düzeyde korunabildiği belirlenmiştir. Bu durum, toleranslı çeşitlerin yaprak dökümünü sınırlayarak fotosentetik yüzey alanını muhafaza edebildiğini göstermektedir.

Yaprak sayısı, bitkinin genel vejetatif gelişimiyle doğrudan ilişkili olduğu için, stres koşullarında bu parametrede gözlenen değişiklikler, genotipin büyüme performansını ve fotosentetik kapasitesini doğrudan yansıtmaktadır. Ji ve ark. (2022a) tarafından yapılan çalışmada, *Juglans microcarpa* fidelerinde artan NaCl konsantrasyonları altında yaprak sayısında sistematik azalmalar gözlenmiş ve bu azalışın stres şiddetiyle doğru orantılı olduğu bildirilmiştir. Bu durum, Fernor çeşidinin stres koşullarında en düşük yaprak sayısını göstermesiyle paralellik göstermiştir (7.00 adet/bitki). Bu sonuç, bu çeşidin yaprak üretimi ve yaprak tutma kabiliyetinin zayıf olduğunu ortaya koymaktadır.

Benzer şekilde, Mahouachi (2018), iki mango anaç fidanı (13/1 ve Gomera-3) üzerinde 175 gün boyunca uyguladığı 50 mM NaCl tuz stresi sonucunda, stresin başlamasından dört ay sonra 13/1 anacında herhangi bir belirgin etki gözlenmezken, Gomera-3 anacında 64. günden itibaren yaprak sayısında azalma meydana geldiğini bildirmiştir. Bu çalışma, yaprak sayısındaki azalışın genotipik toleransla doğrudan ilişkili olduğunu ve toleranslı genotiplerin yaprak dökümünü baskılayabildiğini göstermesi açısından önemlidir.

Wang ve ark. (2021) tarafından gerçekleştirilen bir diğer çalışmada ise, geç gelişen ceviz genotiplerinin tuz ve su stresine karşı daha iyi yaprak tutma kapasitesi sergilediği, bunun da fotosentetik verimliliğin sürdürülebilirliği açısından kritik rol oynadığı bildirilmiştir. Bu bağlamda, çalışmada Serr ve Sölez-1 çeşitlerinin yüksek yaprak sayısı değerlerini (sırasıyla 10.08 ve 9.58 adet/bitki) stres koşullarında koruyabilmeleri, bu çeşitlerin gelişmiş fizyolojik adaptasyon stratejilerine sahip olduklarını göstermektedir.

Bu çalışmada elde edilen yaprak sayısı verileri, ceviz çeşitlerinin tuz stresine karşı geliştirdiği tolerans düzeylerinin önemli bir fizyolojik göstergesini sunmaktadır. Serr, Sölez-1 ve Maraş-18 gibi çeşitlerin yaprak kaybını sınırlayarak yaprak sayısını koruyabilmesi, bu çeşitlerin fotosentetik etkinliği sürdürme ve büyümeyi devam ettirme yeteneklerinin yüksek olduğunu ortaya koymaktadır. Dolayısıyla, yaprak sayısı, tuz stresine karşı ceviz genotiplerinin dayanıklılık düzeyini tanımlamada kullanılabilecek etkili bir morfolojik parametre olarak değerlendirilmektedir.

4.2.6. Yaprak Oransal Su İçeriği (%)

Bu çalışmada 150 mM NaCl tuz uygulaması altında farklı ceviz çeşitlerinin yaprak su içerikleri değerlendirilmiş, sonuçlar çeşitlerin stres toleransı ile ilişkilendirilmiştir (Çizelge 4.14).

Hassas olarak sınıflandırılan Chandler, Fernor ve Hartley çeşitlerinde yaprak oransal su içeriği stres koşullarında istatistiki açıdan anlamlı düzeyde düşmüştür. Fernor çeşidinde %75.77 ile en düşük değer gözlenmiş, bu çeşidi %76.35 ile Hartley ve %80.40 ile Chandler takip etmiştir. Bu düşüşler, hücre içi su kaybının arttığını ve ozmotik stresin bu çeşitlerde daha belirgin olduğunu göstermektedir. Hassas grubun ortalama yaprak su içeriği stres koşullarında %77.51 olarak tespit edilmiştir.

Buna karşılık, toleranslı olarak belirlenen Serr, Sölez-1 ve Maraş-18 çeşitleri tuz uygulaması altında da yüksek oransal su içeriği değerlerini koruyabilmiştir. Serr %85.58, Sölez-1 %85.47 ve Maraş-18 %85.42 ile yüksek düzeyde yaprak su içeriğine sahip olmuş, bu grubun ortalaması ise %85.49 olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar, toleranslı çeşitlerin tuz stresine karşı daha etkin bir su tutma mekanizmasına sahip olduğunu, stomal düzenleme ve ozmotik ayarlama süreçlerini başarılı bir şekilde sürdürdüklerini göstermektedir.

Kontrol koşullarında ise benzer bir eğilim gözlenmiştir. Hassas çeşitlerin ortalama yaprak su içeriği %83.35 iken, toleranslı çeşitlerde bu değer %87.79 olarak tespit edilmiştir. Özellikle Serr çeşidinin %88.89'luk değeriyle en yüksek oransal su içeriğine ulaşması, bu çeşidin su dengesini stres öncesi ve sonrası başarılı bir şekilde koruyabildiğini göstermektedir.

Çizelge 4.14. Toleranslı ve Hassas ceviz çeşitlerinin 150 mM NaCl uygulamasının yaprak oransal su içeriği üzerine etkisi (%)

Çeşitler	150 mM NaCl	Kontrol
Chandler	80.40 bc $\pm$ 1.22	85.26 ab $\pm$ 0.98
Fernor	75.77 c $\pm$ 1.38	81.56 abc $\pm$ 1.43
Hartley	76.35 c $\pm$ 0.46	83.21 abc $\pm$ 1.12
Genel ortalama	77.51 c	83.35 b
Serr	85.58 ab $\pm$ 0.57	88.89 a $\pm$ 0.88
Sölez-1	85.47 ab $\pm$ 0.38	86.84 ab $\pm$ 0.74
Maraş-18	85.42 ab $\pm$ 0.98	87.64 ab $\pm$ 0.47
Genel ortalama	85.49 ab	87.79 a

*Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasında istatistiki düzeyde önemli farklılık bulunmaktadır (($p \leq 0.05$) (LSD %5= 7.96) (Ö.D.= Önemli Değil)) (($p \leq 0.05$) (LSD %5= 3.10)).

Bu çalışmada, 150 mM NaCl konsantrasyonu altında farklı ceviz genotiplerinin yaprak oransal su içerikleri (RWC) değerlendirilmiş ve elde edilen bulgular, tuz stresine karşı fizyolojik dayanıklılığın belirlenmesinde bitkisel su ilişkilerinin kritik rol oynadığını ortaya koymuştur. Özellikle Fernor, Hartley ve Chandler gibi tuz stresine hassas olarak sınıflandırılan çeşitlerde, yaprak oransal su içeriklerinin stres koşullarında istatistiki açıdan anlamlı düzeyde azaldığı gözlenmiştir; bu durum, hücre içi su kaybının arttığını ve bu genotiplerin ozmotik stres karşısında yeterli osmoregülasyon kapasitesine sahip olmadığını göstermektedir. Fernor çeşidinde %75.77 ile en düşük yaprak oransal su içeriği değeri tespit edilirken, Hartley çeşidinde de %80'in altında değer tespit edilmiştir. Fernor, Hartley ve Chandler çeşitlerinin stres koşullarındaki ortalama RWC değeri %77.51 olup, fizyolojik dengenin sürdürülemediğini açıkça ortaya koymaktadır.

Buna karşılık, Serr, Sölez-1 ve Maraş-18 gibi toleranslı çeşitlerde RWC değerlerinin yüksek düzeyde korunabilmesi (%85.49 ortalama), bu genotiplerin ozmotik baskı altında dahi hücre turgorunu sürdürme ve su tutma kapasitelerinin gelişmiş olduğunu göstermektedir. Özellikle Serr çeşidinin stres koşullarında %85.58 ve kontrol koşullarında %88.89 gibi yüksek RWC değerlerine sahip olması, bu çeşidin su ilişkilerinde istikrarlı ve esnek bir düzenleme mekanizmasına sahip olduğunu düşündürmektedir.

Bu bulgular, literatürde yer alan birçok çalışmayla uyumlu sonuçlar ortaya koymuştur. Lotfi ve ark. (2009a), yedi farklı ceviz çeşidinde uygulanan artan NaCl konsantrasyonlarının kök bağıl su içeriğinde belirgin azalmaya neden olduğunu rapor etmişlerdir. Benzer şekilde, Garriga ve ark. (2015) tarafından *Fragaria* $\times$ *ananassa* (Camarosa) üzerinde yürütülen bir çalışmada, artan tuzluluk seviyelerinin hem vegetatif büyüme hem de yaprak bağıl su içeriği üzerinde olumsuz etkiler oluşturduğu belirtilmiştir. Bu çalışmalar, tuz stresinin bitkilerde su dengesini bozan temel bir çevresel baskı faktörü olduğunu vurgulamaktadır.

Ayrıca, Ji ve ark. (2022a), *Juglans microcarpa* fidelerinde tuz stresinin artmasıyla birlikte yaprak RWC değerlerinin düştüğünü, ancak toleranslı genotiplerin bu düşüşü sınırlandırabildiğini

rapor etmiştir. Özellikle 100 mmol/L'ye kadar olan NaCl konsantrasyonlarında RWC'nin nispeten stabil seyrettiği, ancak 200–300 mmol/L düzeylerinde düşüşlerin daha belirgin hale geldiği vurgulanmıştır. Çalışmada kullanılan 150 mM düzeyinde ise özellikle tuzluluğa hassas çeşitlerde bu eşik değerin aşılmış olabileceği değerlendirilmiştir.

Wang ve ark. (2021), geç gelişen ceviz genotiplerinin tuz stresine karşı daha yüksek yaprak su içeriği koruduğunu; bu özelliğin gelişmiş stomal düzenleme, ozmotik ayarlama ve daha düşük reaktif oksijen türü (ROS) birikimiyle ilişkili olduğunu belirtmişlerdir. Benzer biçimde, Vahdati (2013) tarafından bildirilen çalışmada, yüksek RWC değerlerinin stres toleransı ile pozitif yönde ilişkili olduğu ve bu genotiplerin aynı zamanda daha yüksek prolin birikimi ve antioksidan savunma düzeyine sahip oldukları ifade edilmiştir. Bu bağlamda, bu çalışmada da yüksek RWC seviyeleriyle öne çıkan Serr ve Sölez-1 gibi çeşitler, hem su kaybının sınırlandırılmasını hem de turgor kaybına bağlı metabolik gerilemenin önlenmesini sağlamış olabilir.

Öte yandan, Akça ve Şahin (2022) tarafından ceviz anaçlarında yürütülen bir araştırmada, tuz stresinin yaprak RWC üzerinde yarattığı düşüşün, yaprak dokularında Na^+ ve Cl^- iyonlarının birikimiyle doğrudan ilişkili olduğu belirtilmiştir. Bu bulgu, çalışmada Hartley ve Fernor gibi tuzluluğa hassas çeşitlerde gözlenen su kaybının, artan iyon toksisitesi ile tetiklendiği yönündeki değerlendirmeleri desteklemektedir.

Yaprak oransal su içeriği, ceviz çeşitlerinin tuz stresine karşı geliştirdiği fizyolojik yanıtların hassas ve güvenilir bir göstergesidir. Toleranslı çeşitlerin bu parametreyi stres koşullarında dahi yüksek düzeyde sürdürebilmeleri, gelişmiş osmotik dengeleme, stomal kontrol ve hücrel su tutma mekanizmalarının etkinliğine işaret etmektedir. Bu yönüyle yaprak oransal su içeriği, cevizde tuz stresine karşı fizyolojik dayanıklılık düzeylerinin belirlenmesinde temel bir kriter olarak değerlendirilmelidir.

4.2.7. Yaprak Ozmotik Su Potansiyeli

Bu çalışma kapsamında 150 mM NaCl uygulaması altında yaprak ozmotik potansiyeli değerlendirilmiş ve elde edilen veriler ceviz çeşitlerinin tuzluluk tolerans düzeyleri ile ilişkilendirilmiştir (Çizelge 4.15).

Hassas olarak tanımlanan Chandler, Fernor ve Hartley çeşitlerinde ozmotik potansiyelin stres koşullarında anlamlı düzeyde düştüğü gözlenmiştir. Chandler çeşidinde bu değer -3.97 MPa ile en düşük seviyeye ulaşırken, Hartley ve Fernor çeşitlerinde sırasıyla -3.77 ve -3.72 MPa olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar, söz konusu çeşitlerde tuz stresine bağlı olarak hücre içi çözünür madde konsantrasyonunun arttığını, ancak bu artışın stresle başa çıkmak için yeterli olmadığını ve hücre su potansiyelinin oldukça negatif değerlere gerilediğini göstermektedir. Hassas çeşitlerin 150 mM NaCl uygulaması altında ortalama değeri -3.82 MPa olup, bu durum bu grubun ozmotik dengeyi sağlamakta zorlandığını ortaya koymaktadır.

Buna karşın, toleranslı çeşitler olan Serr, Sölez-1 ve Maraş-18 çeşitlerinde ozmotik potansiyel değerleri daha yüksek (daha az negatif) düzeylerde kalmıştır. Bu çeşitlerde (Serr, Sölez-1 ve Maraş-18) sırasıyla -3.23, -3.23 ve -3.33 MPa değerleri tespit edilmiş, toleranslı çeşitlerin 150 mM NaCl uygulaması altında genel ortalaması ise -3.27 MPa olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar, toleranslı çeşitlerin stres koşullarında daha dengeli bir ozmotik ayarlama gerçekleştirdiğini, hücre içi suyun korunmasını sağlayarak metabolik faaliyetlerini daha sürdürülebilir biçimde devam ettirebildiklerini göstermektedir.

Kontrol koşullarında ise benzer bir eğilim izlenmiştir. Toleranslı çeşitlerin ozmotik potansiyel ortalaması -2.79 MPa iken, hassas çeşitlerin ortalaması -3.54 MPa olarak tespit edilmiştir. En düşük kontrol değeri ise -3.87 MPa ile Fernor çeşidinde gözlenmiş, bu da bu çeşidin tuz öncesi dönemde dahi ozmotik düzenleme kapasitesinin sınırlı olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.15. Toleranslı ve Hassas ceviz çeşitlerinin 150 mM NaCl uygulamasının yaprak ozmotik su potansiyeli üzerine etkisi (MPa)

Çeşitler	150 mM NaCl	Kontrol
Chandler	-3.97 e $\pm$ 0.15	-3.36 cd $\pm$ 0.11
Fernor	-3.72 de $\pm$ 0.69	-3.87 e $\pm$ 0.05
Hartley	-3.77 e $\pm$ 0.15	-3.38 cd $\pm$ 0.05
Genel ortalama	-3.82 c	-3.54 bc
Serr	-3.23 bc $\pm$ 0.00	-2.69 a $\pm$ 0.05
Sölez-1	-3.23 bc $\pm$ 0.00	-2.79 a $\pm$ 0.05
Maraş-18	-3.33 c $\pm$ 0.29	-2.89 ab $\pm$ 0.05
Genel ortalama	-3.27 b	-2.79 a

*Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasında istatistiki düzeyde önemli farklılık bulunmaktadır (($p \leq 0.05$) (LSD %5= 0.38) (Ö.D.= Önemli Değil)) (($p \leq 0.05$) (LSD %5= 0.32)).

Bu çalışmada, 150 mM NaCl konsantrasyonuna maruz bırakılan farklı ceviz genotiplerinin yaprak ozmotik potansiyel değerleri değerlendirilmiş ve elde edilen bulgular, çeşitlerin tuz stresine karşı geliştirdikleri osmotik dengeleme mekanizmaları bakımından farklılık gösterdiğini ortaya koymuştur. Özellikle Chandler, Fernor ve Hartley gibi hassas çeşitlerde ozmotik potansiyelin anlamlı düzeyde daha negatif değerlere gerilemesi, bu çeşitlerin hücre içi su dengesini sürdüremediğini ve osmotik baskıya karşı yetersiz düzenleme kapasitesine sahip olduklarını göstermektedir. Chandler çeşidinde ölçülen -3.97 MPa'lık en düşük ozmotik potansiyel, bu çeşitte çözünür madde birikiminin su kaybını dengelemeye yetmediğini göstermektedir.

Buna karşın, Serr, Sölez-1 ve Maraş-18 gibi toleranslı çeşitlerde ozmotik potansiyel değerlerinin daha az negatif düzeylerde seyretmesi (ortalama -3.27 MPa), bu çeşitlerin su kaybını sınırlayabildiklerini, hücre turgorunu koruyabildiklerini ve metabolik faaliyetlerini sürdürebildiklerini göstermektedir.

Vahdati (2013), stres toleransı yüksek ceviz genotiplerinde ozmotik düzenleyici moleküllerin (ör. prolin) birikimiyle daha az negatif ozmotik potansiyel değerleri arasında güçlü bir ilişki olduğunu bildirmiştir. Bu mekanizma sayesinde, hücre içi su tutulumu artmakta ve turgor basıncı korunmaktadır. Aynı şekilde, Ji ve ark. (2022b), *Juglans hindsii* melezlerinde tuz stresi altında daha yüksek ozmotik potansiyele sahip olan genotiplerin stomal açıklıklarını daha uzun süre koruyabildiklerini ve fotosentezi sürdürebildiklerini belirtmiştir.

Wang ve ark. (2021), geç gelişen ceviz genotiplerinin tuz stresine karşı daha güçlü osmoregülasyon gerçekleştirdiğini ve bu durumun daha az negatif ozmotik potansiyel ile doğrudan ilişkili olduğunu vurgulamıştır. Çalışmada, Fernor gibi hassas çeşitlerde kontrol koşullarında dahi oldukça düşük ozmotik potansiyel değerlerinin (-3.87 MPa) gözlemlenmesi, bu çeşidin yapısal olarak düşük osmotik denge kapasitesine sahip olduğunu düşündürmektedir.

Ayrıca, Valero ve Khemira (2016), GF677, Bitter ve GN15 badem genotiplerinde yürüttükleri çalışmada, toprak tuzluluğu altında ozmotik ve yaprak su potansiyeli ölçümlerine dayanarak GF677 ve Bitter genotiplerinin tuzluluktan GN15'e kıyasla daha fazla etkilendiğini belirtmiştir. Bu durum, farklı meyve türlerinde de genotipik bazda osmotik tolerans farklılıklarının mevcut olduğunu ve bu özelliğin stres adaptasyonu açısından kritik olduğunu göstermektedir.

Yaprak ozmotik su potansiyel ölçümleri, ceviz genotiplerinin tuz stresine karşı geliştirdiği fizyolojik adaptasyon stratejilerini anlamada değerli bir gösterge sunmaktadır. Daha az negatif değerlere sahip genotiplerin (ör. Serr, Sölez-1) osmotik dengesini koruma kapasitesinin yüksek olduğu, bu yönüyle tuz stresine karşı daha dayanıklı yapılar sergilediği anlaşılmaktadır.

4.2.8. Yaprak Su Potansiyeli

Bu çalışmada, 150 mM NaCl tuz uygulamasına maruz bırakılan ceviz çeşitlerinin yaprak su potansiyeli değerleri değerlendirilmiş ve çeşitlerin tuzluluğa karşı gösterdikleri tepkiler incelenmiştir (Çizelge 4.16).

Tuz stresine hassas olarak sınıflandırılan Chandler, Fernor ve Hartley çeşitlerinde, 150 mM NaCl uygulaması sonucunda yaprak su potansiyeli sırasıyla -1225.5, -1339.88 ve -1307.2 MPa gibi oldukça düşük değerlere ulaşmıştır. Bu değerler, kontrol koşullarına göre önemli oranda daha negatif bulunmuş olup, bu çeşitlerde su kaybının ve su alımının önemli ölçüde kısıtlandığını göstermektedir. Hassas çeşitlerin 150 mM NaCl uygulaması altında genel ortalaması -1290.86 MPa olarak belirlenmiş olup, bu değer su potansiyelinde ciddi bir düşüşü ve buna bağlı olarak bu çeşitlerin tuz stresine karşı fizyolojik duyarlılığını işaret etmektedir.

Buna karşın, tuz stresine toleranslı olduğu belirlenen Serr, Sölez-1 ve Maraş-18 çeşitlerinde yaprak su potansiyeli değerleri sırasıyla -653.6, -686.28 ve -823.54 MPa olarak ölçülmüş, bu çeşitlerin 150 mM NaCl uygulaması altında genel ortalaması ise -721.14 MPa tespit edilmiştir. Bu veriler, toleranslı çeşitlerin su potansiyelini daha dengeli bir düzeyde koruyabildiğini ve tuz stresine karşı daha etkili bir su yönetimi stratejisi sergilediğini ortaya koymaktadır. Özellikle Serr ve Sölez-

1 çeşitlerinde ölçülen daha az negatif değerler, bu çeşitlerin stomatal düzenleme, kök su alımı veya osmotik düzenleme mekanizmalarının daha etkin çalıştığını göstermektedir.

Kontrol koşullarında da benzer bir eğilim gözlemlenmiş; hassas çeşitlerin ortalaması -1078.44 MPa iken, toleranslı çeşitlerin ortalaması -541.4 MPa olarak tespit edilmiştir. Bu fark, stres uygulanmadan önce de toleranslı çeşitlerin daha yüksek su tutma kapasitesine sahip olduğunu ve bu avantajın stres altında da sürdürülebildiğini göstermektedir.

Çizelge 4.16. Toleranslı ve Hassas ceviz çeşitlerinin 150 mM NaCl uygulamasının yaprak su potansiyeli üzerine etkisi (MPa)

Çeşitler	150 mM NaCl	Kontrol
Chandler	-1225.5± 0.07	-849.68 ± 0.02
Fernor	-1339.88 ± 0.00	-1209.16 ± 0.03
Hartley	-1307.2 ± 0.05	-1176.48 ± 0.04
Genel ortalama	<u>-1290,86 b</u>	<u>-1078,44 b</u>
Serr	-653.6 ± 0.08	-522.88 ± 0.03
Sölez-1	-686.28 ± 0.07	-545.75 ± 0.04
Maraş-18	-823.54 ± 0.06	-555.56 ± 0.05
Genel ortalama	<u>-721,14 a</u>	<u>-541,4 a</u>

*Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasında istatistiki düzeyde önemli farklılık bulunmaktadır ((p≤0.05) (LSD %5= 82.95) (Ö.D.= Önemli Değil)) ((p≤0.05) (LSD %5= 213.4)).

Bu çalışmada, 150 mM NaCl uygulaması altında ceviz çeşitlerinin yaprak su potansiyeli değerleri analiz edilmiş ve elde edilen veriler, çeşitlerin tuz stresine karşı su ilişkileri bağlamında geliştirdikleri fizyolojik stratejilerin belirlenmesinde kullanılmıştır. Yaprak su potansiyeli, bitkinin su durumu ve çevresel stres faktörleri karşısında osmotik ayarlama kapasitesinin doğrudan bir göstergesi olarak kabul edilmektedir. Nitekim Jones (1986), bitkilerin abiyotik stres koşullarına maruz kaldıklarında yaprak su potansiyellerinde düşüş yaşandığını ve bu durumun su alma kabiliyetini sınırladığını vurgulamıştır.

Tuz stresine hassas olarak sınıflandırılan Chandler, Fernor ve Hartley çeşitlerinde yaprak su potansiyeli değerlerinin sırasıyla -1225.5, -1339.88 ve -1307.2 MPa gibi aşırı derecede negatif seviyelere gerilemiş olması, bu çeşitlerin ciddi bir su açığı yaşadığını ve osmotik yük karşısında su alma kapasitesinin önemli ölçüde sınırlandığını ortaya koymaktadır. Hassas çeşitlerin ortalama değeri olan -1290.86 MPa, bu çeşitlerin hücre içi su dengesini koruyamadığını ve transpirasyonla kaybedilen suyu telafi edemediğini göstermektedir. Bu durum, aynı zamanda turgor kaybı ve fotosentetik kapasite düşüşü gibi ikincil fizyolojik bozulmaları da beraberinde getirmektedir. Hokmabadi ve ark. (2005) tarafından antepfıstığı üzerinde yürütülen çalışmada da benzer şekilde, tuz stresinin yaprak su potansiyelini anlamlı ölçüde düşürdüğü bildirilmiştir.

Buna karşın, tuzluluğa toleranslı olarak tanımlanan Serr, Sölez-1 ve Maraş-18 çeşitlerinde, yaprak su potansiyeli değerlerinin -653.6, -686.28 ve -823.54 MPa seviyelerinde daha az negatif değerlere ulaşması, bu çeşitlerin stomatal kontrol, osmotik düzenleme ve kök-su alım kapasitesi gibi

fizyolojik mekanizmaları daha etkin biçimde sürdürdüklerini göstermektedir. Özellikle Serr çeşidinin -653.6 MPa değeriyle bu parametrede en yüksek performansı göstermesi, su tutma kapasitesi ve osmoregülasyon açısından üstün bir fizyolojik donanıma sahip olduğunu göstermektedir.

Wang ve ark. (2021), ceviz genotiplerinde tuz stresine karşı yaprak su potansiyelinin tolerans düzeyine göre değiştiğini ve daha az negatif değerlere sahip olan genotiplerin fotosentetik performanslarını daha uzun süre koruyabildiklerini bildirmiştir. Vahdati (2013) ise, yüksek tuz toleransı gösteren genotiplerde prolin birikimi ve antioksidatif savunma sistemlerinin, su potansiyelini istikrarlı düzeyde tutmada etkin rol oynadığını raporlamıştır. Bu bağlamda, çalışmada toleranslı çeşitlerin yüksek su potansiyelini muhafaza etmeleri, yalnızca su alımı değil, aynı zamanda hücrel savunma sistemlerinin etkinliğini de göstermektedir.

Akça ve Şahin (2022), ceviz anaçlarında yaprak su potansiyelinin tuz stresine bağlı olarak düşüş göstermesini, artan yaprak iyon yükü (Na^+ , Cl^-) ve buna bağlı stomal kapanmayla ilişkilendirmiştir. Bu durum, özellikle Chandler, Fernor ve Hartley gibi hassas çeşitlerde gözlenen daha negatif potansiyel değerleri ile uyumlu olup, bu çeşitlerin iyonik stres karşısında transpirasyon dengesini sürdüremediğini düşündürmektedir.

Öte yandan, Karimi ve ark. (2009), *Pistacia vera* üzerinde gerçekleştirdikleri çalışmada, tuz stresinin yaprak bağıl su içeriğini düşürdüğünü; ancak bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı seviyede olmadığını bildirmiştir. Bu farklılık, bitki türüne ve uygulanan tuz konsantrasyonuna bağlı olarak su potansiyelindeki değişimlerin genotipik düzeyde farklılık gösterebileceğini desteklemektedir.

Kontrol koşullarındaki ortalamaların dahi gruplar arasında belirgin şekilde farklılık göstermesi (toleranslı çeşitler: -541.4 MPa; hassas çeşitler: -1078.44 MPa), genetik olarak belirlenen su yönetimi kapasitelerinin stres öncesi dönemde bile ayrıştığını göstermektedir. Bu durum, genotiplerin çevresel strese karşı doğal fizyolojik hazırlık düzeylerini yansıtmaktadır.

Yaprak su potansiyeli, ceviz genotiplerinin tuz stresine karşı fizyolojik dayanıklılıklarını belirlemede temel bir parametre olarak öne çıkmaktadır. Serr, Sölez-1 ve Maraş-18 gibi toleranslı çeşitlerin bu parametreyi stres koşullarında daha yüksek düzeyde tutabilmesi, bu çeşitlerin osmotik dengeyi sürdürebilme ve su kaybını sınırlayabilme potansiyellerini göstermektedir. Chandler, Fernor ve Hartley gibi hassas çeşitlerde ise bu dengenin sağlanamaması, tuz stresine karşı duyarlılığın belirleyici bir göstergesi olarak değerlendirilmektedir.

4.2.9. Yaprakta Potasyum (K), Sodyum (Na), Kalsiyum (Ca) ve Klor (Cl) Konsantrasyonu

Bu çalışmada, ceviz çeşitlerinin yaprak dokularındaki potasyum (K), sodyum (Na), kalsiyum (Ca) ve klor (Cl) iyonlarının 150 mM NaCl uygulaması ve kontrol koşullarındaki değişimleri analiz edilmiştir (Çizelge 4.17). Bulgular, çeşitler arasında ve tuz uygulamasına bağlı olarak istatistiksel açıdan anlamlı farklılıkların oluştuğunu göstermiştir ($p < 0.05$).

Toleranslı ceviz çeşitlerinden Serr (%2.87) ve Maraş-18 (%2.49), yapraklarında yüksek düzeyde K birikimi tespit edilmiş ve bu durum, tuz stresine karşı iyon homeostazını koruma kapasitelerinin güçlü olduğunu ortaya koymuştur. Buna karşılık, hassas çeşitlerden Fernor, K içeriği bakımından en düşük değeri (%2.08) sergileyerek K^+ tutma kapasitesinin sınırlı olduğu belirlenmiştir. Tuz uygulaması ile birlikte, tüm çeşitlerde K oranı azalmakla birlikte, toleranslı grupta bu azalış daha sınırlı kalmıştır.

Yaprak dokularında biriken Na miktarı bakımından çeşitler arasında belirgin farklılıklar gözlenmiştir. Fernor çeşidi %1.21 ile en yüksek Na içeriğine sahip olmuş, bu da söz konusu çeşidin tuz alımını sınırlamada başarısız olduğunu göstermiştir. Öte yandan, Serr (%0.70) ve Sölez-1 (%0.74) çeşitlerinde daha düşük Na birikimi tespit edilmiştir. Bu durum, toleranslı çeşitlerin Na^+ alımını sınırlandıran veya aktif olarak dışlayan iyon taşıma mekanizmalarına sahip olduklarını düşündürmektedir. Na açısından interaksiyon etkisi de anlamlı bulunmuş ($p = 0.05$), özellikle Fernor $\times$ 150 mM kombinasyonu %1.34 ile en yüksek Na birikimini göstermiştir.

Ca içeriği, stres koşullarında önemli düzeyde değişmiş ve çeşitler arasında farklılık göstermiştir ($p = 0.0006$). Serr (%1.94) ve Maraş-18 (%1.76) çeşitleri, özellikle 150 mM NaCl koşullarında Ca birikim düzeylerini koruyabilmiş ya da artırabilmiştir. Bu durum, bu çeşitlerin hücre zar stabilitesini ve sinyal iletim süreçlerini sürdürebilme potansiyelini göstermektedir. Fernor çeşidinde ise hem kontrol hem stres koşullarında düşük Ca içerikleri kaydedilmiştir. Çeşit $\times$ tuz interaksiyonu da Ca için anlamlı bulunmuş ($p = 0.0012$), bu durum iyon taşınımı ve hücresel düzenleme süreçlerinin çeşitlere göre farklılık gösterdiğini işaret etmektedir.

Cl içeriği incelendiğinde, tuz uygulaması altında Fernor $\times$ 150 mM kombinasyonunun %3.49 ile en yüksek Cl birikimini sergilediği belirlenmiştir. Bu durum, Fernor çeşidinin Cl^- iyonlarına karşı geçirgenlik kontrolünü etkin şekilde sürdüremediğini göstermektedir. Serr ve Sölez-1 gibi toleranslı çeşitlerde Cl seviyeleri daha düşüktür ve bu durum, iyon toksisitesine karşı daha etkili bir savunma mekanizmasına işaret etmektedir. Çeşitler arasında ve interaksiyon açısından Cl içeriği anlamlı şekilde farklılık göstermiştir ($p = 0.0059$ ve $p = 0.0051$).

Çizelge 4.17. Toleranslı ve Hassas ceviz çeşitlerinin 150 mM NaCl uygulamasının yaprakta Potasyum (K), Sodyum (Na), Kalsiyum (Ca) ve Klor (Cl) konsantrasyonu üzerine etkisi

Çeşitler	K (%)	Na (%)	Ca (%)	Cl (%)
Chandler	2.28 bc	0.92 b	1.69 b	2.25 b
Fernor	<u>2.08 c</u>	<u>1.21 a</u>	<u>1.35 c</u>	<u>2.74 a</u>
Hartley	2.29 bc	0.93 b	1.83 ab	2.30 b
Serr	<u>2.87 a</u>	<u>0.70 c</u>	<u>1.94 a</u>	2.18 b
Sölez-1	2.22 bc	0.74 c	1.60 b	2.30 b
Maraş-18	2.49 b	0.98 b	1.76 ab	2.36 b
LSD %5	0.36	0.14	0.23	0.28
<i>p değeri</i>	0.0027	<0.0001	0.0006	0.0059
İnteraksiyon				
Chandler x 150 mM	2.56 bc ± 0.96	1.01 bc± 0.92	1.87 b ± 0.96	2.72 bc ± 0.96
Chandler x 0 mM	2.00 d ± 0.72	0.83 cd ± 0.42	1.51 cd ± 0.93	1.77 ef ± 0.88
Fernor x 150 mM	2.2 bcd ± 0.82	<u>1.34 a ± 0.94</u>	1.81 bc ± 0.90	<u>3.49 a ± 1.03</u>
Fernor x 0 mM	<u>1.94 d ± 0.64</u>	1.07 b ± 0.93	<u>0.89 e ± 0.42</u>	2.00 ef ± 0.72
Hartley x 150 mM	2.52 bc ± 0.92	1.06 b ± 0.95	1.82 bc ± 0.91	2.90 b ± 0.82
Hartley x 0 mM	2.06 cd ± 0.72	0.80 d ± 0.46	1.83 bc ± 0.91	<u>1.70 f ± 0.88</u>
Serr x 150 mM	<u>3.07 a ± 1.01</u>	0.73 d ± 0.41	2.07 ab ± 0.52	2.51 bc ± 0.96
Serr x 0 mM	2.67 ab ± 0.95	0.68 d ± 0.38	1.81 bc ± 0.90	1.84 ef ± 0.90
Sölez-1 x 150 mM	2.06 cd ± 0.62	0.72 d ± 0.41	1.90 b ± 0.95	2.49 cd ± 0.93
Sölez-1 x 0 mM	2.38 bcd± 0.88	0.77 d ± 0.43	1.30 d ± 0.92	2.11 de ± 0.89
Maraş-18 x 150 mM	2.69 ab ± 0.96	1.16 ab ± 0.97	<u>2.25 a ± 0.98</u>	2.67 bc ± 0.97
Maraş-18 x 0 mM	2.28 bcd ± 0.84	0.79 d ± 0.42	1.26 d ± 0.94	2.04 ef ± 0.98
LSD %5	0.5	0.19	0.33	0.39
<i>p değeri</i>	0.176	0.05	0.0012	0.0051

Bu çalışmada, ceviz çeşitlerinin yaprak dokularında 150 mM NaCl uygulaması sonrasında oluşan iyonik yanıtlar incelenmiş; özellikle K⁺, Na⁺, Ca²⁺ ve Cl⁻ iyonlarının birikim düzeyleri, çeşitlerin tuzluluğa karşı gösterdikleri toleransla ilişkilendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar, iyon homeostazı ile tuz toleransı arasındaki güçlü ilişkiyi doğrular nitelikte olup, iyon birikiminde gözlenen varyasyonlar, genotiplerin farklı iyon taşıma ve ayrıştırma mekanizmalarına sahip olduğunu göstermektedir.

Tuz stresi koşullarında bitkinin K^+ düzeyini koruyabilmesi, iyon seçiciliği ve hücre içi homeostaz açısından kritik önemdedir. Bu çalışmada Serr (%2.87) ve Maraş-18 (%2.49) çeşitlerinin yüksek K^+ içeriği, bu çeşitlerin K^+/Na^+ oranını koruyarak iyon toksisitesini sınırlayabildiğini göstermektedir. Benzer şekilde, Lotfi ve ark. (2009b), tuz stresine toleranslı ceviz çeşitlerinde özellikle sürgün dokularında K^+ seviyelerinin yüksek kaldığını ve bu durumun stres adaptasyonu açısından belirleyici olduğunu rapor etmişlerdir. Mahouachi (2018) ise 13/1 mango anacında tuz stresi altında K^+ düzeyinin yükseldiğini bildirerek, bu iyonun tolerans geliştirmede önemli bir rol oynadığını vurgulamıştır. Buna karşılık, Fernor gibi hassas çeşitlerin (%2.08) düşük K^+ seviyeleri, Na^+ baskınlığına bağlı K^+ kaybı yaşadığını ve bu durumun metabolik süreçleri sekteye uğrattığını göstermektedir.

Na^+ iyonunun bitki bünyesine aşırı alınması, hücrel toksisiteye neden olarak enzim inhibisyonu, osmotik dengesizlik ve zar yapılarında bozulmaya yol açar. Bu çalışmada, Fernor çeşidinde %1.21 gibi yüksek Na^+ birikimi, bu çeşidin tuz alımını sınırlayan veya geri atan mekanizmalarının yetersiz olduğunu göstermektedir. Bu durum, Matsumoto ve ark. (2006) tarafından armut anaçlarında bildirilen bulgularla örtüşmektedir; çalışmada, her iki tuz dozunda da Na^+ ve Cl^- iyonlarının gövde ve köklerde yüksek düzeyde biriktiği ifade edilmiştir. Serr (%0.70) ve Sölez-1 (%0.74) gibi çeşitlerde ise Na^+ birikiminin düşük düzeyde kalması, bu çeşitlerin kök düzeyinde Na^+ geri taşınması ya da vakuol içine yönlendirme gibi etkin savunma mekanizmalarına sahip olduğunu göstermektedir. Ji ve ark. (2022b) da, tuz toleransı yüksek *Juglans regia* $\times$ *J. hindsii* melezlerinde düşük Na^+ birikimi gözlemleyerek bu özelliği genetik dayanıklılıkla ilişkilendirmiştir.

Ca^{2+} iyonları, hücre zar stabilitesi, iyon taşıma dengesi ve sinyal iletiminde merkezi role sahiptir. Serr ve Maraş-18 çeşitlerinde kaydedilen yüksek Ca^{2+} içerikleri (%1.94 ve %1.76), bu çeşitlerin zar bütünlüğünü koruma kapasitesinin güçlü olduğunu ve iyonik stres karşısında hücrel stabiliteyi sürdürebildiklerini göstermektedir. Lotfi ve ark. (2009b), toleranslı ceviz genotiplerinde sürgün dokularında Ca^+ birikiminin yüksek olduğunu bildirmiştir. Ayrıca, Akça ve Samsunlu (2012), tuza toleranslı ceviz çeşitlerinde Ca^+/Na^+ oranının korunmasının zar geçirgenliğinin düzenlenmesinde önemli olduğunu vurgulamıştır. Fernor gibi düşük Ca^{2+} içeriğine sahip çeşitlerde ise bu koruyucu mekanizmanın yetersiz kaldığı anlaşılmaktadır.

Cl^- iyonu, tuz stresinde toksik etki yaratan başlıca anyonlardan biri olup, özellikle yaprak dokularında birikimi fotosentetik sistem üzerinde zararlı etkiler oluşturabilir. Bu çalışmada, Fernor $\times$ 150 mM kombinasyonu %3.49 ile en yüksek Cl^- birikimini sergilemiş, bu da Fernor çeşidinin iyon detoksifikasyon sistemlerinin zayıf olduğunu göstermiştir. Ferreira ve ark. (2019), çilek çeşitlerinde Cl^- iyonlarının özellikle yapraklarda yoğunlaştığını ve yaprak toksisitesinin esas olarak Cl^- birikiminden kaynaklandığını rapor etmiştir. Toleranslı çeşitler olan Serr ve Sölez-1 çeşitlerinde gözlenen düşük Cl^- seviyeleri, bu genotiplerin iyon seçicilik ve yapraktan dışa atım mekanizmalarının daha etkin çalıştığını göstermektedir. Wang ve ark. (2021), geç gelişen ceviz çeşitlerinde Cl^- iyonlarının köklerde biriktiğini, erken gelişen çeşitlerde ise yapraklarda

yoğunlaştığını belirtmiş ve bu farklılığın genotipik tuz toleransını etkileyen önemli bir unsur olduğunu vurgulamıştır. Aynı şekilde, Akça ve Şahin (2022), cevizde artan tuzluluk seviyeleriyle birlikte Na^+ ve Cl^- iyonlarının yaprak dokularında daha yüksek düzeylere ulaştığını belirtmiştir.

Genel olarak değerlendirildiğinde, yaprak dokularındaki K^+ , Na^+ , Ca^{2+} ve Cl^- içerikleri, ceviz genotiplerinin tuz stresine karşı geliştirdiği savunma mekanizmalarının önemli fizyolojik belirteçleri arasında yer almaktadır. Toleranslı genotipler, iyon homeostazını daha etkin biçimde düzenleyerek toksik iyonların birikimini sınırlandırmakta ve esansiyel iyonların (özellikle K^+ ve Ca^{2+}) seviyelerini sürdürebilmektedir. Lotfi ve ark. (2009a), cevizde Na^+ birikiminin nispeten sınırlı kaldığını belirtmiş, bu durumun iyon toleransında genotipik farklılıklara dayandığını vurgulamıştır. Bu yönüyle iyon profili analizleri, cevizde tuza dayanıklı genotiplerin belirlenmesinde hem fenotipik hem de genetik seleksiyon süreçleri açısından büyük önem taşımaktadır.

4.2.10. Prolin Miktarı

Bu çalışmada, 150 mM NaCl uygulaması altında ceviz çeşitlerinin yaprak dokularında biriken prolin miktarları belirlenmiş ve stres yanıtları ortaya konmuştur (Çizelge 4.18).

Hassas çeşitler olan Chandler, Fernor ve Hartley, tuz uygulaması sonrasında prolin seviyelerinde bir artış gözlenmemiştir. Chandler, Fernor ve Hartley çeşitlerinde prolin birikimi sırasıyla 0.97, 0.77 ve 0.97 $\mu\text{g/g}$ düzeyinde kalmış, bu durum stres koşullarına karşı sınırlı bir osmotik adaptasyon yanıtının geliştiğini göstermektedir. Hassas grubun 150 mM NaCl uygulamasında genel ortalaması 0.90 $\mu\text{g/g}$ olarak belirlenmiş ve bu değer kontrol grubu ortalamasından (1.24 $\mu\text{g/g}$) daha düşük kalmıştır.

Buna karşılık, tuz stresine toleranslı olarak belirlenen çeşitlerde prolin birikimi artış göstermiştir. Serr çeşidi, 4.25 $\mu\text{g/g}$ ile en yüksek prolin düzeyine ulaşmış ve bunu sırasıyla Sölez-1 (3.54 $\mu\text{g/g}$) ve Maraş-18 (3.16 $\mu\text{g/g}$) çeşitleri izlemiştir. Bu çeşitlerin 150 mM NaCl uygulaması altında ortalama prolin değeri 3.65 $\mu\text{g/g}$ olarak tespit edilmiş ve kontrol değerine göre (2.11 $\mu\text{g/g}$) anlamlı düzeyde artmıştır. Bu sonuçlar, toleranslı çeşitlerin tuz stresine karşı prolin birikimi yoluyla etkili bir osmotik koruma mekanizması geliştirdiğini açıkça göstermektedir.

Çizelge 4.18. Toleranslı ve Hassas ceviz çeşitlerinin 150 mM NaCl uygulamasının prolin miktarı üzerine etkisi ($\mu\text{g/g}$)

Çeşitler	150 mM NaCl	Kontrol
Chandler	0.97 ± 1.64	1.32 ± 1.82
Fernor	0.77± 1.71	1.16± 1.44
Hartley	0.97 ± 1.64	1.25± 1.48
Genel ortalama	0.90 c	1.24 bc
Serr	4.25± 2.62	2.65± 1.32
Sölez-1	3.54 ± 2.35	2.35 ± 1.26
Maraş-18	3.16± 2.72	1.33 ± 1.82
Genel ortalama	3.65 a	2.11 b

*Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasında istatistiki düzeyde önemli farklılık bulunmaktadır (($p \leq 0.05$) (LSD %5= 0.23) (Ö.D.= Önemli Değil)) (($p \leq 0.05$) (LSD %5= 0.84)).

Bu çalışmada, ceviz çeşitlerinin tuz stresine karşı geliştirdikleri fizyolojik adaptasyon mekanizmaları kapsamında, yaprak dokularında biriken serbest prolin düzeyleri analiz edilmiştir. Prolin, bitkilerin abiyotik stres koşullarına verdiği tepkilerde önemli rol oynayan bir amino asit olup, osmotik dengeyi sağlama, serbest radikalleri nötralize etme ve protein yapılarının stabilitesini koruma gibi çok yönlü işlevleri ile bitkisel dayanıklılıkta kritik bir bileşendir (Ashraf ve Foolad, 2007).

Çalışmada elde edilen bulgular, prolin birikiminin ceviz çeşitlerinin tuz stresine karşı gösterdiği fizyolojik yanıtlarla doğrudan ilişkili olduğunu ortaya koymuştur. Özellikle tuzluluğa hassas olarak sınıflandırılan Chandler, Fernor ve Hartley çeşitlerinde, 150 mM NaCl uygulaması sonrasında yaprak dokularındaki prolin düzeylerinde anlamlı bir artış gözlenmemiştir. Sırasıyla 0.97, 0.77 ve 0.97 $\mu\text{g/g}$ düzeyinde kalan bu değerler, kontrol grubundaki ortalama (1.24 $\mu\text{g/g}$) seviyenin dahi altında kalmış ve bu durum söz konusu çeşitlerin osmotik stres koşullarına karşı yeterli savunma tepkisi geliştiremediğini göstermiştir. Hassas çeşitlerin genel ortalaması 0.90 $\mu\text{g/g}$ olarak tespit edilmiş olup, bu seviye tuz stresıyla başa çıkma açısından yetersiz bir fizyolojik tepkiye işaret etmektedir.

Buna karşın, toleranslı olarak değerlendirilen Serr, Sölez-1 ve Maraş-18 çeşitlerinde, prolin birikiminin belirgin biçimde artış gösterdiği gözlemlenmiştir. Özellikle Serr çeşidi 4.25 $\mu\text{g/g}$ değeriyle en yüksek düzeye ulaşırken, Sölez-1 (3.54 $\mu\text{g/g}$) ve Maraş-18 (3.16 $\mu\text{g/g}$) gibi çeşitlerinde yüksek düzeyde birikim gerçekleşmiştir. Bu çeşitlerin ortalama prolin değeri olan 3.65 $\mu\text{g/g}$, hassas çeşitlere kıyasla yaklaşık dört katlık bir artışı ifade etmekte ve genotipik farklılığın fizyolojik düzeyde açıkça ayırt edilebilir olduğunu göstermektedir.

Bu sonuçlar, literatürde daha önce bildirilen bulgularla da güçlü bir uyum göstermektedir. Vahdati (2014), ceviz fidelerinde prolin birikiminin ozmotik stres altında antioksidatif savunma sistemlerini harekete geçirdiğini ve bu sayede hücresel stabilitenin korunduğunu belirtmiştir. Aynı şekilde Valero ve Khemira (2016), toprak tuzluluğu uygulanan üç farklı badem genotipinde prolin düzeylerinin arttığını ve bunun genotipler arası tolerans düzeylerini etkilediğini rapor etmişlerdir. Momenpour ve ark. (2015) ise bademde artan tuz konsantrasyonlarının (0–80 mmol/L) prolin birikimini anlamlı düzeyde artırdığını ve bu yanıtın genotipe bağlı olarak değiştiğini ifade etmiştir. Bu bulgular, cevizde gözlenen farklılıkların da genetik temelli olduğunu desteklemektedir.

Ji ve ark. (2022b), prolin birikiminin yalnızca ozmotik denge sağlamakla kalmayıp, aynı zamanda yaprak ozmotik potansiyelini daha az negatif değerlere çekerek fizyolojik dayanıklılığı artırdığını bildirmiştir. Ayrıca, Kumari ve ark. (2007) ve Liu ve ark. (2020) gibi araştırmacılar, prolinin reaktif oksijen türlerinin (ROS) temizlenmesinde antioksidatif sistemleri destekleyici bir rol oynadığını ve bu sayede hücresel redoks dengesinin sürdürülebilirliğine katkı sağladığını belirtmişlerdir. Bu kapsamda, çalışmada özellikle Serr çeşidinde gözlenen yüksek prolin birikiminin, bu çeşidin diğer fizyolojik parametrelerde (RWC, su potansiyeli, ozmotik potansiyel vb.) de gösterdiği üstün performansla paralellik gösterdiği değerlendirilmektedir.

Yaprak dokularında biriken prolin düzeyleri, ceviz genotiplerinin tuz stresine karşı geliştirdiği fizyolojik adaptasyon düzeylerini belirlemede güvenilir bir gösterge niteliğindedir. Toleranslı genotiplerde gözlenen prolin birikimi, hücre içi su dengesinin korunması, zar yapılarının stabilizasyonu ve metabolik sürekliliğin sağlanması açısından önemli katkılar sağlamaktadır. Bu nedenle, prolin metabolizmasının genotipik düzeyde değerlendirilmesi, cevizde tuza dayanıklı çeşitlerin ıslahı açısından değerli bir fizyolojik ve biyokimyasal belirteç olarak öne çıkmaktadır.

4.2.11. Yaprak Hücrelerinde Membran Zararlanmasının Belirlenmesi (%)

Bu çalışmada, 150 mM NaCl uygulaması altında farklı ceviz çeşitlerinde yaprak hücre zarı bütünlüğünde meydana gelen değişimler değerlendirilmiş, membran zararlanma oranları belirlenmiştir (Çizelge 4.19). Elde edilen sonuçlara göre, membran zararlanması Chandler (%3.86), Fernor (%4.68) ve Hartley (%4.25) çeşitlerinde görece daha yüksek; Serr (%2.52), Sölez-1 (%3.16) ve Maraş-18 (%3.37) çeşitlerinde ise daha düşük düzeylerde tespit edilmiştir. Bununla birlikte, varyans analizinden elde edilen p değeri ($p = 0.996$) 0.05 anlamlılık düzeyinin oldukça üzerinde olup, çeşitlerin bu parametreye verdiği yanıtların istatistiksel olarak anlamlı olmadığı sonucunu ortaya koymaktadır.

Bu durum, uygulanan tuz konsantrasyonunun (150 mM NaCl) membran düzeyinde zararlanma oluşturacak kadar yüksek olmayabileceğini veya çeşitler arasında bu parametreye yönelik farklılıkların biyolojik olarak sınırlı düzeyde kaldığı belirlenmiştir.

Çizelge 4.19. Toleranslı ve Hassas ceviz çeşitlerinin 150 mM NaCl uygulamasının yaprak hücrelerinde membran zararlanmasının belirlenmesi üzerine etkisi

Çeşitler	Membran zararlanması (%)
Chandler	3.86 ± 1.53
Fernor	4.68 ± 1.26
Hartley	4.25 ± 1.44
Serr	2.52 ± 0.92
Sölez-1	3.16 ± 1.41
Maraş-18	3.37 ± 1.73
LSD %5	Ö.D.
<i>p değeri</i>	0.996

Bu çalışmada, 150 mM NaCl uygulaması altında ceviz çeşitlerinde yaprak hücre zarlarında meydana gelen zararlanma düzeyleri incelenmiş ve bu parametre üzerinden stres kaynaklı hücresel bütünlüğün değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Tuz stresi, hücre zarının yapısını doğrudan etkileyen bir stres faktörü olup; plazma zarının geçirgenliğinde artış, lipid peroksidasyonu, iyon dengesizlikleri ve elektrolit sızıntısı gibi fizyolojik değişimlere neden olmaktadır (Munns & Tester, 2008; Taarit ve ark., 2010). Elektrolit sızıntısı, bu bağlamda stresin etkilerini değerlendirmede yaygın olarak

kullanılan ve zar stabilitesini doğrudan yansıtan bir fizyolojik belirteçtir (Bajji ve ark., 2001; Blokhina ve ark., 2003; Li ve ark., 2010; Al Busaidi ve Farag, 2015).

Çalışmada elde edilen verilere göre, zararlanma oranı tuzluluğa hassas olarak sınıflandırılan Fernor (%4.68), Hartley (%4.25) ve Chandler (%3.86) çeşitlerinde, toleranslı olarak tanımlanan Serr (%2.52), Sölez-1 (%3.16) ve Maraş-18 (%3.37) çeşitlerine kıyasla daha yüksek düzeylerde gözlenmiştir. Ancak, varyans analizinden elde edilen yüksek p değeri ($p = 0.996$), bu farklılıkların istatistiksel olarak anlamlı olmadığını ortaya koymuştur. Dolayısıyla, hücre zarı zararlanması bu çalışma kapsamında ceviz çeşitleri arasında ayırım yapılmasını sağlayacak derecede belirleyici bir parametre olarak öne çıkmamıştır. Bu sonuç, literatürde bildirilen farklı bulgularla da desteklenmektedir. Örneğin, Wani ve ark. (2013), Talaat ve ark. (2015) ve Hatami ve ark. (2018), artan tuz konsantrasyonlarının bitki membranlarına zarar verdiğini ve elektrolit sızıntısında artışa neden olduğunu belirtmişlerdir. Öte yandan, Chaparzadeh ve Hosseinzad-Behboud (2015) tarafından turpta, Aras ve Eşitken (2019) tarafından elmada ve Aydınli (2021) tarafından armut ve ayva anaçlarında yapılan çalışmalarda, tuz stresinin membran geçirgenliği üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etki oluşturmadığı rapor edilmiştir. Bu durum, tuz stresinin membran yapıları üzerindeki etkisinin bitki türüne, genotipine ve stresin şiddeti ile süresine bağlı olarak değişkenlik gösterebileceğini ortaya koymaktadır.

Bu bağlamda, mevcut çalışmada membran zararlanmasının istatistiksel anlamlılık göstermemesi birkaç açıdan değerlendirilebilir: (i) 150 mM NaCl konsantrasyonu bazı genotipler için zararlı olsa da hücre zarının yapısal bütünlüğünü bozacak eşiği aşmamış olabilir. Ji ve ark. (2022a), *Juglans microcarpa*'da 200 mM NaCl ve üzeri konsantrasyonların membran yapısında belirgin bozulmalar oluşturduğunu belirtmiştir. (ii) Membran zararlanması genellikle stres süresine duyarlıdır; bu nedenle farklı genotiplerin strese karşı verdiği zamana bağlı fizyolojik tepkiler tek bir ölçüm zamanında tam olarak yansıtamayabilir. (iii) Toleranslı genotiplerde antioksidan savunma sistemlerinin (SOD, POD, CAT) daha aktif çalışması, lipid peroksidasyonu gibi zar hasarlarını sınırlamış olabilir (Vahdati, 2013). Ancak bu savunma sistemlerinin genotipler arasında eşik değeri aşmayan düzeylerde çalışması, zar farklılığının istatistiksel anlamda ayrılmamasına neden olmuş olabilir. (iv) Son olarak, membran lipid kompozisyonunun genotipten bağımsız olarak yapısal olarak stabil kalması, bu parametrenin çeşitler arası farklılık üretmesini sınırlandırmış olabilir.

Bu çalışma kapsamında kullanılan 150 mM NaCl tuz uygulaması altında ceviz yapraklarında membran bütünlüğünün büyük oranda korunduğu ve bu nedenle çeşitler arasında anlamlı farklılıklar oluşmadığı sonucuna ulaşılmıştır. Membran zararlanmasının daha belirgin şekilde gözlenebilmesi için stres şiddetinin artırılması (%200–300 mM NaCl) veya uygulama süresinin uzatılması önerilebilir. Ayrıca bu parametrenin değerlendirilmesinde yalnızca elektrolit sızıntısı değil, aynı zamanda MDA (malondialdehit) içeriği gibi daha hassas oksidatif stres belirteçlerinin de dahil edilmesi, sonuçların biyolojik anlamlılığını artırabilir (Garriga ve ark., 2015).

4.2.12. İkinci Yıl Bulgularının Değerlendirilmesi ve RNA-Seq Analizi İçin Çeşit Seçimi

Bu çalışmanın ikinci yılında, 150 mM NaCl konsantrasyonunda uygulanan tuz stresine karşı farklı ceviz çeşitlerinin fizyolojik, morfolojik ve iyonik tepkileri detaylı olarak incelenmiş ve elde edilen veriler doğrultusunda RNA-Seq analizine uygun çeşitlerin seçimi yapılmıştır. Bulgular, çeşitlerin stres koşullarına verdikleri tepkilerin belirgin düzeyde farklılık gösterdiğini ve bu farklılıkların stres toleransı açısından anlamlı olduğunu ortaya koymuştur.

Tuz stresine duyarlılığı yüksek olan Chandler, Fernor ve Hartley çeşitlerinde; SPAD değerlerinde belirgin azalma, yaprak sıcaklıklarında artış, yaprak alanı ve yaprak sayısında düşüş, oransal su içeriği ve ozmotik/su potansiyellerinde ciddi negatif değişimler, iyon birikiminde (özellikle Na^+ ve Cl^-) yüksek düzeyde artış ve prolin birikiminde yetersizlik gözlenmiştir. Buna karşılık, Serr, Sölez-1 ve Maraş-18 gibi toleranslı çeşitlerde, bu parametrelerin büyük çoğunluğu stres altında da kontrol düzeyine yakın değerlerde seyretmiş; özellikle K^+ ve Ca^{2+} iyonlarını koruma, düşük Na^+ ve Cl^- birikimi sağlama, yüksek RWC ve prolin içeriklerini sürdürebilme gibi stresle mücadele açısından kritik göstergelerde avantaj sağladıkları belirlenmiştir.

Özellikle Serr ve Fernor çeşitleri, birçok fizyolojik ve biyokimyasal parametrede birbirine zıt tepkiler vererek, bu çalışmada en toleranslı ve en hassas çeşitler olarak öne çıkmıştır. Serr çeşidi, yüksek SPAD değeri, düşük yaprak sıcaklığı, geniş yaprak alanı, yüksek yaprak su içeriği, daha az negatif su ve ozmotik potansiyel, düşük Na^+ ve Cl^- birikimi, yüksek K^+ ve Ca^{2+} düzeyleri, güçlü prolin birikimi ve düşük zar hasarı ile tuz stresine karşı üstün bir adaptasyon göstermiştir. Buna karşılık, Fernor çeşidinde tüm parametrelerde stresin olumsuz etkileri daha şiddetli gözlenmiş ve bu çeşit en hassas çeşit olarak değerlendirilmiştir.

Bu bulgular doğrultusunda, ikinci yıl çalışmaları kapsamında fizyolojik dayanıklılığı en yüksek olan Serr ve fizyolojik duyarlılığı en yüksek olan Fernor çeşitleri, RNA-Seq analizi için karşılaştırmalı çeşitler olarak seçilmiştir. Böylece, transkriptom düzeyinde farklılık gösteren genlerin belirlenmesiyle, tuz stresine karşı tolerans mekanizmalarının moleküler temellerinin anlaşılması amaçlanmaktadır.

4.3. RNA Sekanslama Bulguları

Temiz okuma kalite değerleri Çizelge 4.20'de gösterilmiştir. Ham veriler, adaptör kirliliği ve düşük kaliteli bazların temizlenmesi amacıyla Trimmomatic yazılımı kullanılarak işlemden geçirilmiştir. Toplam ham okuma sayısı 43.10 M ile 52.43 M arasında değişmiştir. Toplam temiz okuma sayısı ise 36.43 M ile 43.25 M arasında değişmiştir. Toplam temiz baz sayısı örnek başına 5.46 Gb ile 6.49 Gb arasında saptanmıştır. Elde edilen verilerin Q20 değeri %97.77, Q30 değeri ise %93.05 olarak bulunmuştur. Shi ve ark. (2022) çalışmasında ise benzer şekilde, temiz verilerin ortalama haritalama oranı %97.55 olarak rapor edilmiştir. Tez çalışmasında elde edilen Q20 ve Q30 değerleri, Shi ve ark. (2022) çalışmasındaki yüksek kalite metrikleri ile uyumlu olup, RNA-seq verilerinin güvenilir olduğunu göstermektedir. Toplam temiz okuma oranı %81.62 ile %84.95

arasında değişmiş, rRNA oranı ise %0.3 ile %9.02 arasında tespit edilmiştir. Shi ve ark. (2022) çalışmasında ise bu oranlar %92'nin üzerinde bir haritalama oranı ile benzerlik göstermektedir, bu da rRNA'nın etkin bir şekilde filtrelendiğini ve transkriptomun büyük kısmının mRNA'dan oluştuğunu desteklemektedir.

Çizelge 4.20. Temiz okuma kalite ölçümleri

Örnekler	Toplam ham okuma sayısı (Milyon)	Toplam temiz okuma sayısı (Milyon)	Toplam temiz baz sayısı (Gb)	Toplam temiz okuma sayısı Q20 (%)	Toplam temiz okuma sayısı Q30 (%)	Toplam temiz okuma oranı (%)	rRNA Oranı (%)
Fernor_kontrol_1	52.43	43.25	6.49	97.77	93.05	82.49	0.3
Fernor_kontrol_2	50.68	42.78	6.42	97.74	92.93	84.41	3.36
Fernor_kontrol_3	49.03	40.02	6.00	97.85	93.19	81.62	4.28
Fernor_150mM_1	52.43	42.34	6.35	97.50	92.37	80.75	0.39
Fernor_150mM_2	50.68	43.05	6.46	97.61	92.51	84.95	0.41
Fernor_150mM_3	50.68	42.71	6.41	97.80	93.08	84.27	0.48
Serr_kontrol_1	52.43	42.79	6.42	97.71	92.97	81.62	9.02
Serr_kontrol_2	48.93	42.79	6.42	97.55	92.59	87.44	2.69
Serr_kontrol_3	52.43	43.12	6.47	97.54	92.48	82.25	0.61
Serr_150mM_1	52.43	43.05	6.46	97.69	92.76	82.12	8.45
Serr_150mM_2	50.68	42.76	6.41	97.75	93.05	84.37	0.44
Serr_150mM_3	43.10	36.43	5.46	97.70	92.75	84.51	5.19

4.3.1. Referans Ceviz Genomuna Haritalama Sonuçları

Bu çalışmada elde edilen RNA-seq verileri, yüksek doğruluk ve hassasiyetle hizalama sağlayan HISAT2 yazılımı kullanılarak Chandler ceviz çeşidinin referans genomuna haritalanmıştır (Çizelge 4.21). Bu işlem sonucunda, her bir örnek için SAM uzantılı dosyalar oluşturulmuş ve haritalama verileri detaylı olarak analiz edilmiştir. Toplam temiz okuma sayıları, 36,427,096 ile 43,249,892 arasında değişmiş ve her bir örnekte ortalama haritalama oranı %91.5'in üzerinde gerçekleşmiştir. Ayrıca, ceviz genomuna benzersiz olarak hizalanan okuma oranı %57.67 ile %62.36 arasında tespit edilirken, dizi spesifik haritalama oranı ise %94.93 ile %97.92 aralığında belirlenmiştir. Bu sonuçlar, literatürde yer alan diğer ceviz RNA-seq çalışmalarında rapor edilen haritalama oranları ile tutarlılık göstermektedir. Cevizde lignin biyosentezini inceleyen çalışmalarda da benzer şekilde yüksek haritalama oranları elde edilmiştir. Bu çalışmalarda, lignin biyosentezi ile ilgili genlerin ekspresyon profilleri detaylı bir şekilde incelenmiş ve haritalama oranları %90'ın üzerinde rapor edilmiştir (Li ve ark., 2023; Zhang ve ark., 2020). Benzer şekilde, ceviz popülasyonlarının genomik çeşitliliğini inceleyen araştırmalarda da HISAT2 ile yapılan hizalamalarda yüksek haritalama başarıları elde edilmiş ve bu başarılar genetik varyasyonların ve adaptasyon süreçlerinin anlaşılmasına önemli katkılar sağlamıştır (Zhao ve ark., 2011). Bu çalışmada

elde edilen bu veriler, ceviz genomunun farklı biyolojik süreçlerini anlamak için güvenilir ve yüksek kaliteli bir veri seti sunduğunu göstermektedir. Elde edilen haritalama oranları ve benzersiz hizalanma değerleri, HISAT2 yazılımının cevizde gen ekspresyon analizlerinde etkin bir araç olduğunu bir kez daha doğrulamaktadır. Bu bulgular, çalışmamızın geçerliliğini desteklemekte ve literatürdeki benzer çalışmalarla uyumlu olduğunu ortaya koymaktadır.

Çizelge 4.21. Genom Haritalama Sonuçları

Örnekler	Toplam Temiz Okuma Sayısı	Haritalama Yüzdesi (%)	Benzersiz Haritalama Yüzdesi (%)	Dizi Spesifik Haritalama Yüzdesi (%)
Fernor_kontrol_1	43,249,892	91.42	60.48	95.57
Fernor_kontrol_2	42,780,280	91.70	60.93	94.93
Fernor_kontrol_3	40,020,926	91.88	61.03	95.16
Fernor_150mM_1	42,338,390	91.08	60.40	97.13
Fernor_150mM_2	43,052,446	91.33	60.61	97.39
Fernor_150mM_3	42,708,892	91.89	62.36	97.92
Serr_kontrol_1	42,791,066	91.39	57.67	96.19
Serr_kontrol_2	42,785,218	91.90	58.53	96.44
Serr_kontrol_3	43,121,970	91.75	60.95	95.78
Serr_150mM_1	43,052,076	91.30	59.01	96.48
Serr_150mM_2	42,760,798	91.08	60.30	95.61
Serr_150mM_3	36,427,096	91.97	61.36	95.57

Genom haritalama sonucunda elde edilen SAM uzantılı dosyalar SAMTOOLS programı ile BAM dosyalarına dönüştürülmüştür.

4.3.2. Gen İfade Analizi

Gen Haritalama ve İfadelerinin Belirlenmesi

Bu çalışmada elde edilen yeni gen bilgileri, Bowtie2 programı kullanılarak temiz RNA okumalarının ceviz referans genomuna hizalanmasıyla analiz edilmiştir. Bu süreçte, haritalama yüzdesi %81.40 ile %83.39 arasında belirlenmiştir (Çizelge 4.22). Ardından, her bir örnek için gen ifade düzeyleri RSEM programı kullanılarak hesaplanmıştır. Elde edilen bu bulgular, literatürdeki benzer çalışmalarla uyumludur. Fang ve ark. (2021) tarafından yürütülen çalışmada, Bowtie2 ve RSEM kullanılarak ceviz meyvelerinin *Colletotrichum gloeosporioides* enfeksiyonuna verdiği yanıtlar incelenmiş ve benzer şekilde yüksek haritalama oranları elde edilmiştir. Benzer şekilde, Duan ve ark. (2019) çalışmasında, GA₃'ün cevizde endokarp lignifikasyonu üzerindeki etkisi incelenmiş ve JrMYB180 gibi lignin biyosentezi ile ilişkili genlerin ifade düzeyleri belirlenmiştir. Bu çalışmada da haritalama oranları çalışmamızla tutarlıdır ve elde edilen gen ifade verilerinin doğruluğunu pekiştirmektedir. Sonuç olarak, çalışmada kullanılan Bowtie2 ve RSEM yazılımlarının

ceviz genomu üzerinde gerçekleştirdiği analizler, literatürdeki diğer araştırmalarla uyumlu olup, cevizde gen ekspresyonunun detaylı bir şekilde anlaşılmasına katkı sağlamaktadır. Bu bulgular, ceviz genomik araştırmalarının güvenilirliğini artırarak, gelecekteki biyoteknolojik uygulamalar ve ıslah çalışmaları için sağlam bir temel oluşturmaktadır (Duan ve ark., 2019; Fang ve ark., 2021; Li ve ark., 2023).

Çizelge 4.22. Gen haritalama Oranının Özeti

Örnekler	Toplam Temiz Okuma Sayısı	Haritalama Yüzdesi (%)
Fernor_kontrol_1	43,249,892	81.94
Fernor_kontrol_2	42,780,280	82.51
Fernor_kontrol_3	40,020,926	82.95
Fernor_150mM_1	42,338,390	81.90
Fernor_150mM_2	43,052,446	82.02
Fernor_150mM_3	42,708,892	83.10
Serr_kontrol_1	42,791,066	82.53
Serr_kontrol_2	42,785,218	83.39
Serr_kontrol_3	43,121,970	82.88
Serr_150mM_1	43,052,076	81.40
Serr_150mM_2	42,760,798	82.03
Serr_150mM_3	36,427,096	83.34

Çalışmada, RSEM programı ile gerçekleştirilen gen ifade analizlerine göre, ceviz referans genomunda ifade edilen gen sayısının 23,101 ile 24,111 arasında değiştiği, yeni tespit edilen gen sayısının ise 1,330 ile 1,412 arasında olduğu tespit edilmiştir. Aynı şekilde, mevcut ceviz referans genomunda ifade edilen toplam transkript sayısının 37,553 ile 41,754 arasında olduğu, yeni bulunan transkript sayısının ise 8,385 ile 9,428 arasında değiştiği hesaplanmıştır (Çizelge 4.23). Bu bulgular, ceviz genomunun ifade profillerini genişletme ve yeni genetik elementleri ortaya çıkarma açısından önemli veriler sunmaktadır. Bu sonuçlar, literatürde yer alan diğer çalışmalarla kıyaslandığında oldukça tutarlı ve anlamlıdır. Fang ve ark. (2021) çalışmasında, ceviz meyvelerinin *Colletotrichum gloeosporioides* enfeksiyonuna karşı verdiği yanıtlar analiz edilmiş ve enfeksiyonun farklı aşamalarında önemli sayıda diferansiyel olarak ifade edilen gen tespit edilmiştir. Bu çalışma, enfeksiyon sürecinde bitkilerin farklı zaman dilimlerinde çeşitli genlerin nasıl farklı şekilde regüle edildiğini ortaya koymuştur. Elde edilen yeni genler ve transkriptler, bitkilerin patojenlere karşı verdiği yanıtların genetik temelini anlamak açısından büyük önem taşımaktadır (Fang ve ark., 2021). Bir diğer çalışmada, Duan ve ark. (2019) çalışmasında, cevizde GA₃ uygulamasıyla tetiklenen lignin biyosentezi üzerine yapılan analizlerde yeni gen ve transkriptler tespit edilmiştir. Bu çalışma, lignin biyosentezinde yer alan JrMYB180 gibi transkripsiyon faktörlerinin yanı sıra, fenilalanin amonyum liyaz (PAL) ve kafeik asit O-metiltransferaz (COMT) gibi enzimlerin ekspresyon seviyelerini de

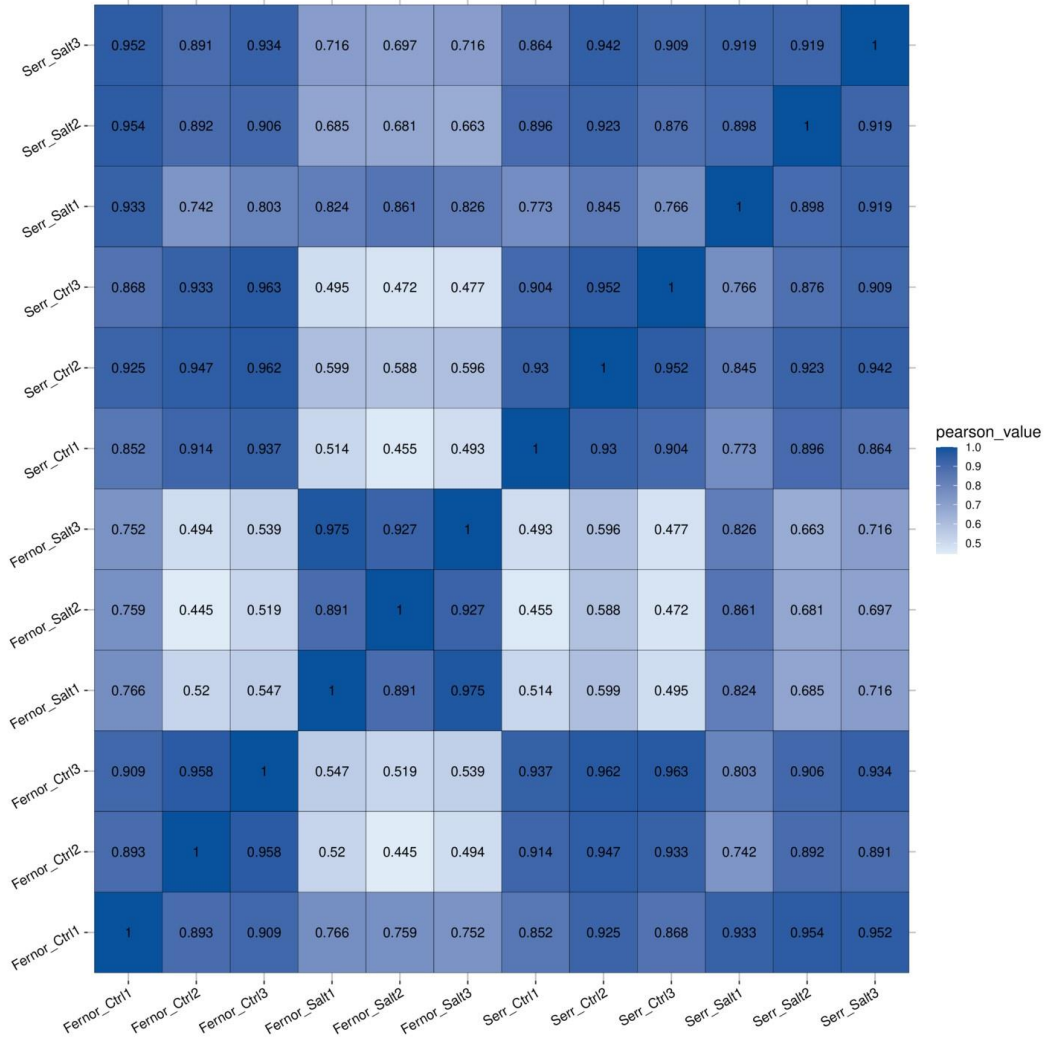
ortaya koymuştur. Bu sonuçlar, cevizdeki gen ekspresyon profillerini anlamada ve lignin biyosentezi gibi spesifik biyolojik süreçlerin moleküler mekanizmalarını çözmede önemli katkılar sağlamıştır (Li ve ark., 2023).

Çizelge 4.23. Gen ve Transkript istatistikleri

Örnekler	Toplam Gen Sayısı	Bilinen Toplam Gen Sayısı	Yeni Gen Sayısı	Toplam Transkript Sayısı	Bilinen Toplam Transkript Sayısı	Yeni Toplam Transkript Sayısı
Fernor_kontrol_1	24,964	23,597	1,367	40,803	31,537	9,266
Fernor_kontrol_2	25,005	23,612	1,393	40,515	31,359	9,156
Fernor_kontrol_3	24,501	23,126	1,375	39,502	30,554	8,948
Fernor_150mM_1	25,085	23,738	1,347	40,996	31,783	9,213
Fernor_150mM_2	25,500	24,111	1,389	41,754	32,326	9,428
Fernor_150mM_3	25,157	23,827	1,330	41,167	32,002	9,165
Serr_kontrol_1	24,438	23,101	1,337	37,553	29,168	8,385
Serr_kontrol_2	24,948	23,553	1,395	40,215	31,068	9,147
Serr_kontrol_3	24,939	23,544	1,395	40,717	31,554	9,163
Serr_150mM_1	25,006	23,594	1,412	40,841	31,499	9,342
Serr_150mM_2	24,739	23,361	1,378	39,553	30,560	8,993
Serr_150mM_3	25,133	23,730	1,403	41,039	31,788	9,251

4.3.3. Korelasyon Analizi

Çalışmada elde edilen gen ifade sonuçları arasındaki korelasyon analizlerinde, Fernor ceviz çeşidine ait tuz uygulaması yapılan birinci ve üçüncü tekerrürler arasında en yüksek korelasyon değeri 0.975 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.3). Bu yüksek korelasyon, benzer stres koşullarında uygulamaların gen ekspresyon profillerini büyük ölçüde paralel olarak etkilediğini göstermektedir. Diğer yandan, en düşük korelasyon değeri 0.445 olarak bulunmuş olup, bu durum Fernor ceviz çeşidinin kontrol grubuyla 150 mM NaCl uygulamasının gen ekspresyon profilleri arasında belirgin farklılıklar olduğunu işaret etmektedir. Bu düşük korelasyon, tuz stresinin cevizde genetik ifadeyi önemli ölçüde değiştirdiğini göstermektedir.

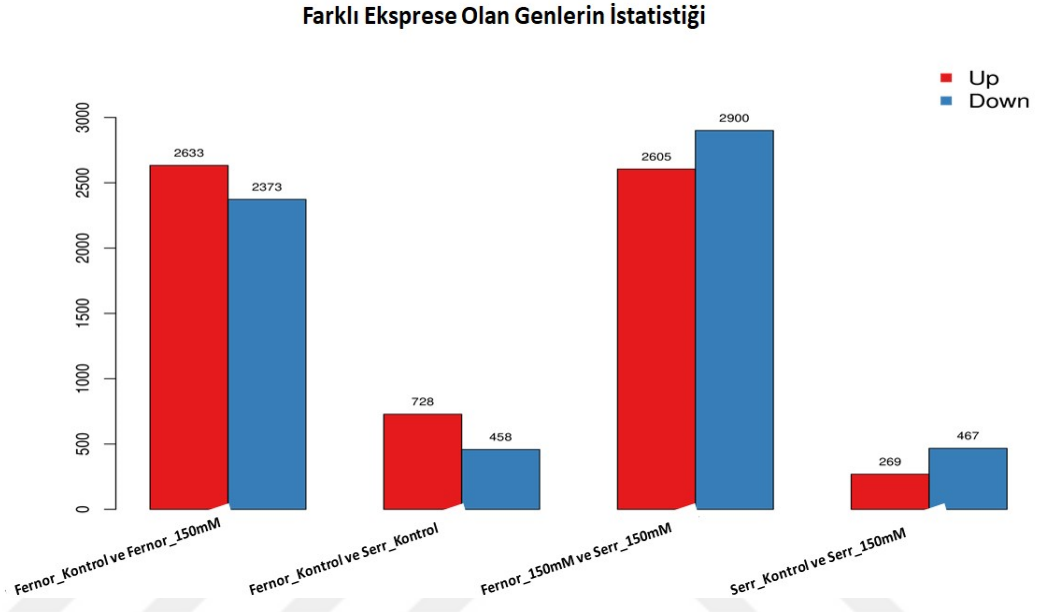


Şekil 4.3. Gen İfade Sonuçları Arasındaki Örnekler Arası Korelasyon Analizi (X ve Y eksen her bir numuneyi temsil etmektedir. Renk, korelasyon katsayısını temsil eder (koyu renk ne kadar yoğunsa, korelasyon yüksek, renk ne kadar açıksa, korelasyon o kadar düşüktür)).

4.3.4. Farklı İfade Olan Genlerin (DEG) Tespiti

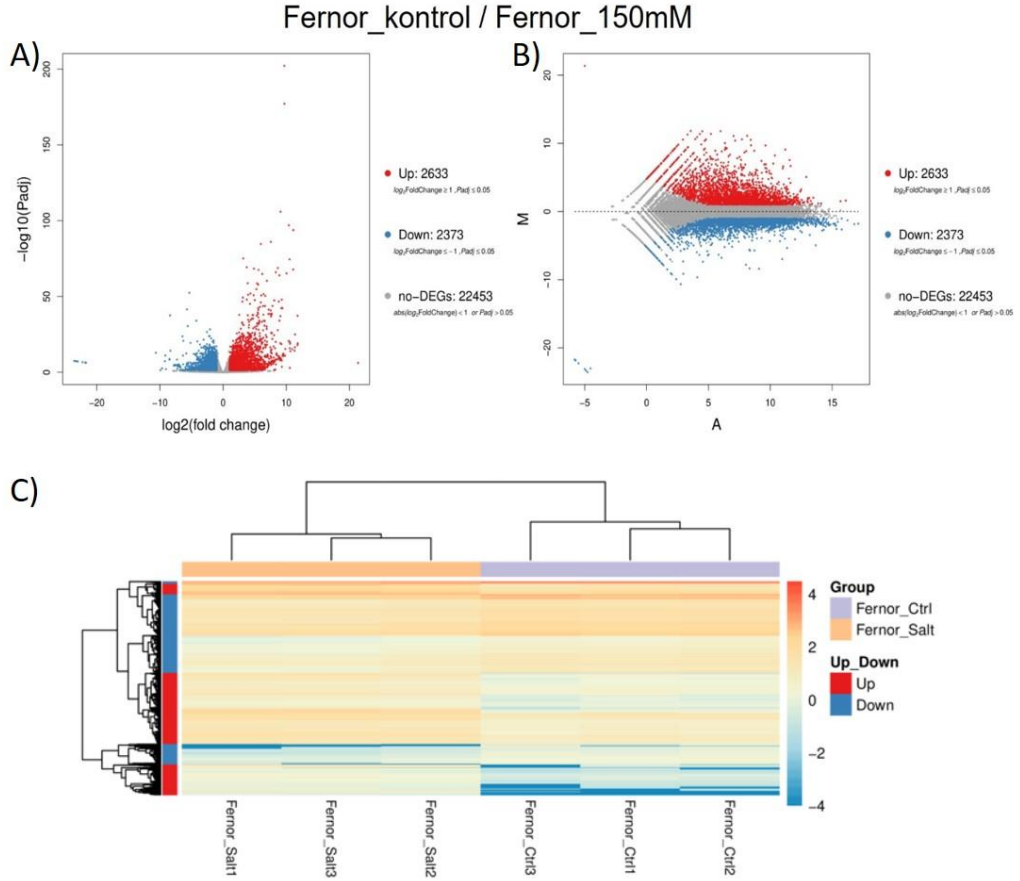
Bu çalışmada, gen ifade düzeyine dayanarak DEG tespit edilmesi amacıyla DESeq2 programı kullanılmıştır. Bu kapsamda, cevizde tuz stresine karşı hassas olan Fernor çeşidi ile toleranslı Serr çeşidi arasında kontrol ve tuz uygulama grupları karşılaştırılmıştır. Özellikle Fernor kontrol grubu ile Fernor 150mM NaCl uygulama grubu, Fernor kontrol grubu ile Serr kontrol grubu, Fernor 150mM NaCl uygulama grubu ile Serr 150mM NaCl uygulama grubu ve Serr kontrol grubu ile Serr 150mM NaCl uygulama grubu arasında karşılaştırmalar gerçekleştirilmiştir. Elde edilen DEG'ler, genlerin up-regüle (artan ifade) veya down-regüle (azalan ifade) olma durumlarına göre sınıflandırılmış ve bu sınıflandırmalar MA ve volkano plotlar aracılığıyla görselleştirilmiştir (Şekil 4.4). Bu bulgular, cevizde farklı genetik çeşitlerin çevresel streslere nasıl yanıt verdiğini anlamak açısından önemli veriler sunmaktadır. Benzer şekilde, Qinghai Platosu'nda yetişen ceviz tohumlarında yağ biyosentezine dahil olan genlerin incelendiği bir çalışmada da DESeq2 kullanılarak 119 farklı ifade edilen gen belirlenmiştir. Bu çalışma, çevresel faktörlerin cevizde gen ekspresyonunu

nasıl etkilediğini ortaya koymuştur ve elde edilen sonuçlar çalışmamızın bulgularıyla uyum göstermektedir (Shi ve ark., 2022). Çalışmada tespit edilen DEG'ler, Fernor ve Serr çeşitleri arasında tuz stresi altında genetik ve fizyolojik farklılıkların nasıl şekillendiğini ve bu çeşitlerin tuz stresine verdikleri yanıtların genetik temellerini ortaya koymaktadır. Bu da, cevizde stres toleransı geliştirmek için hedef genlerin belirlenmesine katkı sağlayacak kritik bilgiler sunmaktadır.



Şekil 4.4. Fernor_kontrol ve Fernor_150mM, Fernor_kontrol ve Serr_kontrol, Fernor_150mM ve Serr_150mM, Serr_kontrol ve Serr_150mM DEG'lerin özeti

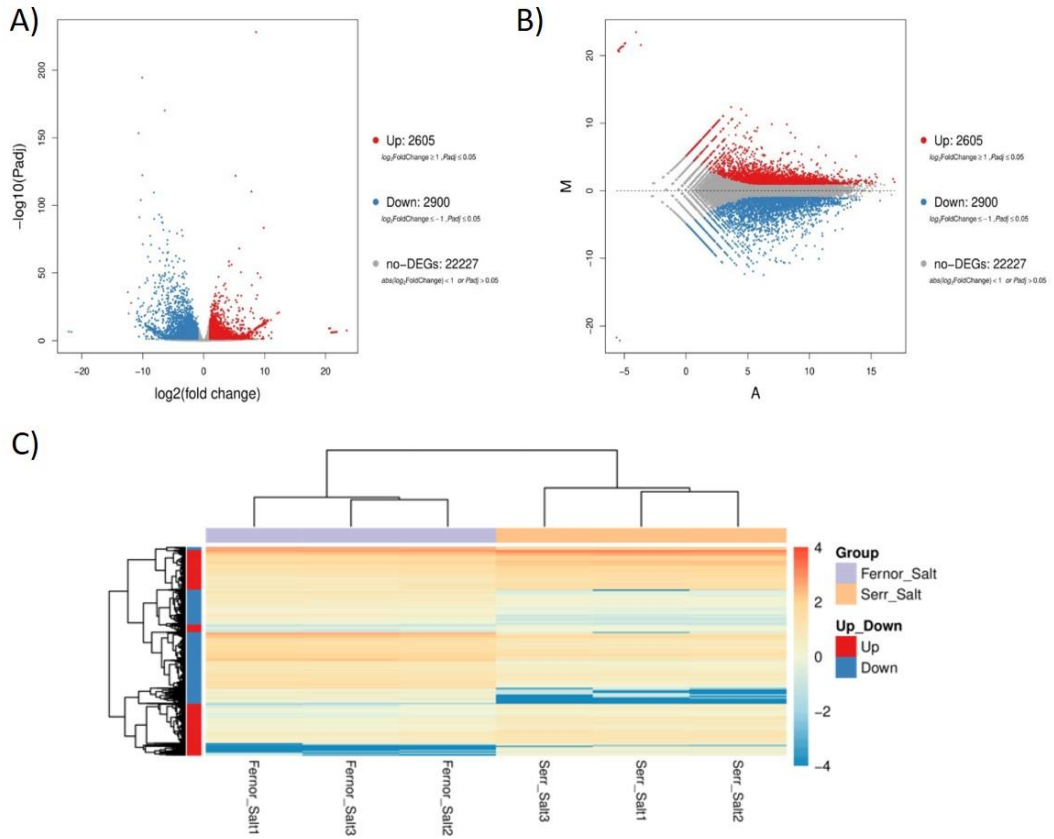
Fernor_kontrol grubu ile Fernor_150mM NaCl uygulaması yapılan RNA dizilerinde farklı ifade olan genler tespit edilmiş ve toplam 22,453 adet gen kullanılarak farklı ifade olan genler tespit edilmiştir. Karşılaştırma sonucunda tuz stresi ile bağlantılı aday 2,633 adet up-regüle ve 2,373 adet down-regüle farklı ifade seviyelerine sahip genler bulunmuştur (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Fernor_kontrol grubu ile Fernor_150mM NaCl uygulamalarına ait DEG'lerin A) Volcano plot, B) MA grafiği ve C) Heatmap

Tuzluluğa hassas Fernor_150mM grubu ile tuzluluk stresine toleranslı Serr_150mM NaCl uygulaması yapılan RNA dizilerinde farklı ifade olan genler tespit edilmiş ve toplam 22,227 adet gen karşılaştırmada kullanılmıştır. Karşılaştırma sonucunda tuz stresi ile bağlantılı aday 2,605 adet up-regüle ve 2,900 adet down-regüle farklı ifade seviyelerine sahip genler tespit edilmiştir (Şekil 4.6).

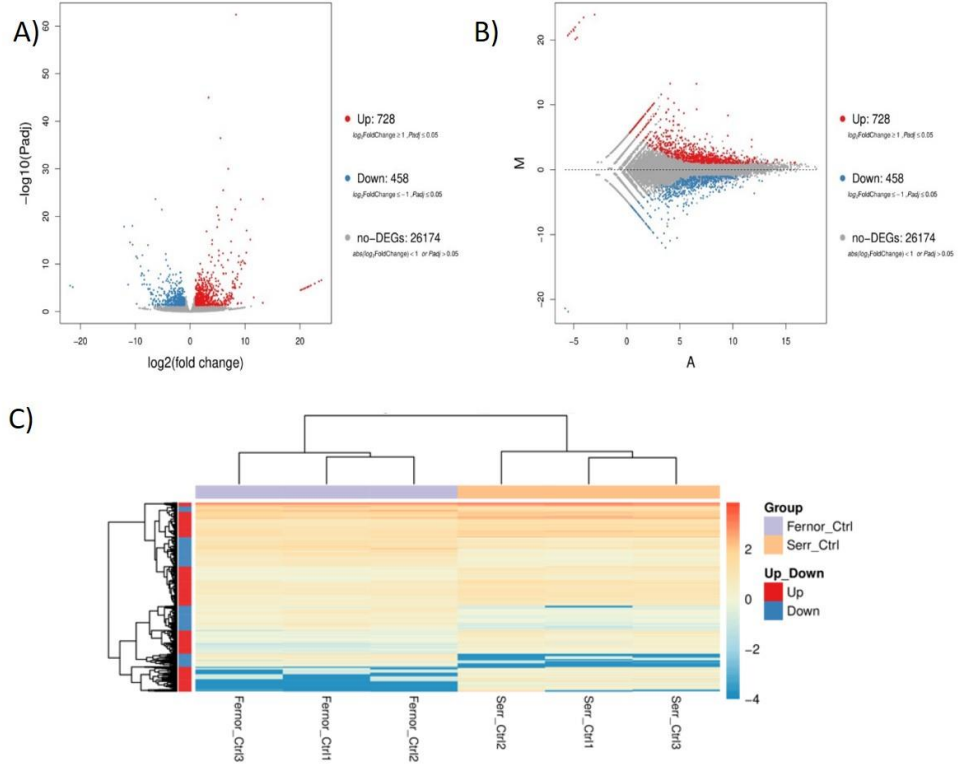
Fernor_150mM / Serr_150mM



Şekil 4.6. Fernor_150mM NaCl grubu ile Serr_150mM NaCl uygulamalarına ait DEG'lerin A) Volcano plot, B) MA grafiği ve C) Heatmap

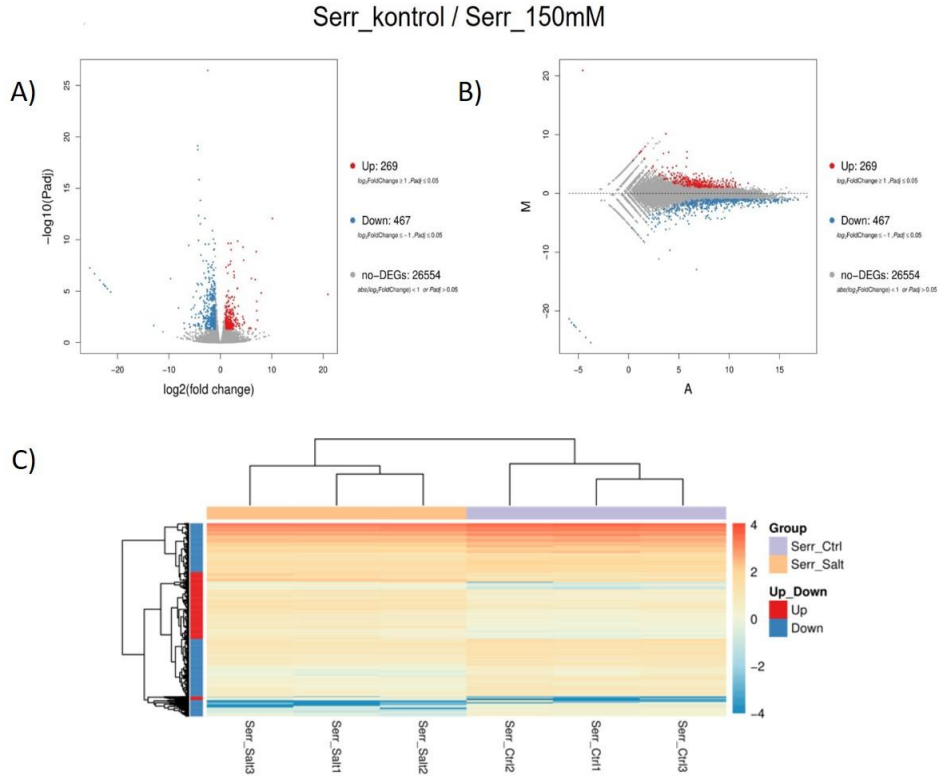
Tuzluluk stresine hassas Fernor_kontrol grubu ile tolerans Serr_kontrol uygulaması yapılan RNA dizilerinde farklı ifade olan genleri tespit edilmiş ve toplam 26,174 adet gen kullanılarak farklı ifade olan genler tespit edilmiştir. Karşılaştırma sonucunda tuz stresi ile bağlantılı aday 728 adet up-regüle ve 458 adet down-regüle farklı ifade seviyelerine sahip genler belirlenmiştir (Şekil 4.7).

Fernor_kontrol / Serr_kontrol



Şekil 4.7. Fernor_kontrol grubu ile Serr_kontrol uygulamalarına ait DEG'lerin A) Volcano plot, B) MA grafiği ve C) Heatmap

Serr_kontrol grubu ile Serr_150mM NaCl uygulaması yapılan RNA dizilerinde farklı ifade olan genleri tespit edilmiş ve toplam 26,554 adet gen karşılaştırmada kullanılmıştır. Karşılaştırma sonucunda tuz stresi ile bağlantılı aday 269 adet up-regüle ve 467 adet down-regüle farklı ifade seviyelerine sahip genler saptanmıştır (Şekil 4.8).

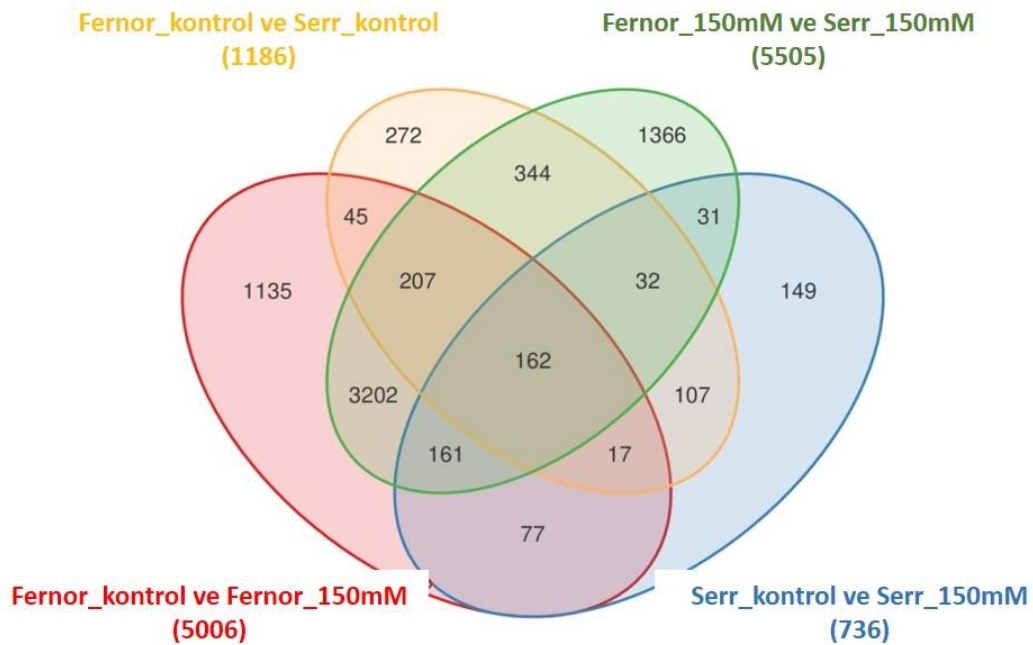


Şekil 4.8. Serr_kontrol grubu ile Serr_150mM NaCl uygulamalarına ait DEG'lerin A) Volcano plot, B) MA grafiği ve C) Heatmap

4.3.5. DEG Venn Diyagramı

Çalışmada, Fernor (hassas) ve Serr (tolerans) ceviz çeşitlerine ait DEG tespit edilmiş ve bu genlerin dağılımı Venn diyagramı (Şekil 4.10) ile görselleştirilmiştir. Gen ifade düzeylerine dayanarak yapılan karşılaştırmalarda, Fernor kontrol grubu ile Fernor 150mM NaCl uygulama grubu arasında 5,006 adet DEG, Fernor kontrol grubu ile Serr kontrol grubu arasında 1,186 adet DEG, Fernor 150mM NaCl uygulama grubu ile Serr 150mM NaCl uygulama grubu arasında 5,505 adet DEG, Serr kontrol grubu ile Serr 150mM NaCl uygulama grubu arasında ise 736 adet DEG tespit edilmiştir. Bu analizlerde, spesifik olarak Fernor kontrol ve Fernor 150mM NaCl grupları arasında 1,135 adet, Fernor kontrol ve Serr kontrol grupları arasında 272 adet, Fernor 150mM NaCl ve Serr 150mM NaCl grupları arasında 1,366 adet ve Serr kontrol ve Serr 150mM NaCl grupları arasında 149 adet gen belirlenmiştir. Tüm grupların karşılaştırılması sonucunda, dört grupta da ortak olarak farklı ifade edilen 162 gen tespit edilmiştir. Ancak, çeşide özgü ve tuzluluk stresi ile bağlantısı olmayan farklı ifade edilen genler çıkarıldığında, tuzluluk stresi ile bağlantılı olarak üç grupta ortak belirlenen DEG sayısı 161 adet olarak saptanmıştır. Bu bulgular, cevizde gen ekspresyonunun çevresel streslere nasıl yanıt verdiğini anlamada önemli bilgiler sunmaktadır. Fernor ve Serr çeşitleri arasında tespit edilen DEG'ler, çeşitlerin genetik temellerine dayanan farklı stres toleransı mekanizmalarını ortaya koymaktadır. Çalışmada elde edilen Venn diyagramları, özellikle tuzluluk stresine yanıt olarak hangi genlerin ortak veya spesifik olarak ifade edildiğini açıkça ortaya koymaktadır. Tuz stresine özgü olarak tespit edilen 161 gen, cevizde stres toleransı geliştirmek için

potansiyel hedefler olarak değerlendirilebilir. Ayrıca, bu tür DEG analizleri, cevizde stres yanıtlarının genetik çeşitlilikle nasıl bağlantılı olduğunu anlamamıza yardımcı olmakta ve bu bilgilerin ceviz ıslahında kullanılabilecek stratejilerin geliştirilmesine katkıda bulunabileceğini göstermektedir. Bu bulgular, cevizde genetik çeşitliliğin ve çevresel streslere verilen genetik yanıtların daha iyi anlaşılması için önemli bir temel oluşturmaktadır.



Şekil 4.9. DEG'lerin Venn Diyagramında İfadesi

4.3.6. Tuzluluk Stresi ile Bağlantılı Genlerin Belirlenmesi

Çalışmada, tuzluluk stresi ile bağlantılı genler Fernor ve Serr ceviz çeşitlerinde analiz edilmiştir. Fernor_kontrol ve 150mM NaCl grupları ile Serr_150mM NaCl grubu arasında yüksek ilişkili farklı ifade olan genler tespit edilmiştir (Çizelge 4.24). Gen ifade analizlerinde LOC108980683 geni Fernor_150mM (hassas) örneğinde en yüksek gen ifade değeri 23,723.5 olarak belirlenirken, aynı gen Serr_150mM (tolerans) örnek grubunda gen ifade değeri 4,532.8 olarak hesaplanmıştır. Her iki değer arasında log2FC oranı 2.39 olarak tespit edilmiştir. Aynı gen Fernor_150mM (hassas) örneğinde en yüksek gen ifade değeri 23,159 olarak tespit edilirken, aynı gen Fernor_kontrol örneğinde 5,672.7 gen ifade değeri hesaplanmıştır. Bu iki grubun log2FC değeri ise 2.03 olarak tespit edilmiştir. Özellikle LOC108980683 geni, Fernor_150mM grubunda yüksek ifade edilmiştir ve log2FC değerleri tuzluluk stresine yanıt olarak gen ekspresyonunun nasıl değiştiğini göstermiştir. Bu analizler, cevizde stres yanıtlarını anlamak için önemli bilgiler sunmaktadır.

Tuzluluk stresi ile en yüksek bağlantılı toplam 12 adet gen belirlenmiştir. Mevcut referans genomu ait gen bilgileri kullanılarak yapılan analizlerde belirlenen toplam gen sayısı 11 iken, bu çalışma ile tuzluluk stresi ile bağlantılı yeni bir (1) gen belirlenmiştir. Tespit edilen genler arasında, özellikle kromozom 1, kromozom 2, kromozom 4, kromozom 7, kromozom 10, kromozom 12, kromozom 13, kromozom 15 ve kromozom 16 üzerinde yer alan genlerin tuzluluk stresi ile bağlantılı olduğu belirlenmiştir. Diğer yandan, cevizde tuzluluk stresi ile ilişkili olarak yapılan başka bir çalışmada, TIFY gen ailesi özellikle öne çıkmıştır. Bu çalışmada, 21 TIFY geni tespit edilmiş ve bu genlerin tuzluluk gibi abiyotik stres koşullarına yanıt verdiği belirlenmiştir. TIFY genlerinin büyük bir kısmı kromozom (Chr.) 8 ve kromozom (Chr.) 16 üzerinde yer almış ve bu kromozomların stres yanıtında önemli roller oynadığı gösterilmiştir (Liu ve ark., 2022). Her iki çalışma da cevizde tuzluluk stresi ile bağlantılı genlerin belirlenmesinde önemli katkılar sağlamaktadır. Bu çalışmada LOC108980683 gibi spesifik genlerin ekspresyon analizleri yapılmışken, TIFY gen ailesi üzerine odaklanan çalışmada geniş bir gen ailesinin tuzluluk stresine yanıtı incelenmiştir. Bu iki çalışmanın bulguları, cevizde stres toleransının genetik ve moleküler mekanizmalarının daha derinlemesine anlaşılmasına katkıda bulunmakta ve bu bilgilerin, cevizde stres toleransını artırmaya yönelik stratejilerin geliştirilmesinde kritik bir rol oynayabileceğini göstermektedir.

Çizelge 4.24. Tuzluluk Stresi ile Bağlantılı Genlerin Kimliği, Adı, Kromozomdaki Yeri, Başlangıç-Bitiş Pozisyonu

Sıra no	Gen Kimliği	Gen Tanımı	Kromozom	Gen başlangıç-bitiş pozisyonu	Grup	Gen ifade değeri 1	Gen ifade değeri 2	log2FC (Gen ifade değeri 2 / Gen ifade değeri 1)	P değeri (Padj)
1	LOC108986427	XP_018814582.2//probable carotenoid cleavage dioxygenase 4, chloroplastic [Juglans regia]	2	21338136-21340442	Fernor_kontrol / Fernor_150mM	4295.2	390.3	-3.46	0.00000
					Fernor_kontrol / Serr_kontrol	3713.1	2773.0	-0.42	0.72201
					Fernor_150mM / Serr_150mM	400.1	2071.5	2.37	0.00019
					Serr_kontrol / Serr_150mM	2826.9	1806.7	-0.65	0.47337
2	LOC109012438	XP_018849614.2//probable calcium-binding protein CML29 [Juglans regia]	16	3759714-3760348	Fernor_kontrol / Fernor_150mM	4120.6	1572.0	-1.39	0.00000
					Fernor_kontrol / Serr_kontrol	3563.5	7271.6	1.03	0.20068
					Fernor_150mM / Serr_150mM	1610.6	3804.9	1.24	0.00010
					Serr_kontrol / Serr_150mM	7417.6	3313.9	-1.16	0.19900
3	LOC108980683	XP_018807229.1//probable aquaporin PIP-type 7a [Juglans regia] Turgor-responsive protein	12	30667849-30669757	Fernor_kontrol / Fernor_150mM	5672.7	23159.0	2.03	0.00000
					Fernor_kontrol / Serr_kontrol	4925.9	2624.0	-0.91	0.20096
					Fernor_150mM / Serr_150mM	23723.5	4532.8	-2.39	0.00000
					Serr_kontrol / Serr_150mM	2675.5	3951.4	0.56	0.40982
4	LOC109011669	XP_018848501.2//protein RICE SALT SENSITIVE 3-like isoform X2 [Juglans regia]	13	14970738-14973108	Fernor_kontrol / Fernor_150mM	109.5	28.5	-1.94	0.00013
					Fernor_kontrol / Serr_kontrol	95.0	114.4	0.27	0.84306
					Fernor_150mM / Serr_150mM	29.2	148.6	2.35	0.00000
					Serr_kontrol / Serr_150mM	116.6	129.6	0.15	0.98024
5	LOC108995962	transmembrane transport;/cellular potassium ion homeostasis;response to salt stress;abscisic acid-activated signaling pathway involved in stomatal movement	1	43749377-43760184	Fernor_kontrol / Fernor_150mM	208.0	524.7	1.34	0.00028
					Fernor_kontrol / Serr_kontrol	180.0	134.1	-0.42	0.79564
					Fernor_150mM / Serr_150mM	537.9	212.6	-1.34	0.00001
					Serr_kontrol / Serr_150mM	136.9	185.3	0.44	0.86644
6	LOC108990546	removal of superoxide radicals;cellular response to salt stress;cellular response to high light intensity;cellular response	4	9143361-9150781	Fernor_kontrol / Fernor_150mM	758.6	352.6	-1.11	0.00106
					Fernor_kontrol / Serr_kontrol	656.1	922.1	0.49	0.58378
					Fernor_150mM / Serr_150mM	361.2	650.0	0.85	0.00022

		to UV-B;cellular response to ozone			Serr_kontrol / Serr_150mM	940.5	567.0	-0.73	0.22492
7	LOC109021053	HSP20 family protein	10	30880848-30881712	Fernor_kontrol / Fernor_150mM	525.7	37.2	-3.82	0.01691
					Fernor_kontrol / Serr_kontrol	452.6	123.5	-1.87	0.63326
					Fernor_150mM / Serr_150mM	38.1	33.1	-0.20	0.91706
					Serr_kontrol / Serr_150mM	125.7	29.0	-2.12	0.45637
8	LOC109012163	cell redox homeostasis lipoxigenase (LOX)	15	1567708-1571449	Fernor_kontrol / Fernor_150mM	966.9	286.8	-1.75	0.00000
					Fernor_kontrol / Serr_kontrol	835.3	1466.4	0.81	0.28763
					Fernor_150mM / Serr_150mM	293.7	922.4	1.65	0.00000
					Serr_kontrol / Serr_150mM	1495.7	803.8	-0.90	0.14020
9	LOC108990701	delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthetase	4	2960257-2969563	Fernor_kontrol / Fernor_150mM	242.3	1079.0	2.15	0.00000
					Fernor_kontrol / Serr_kontrol	209.8	108.4	-0.95	0.13022
					Fernor_150mM / Serr_150mM	1105.4	186.5	-2.57	0.00004
					Serr_kontrol / Serr_150mM	110.5	162.9	0.56	0.86790
10	LOC108983523	Ethylene receptor 2	12	24169112-24175421	Fernor_kontrol / Fernor_150mM	30.5	279.5	3.19	0.00000
					Fernor_kontrol / Serr_kontrol	26.3	24.3	-0.11	0.95837
					Fernor_150mM / Serr_150mM	286.4	71.6	-2.00	0.00006
					Serr_kontrol / Serr_150mM	24.9	62.4	1.33	0.26978
11	LOC109019453	MLO-like protein 1	7	41742548-41742826	Fernor_kontrol / Fernor_150mM	870.1	349.9	-1.31	0.00123
					Fernor_kontrol / Serr_kontrol	753.3	0.4	-10.96	0.00000
					Fernor_150mM / Serr_150mM	358.6	2.4	-7.20	0.00000
					Serr_kontrol / Serr_150mM	0.4	2.1	2.45	0.88646
12	BGI_novel_G000526	GO:0001678//cellular glucose homeostasis;GO:0006096//glycolytic process K00844//hexokinase	-		Fernor_kontrol / Fernor_150mM	4.5	34.1	2.91	0.00021
					Fernor_kontrol / Serr_kontrol	3.9	5.3	0.44	0.94196
					Fernor_150mM / Serr_150mM	35.0	5.5	-2.66	0.00282
					Serr_kontrol / Serr_150mM	5.4	4.8	-0.16	0.98975

4.3.7. Tuzluluk Stresi ile Bağlantılı Genlerin Gen Ontology (GO) Analizi İle İşlevlerinin Belirlenmesi

Gen Ontology (GO), genlerin ve gen ürünlerinin işlevlerini sistematik olarak sınıflandıran bir sistemdir. Çalışmada tespit edilen genlerin GO sistematığındeki işlevleri Çizelge 4.25’de verilmiştir. RNA-Seq sonrasında tuzluluk stresiyle birlikte GO sistematığında 3 farklı (Biyolojik, Moleküler ve Hücresel Bileşenler) yapıya ait görevler incelenmiştir.

Bitkilerin pigment dengesinde “XP_018814582.2//probable carotenoid cleavage dioxygenase 4, chloroplastic [*Juglans regia*]” geni, Kalsiyum iyonunun dengelenmesinde “XP_018849614.2//probable calcium-binding protein CML29 [*Juglans regia*]” geni ve Potasyum iyonunun dengelenmesinde “transmembrane transport;cellular potassium ion homeostasis;response to salt stress;abscisic acid-activated signaling pathway involved in stomatal movement” geni görev almaktadır.

Ozmotik dengenin sağlanmasında ve stres yanıtı vermesinde sırasıyla “XP_018807229.1//probable aquaporin PIP-type 7a [*Juglans regia*] Turgor-responsive protein” geni, “XP_018848501.2//protein RICE SALT SENSITIVE 3-like isoform X2 [*Juglans regia*]” geni ve “removal of superoxide radicals;cellular response to salt stress;cellular response to high light intensity;cellular response to UV-B;cellular response to ozone” görev almaktadır. Prolin sentezinin sağlanmasında “delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthetase” geni, Etilenin artmasında “ Ethylene receptor 2” geni görev almaktadır.

Moleküler işlevlerinde Demir iyonu bağlanmasında “XP_018814582.2//probable carotenoid cleavage dioxygenase 4, chloroplastic [*Juglans regia*]” geni ve “cell redox homeostasis lipooxygenase (LOX)” geni, Kalsiyum iyonu bağlanmasında “XP_018849614.2//probable calcium-binding protein CML29 [*Juglans regia*]” geni ve “MLO-like protein 1” geni görev almaktadır. İyon ve suyun hücre içerisine taşınmasında sırasıyla “ XP_018807229.1//probable aquaporin PIP-type 7a [*Juglans regia*] Turgor-responsive protein” geni, “XP_018848501.2//protein RICE SALT SENSITIVE 3-like isoform X2 [*Juglans regia*]” geni, “transmembrane transport;cellular potassium ion homeostasis;response to salt stress;abscisic acid-activated signaling pathway involved in stomatal movement” geni ve “removal of superoxide radicals;cellular response to salt stress;cellular response to high light intensity;cellular response to UV-B;cellular response to ozone” geni görev almaktadır.

Genlerin GO sitematığına göre hücresel bileşenlerinde hücre zarı ve plazma membranında bulunan sırasıyla “XP_018807229.1//probable aquaporin PIP-type 7a [*Juglans regia*] Turgor-responsive protein” geni, “XP_018848501.2//protein RICE SALT SENSITIVE 3-like isoform X2 [*Juglans regia*]” geni, “transmembrane transport;cellular potassium ion homeostasis; response to salt stress; abscisic acid-activated signaling pathway involved in stomatal movement” geni ve “removal of superoxide radicals; cellular response to salt stress;cellular response to high light intensity;cellular response to UV-B;cellular response to ozone” yer almaktadır.

Çizelge 4.25. Gen Ontology sistematigindeki genlerin ve gen ürünlerinin işlevleri (NCBI)

Sıra No	Gen Kimliği	Gen Tanımı	Genlerin Görevi	Kegg Ortolog	Nr Protein Tanımı
1	LOC108986427	XP_018814582.2//probable carotenoid cleavage dioxygenase 4, chloroplastic [Juglans regia]	Biyolojik Süreçler: Bitki pigment biosentetik sürecinde görev alır. (GO:0016121//carotene catabolic process) Moleküler İşlevler: Demir iyonu bağlanmasında ve bitki pigment aktivitesinde görev alır. (GO:0016702//oxidoreductase activity, acting on single donors with incorporation of molecular oxygen, incorporation of two atoms of oxygen;GO:0046872//metal ion binding;GO:0010436//carotenoid dioxygenase activity) Hücresel Bileşenler: Hücrenin Kloroplast ve Plastidlerinde bulunur. (GO:0009570//chloroplast stroma;GO:0009507//chloroplast)	K09840//9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase [EC:1.13.11.51]	XP_018814582.2//probable carotenoid cleavage dioxygenase 4, chloroplastic [Juglans regia]
2	LOC109012438	XP_018849614.2//probable calcium-binding protein CML29 [Juglans regia]	Moleküler İşlevler: Kalsiyum iyonu bağlanmasında işlem görür. (GO:0005509//calcium ion binding).	K02183//calmodulin	XP_018849614.2//probable calcium-binding protein CML29 [Juglans regia]
3	LOC108980683	XP_018807229.1//probable aquaporin PIP-type 7a [Juglans regia] Turgor-responsive protein	Biyolojik Süreçler: Ozmotik dengenin sağlanmasında ve stres yanıtı vermede görev alır. (GO:0006833//water transport;GO:0009414//response to water deprivation;GO:0009409//response to cold;GO:0009651//response to salt stress;GO:0048364//root development) Moleküler İşlevler: Suyun hücre içersine taşınmasında ve su alımı aktivitesinde yer alır. (GO:0015250//water channel activity;GO:0005372//water transmembrane transporter activity;GO:0015267//channel activity) Hücresel Bileşenler: Hücre zarı ve plazma membranında bulunur. (GO:0009506//plasmodesma;GO:0016021//integral component of membrane;GO:0005886//plasma membrane;GO:0005773//vacuole)	K09872//aquaporin PIP	XP_018807229.1//probable aquaporin PIP-type 7a [Juglans regia]

4	LOC109011669	XP_018848501.2//protein RICE SALT SENSITIVE 3-like isoform X2 [<i>Juglans regia</i>]	Moleküler İşlevler: İyon ve suyun hücre içerisine taşınmasında yer alır. (GO:0016301//kinase activity)	YOK	XP_018848501.2//protein RICE SALT SENSITIVE 3-like isoform X2 [<i>Juglans regia</i>];XP_018848500.2//protein RICE SALT SENSITIVE 3-like isoform X1 [<i>Juglans regia</i>]
5	LOC108995962	transmembrane transport;/cellular potassium ion homeostasis;response to salt stress;abscisic acid-activated signaling pathway involved in stomatal movement	Biyolojik Süreçler: Hücrel potasyum iyon dengesini, suyun hücre içerisine taşınmasını, tuz stresine yanıtı ve stomatal hareketle ilgili absisik asit sinyalinin verilmesinde görev alır. (GO:0055085//transmembrane transport;GO:0030007//cellular potassium ion homeostasis;GO:0009651//response to salt stress;GO:1901527//abscisic acid-activated signaling pathway involved in stomatal movement) Moleküler İşlevler: İyon ve suyun hücre içerisine taşınmasında yer alır. (GO:0005524//ATP binding;GO:0042626//ATPase-coupled transmembrane transporter activity;GO:0008281//sulfonyleurea receptor activity;GO:0016887//ATPase activity) Hücrel Bileşenler: Hücre zarı ve plazma membranında bulunur. (GO:0016020//membrane;GO:0005774//vacuolar membrane;GO:0016021//integral component of membrane;GO:0000325//plant-type vacuole)	K05666//ATP-binding cassette, subfamily C (CFTR/MRP), member 2;K05665//ATP-binding cassette, subfamily C (CFTR/MRP), member 1 [EC:7.6.2.3]	XP_018827190.1//ABC transporter C family member 5 isoform X1 [<i>Juglans regia</i>];XP_018827191.1//ABC transporter C family member 5 isoform X2 [<i>Juglans regia</i>];KAB1208792.1//ABC transporter C family member 5 [<i>Morella rubra</i>]
6	LOC108990546	removal of superoxide radicals;cellular response to salt stress;cellular response to high light intensity;cellular response to UV-B;cellular response to ozone	Biyolojik Süreçler: Tuz stresine, UV-B ışığına, Ozon maruziyetine ve yüksek ışık şiddetine hücrel yanıt görevlerinde yer alır. (GO:0019430//removal of superoxide radicals;GO:0071472//cellular response to salt stress;GO:0071486//cellular response to high light intensity;GO:0071493//cellular response to UV-B;GO:0071457//cellular response to ozone) Moleküler İşlevler: İyon ve suyun hücre içerisine taşınmasında yer alır. (GO:0004784//superoxide dismutase activity;GO:0046872//metal ion binding;GO:0005507//copper ion binding) Hücrel Bileşenler: Hücre zarı ve plazma membranında bulunur. (GO:0005615//extracellular space;GO:0005576//extracellular region;GO:0005777//peroxisome;GO:0005773//vacuole)	K04565//superoxide dismutase, Cu-Zn family [EC:1.15.1.1]	XP_018820088.1//superoxide dismutase [Cu-Zn] 2 [<i>Juglans regia</i>]

7	LOC109021053	HSP20 family protein	Biyolojik Süreçler: Protein katlanması, hücre stres yanıtı ve ısı yanıtı verilmesi ile ilgili görevlerde bulunur. (GO:0006457//protein folding;GO:0009651//response to salt stress;GO:0042542//response to hydrogen peroxide;GO:0009408//response to heat;GO:0000302//response to reactive oxygen species;GO:0051259//protein complex oligomerization) Moleküler İşlevler: Protein bağlama ve şaperon aktivitesinde yer alır. (GO:0051082//unfolded protein binding;GO:0043621//protein self-association)	K13993//HSP20 family protein	XP_018859135.1//18.1 kDa class I heat shock protein-like [<i>Juglans regia</i>]
8	LOC109012163	cell redox homeostasis lipoxigenase (LOX)	Cell Redox Homeostasis [<i>Juglans regia</i>] Biyolojik Süreçler: Hücre savunma yanıtında ve Redoks dengelenmesinde görev alır. (GO:0045454//cell redox homeostasis) Moleküler İşlevler: Antioksidan aktivitesinde yer alır. (GO:0016209//antioxidant activity;GO:0016491//oxidoreductase activity)	K10523//speckle-type POZ protein;K15718//linoleate 9S-lipoxygenase [EC:1.13.11.58]	KAF5444614.1//hypothetical protein F2P56_033734, partial [<i>Juglans regia</i>];XP_018849222.1//uncharacterized protein LOC109012163 isoform X2 [<i>Juglans regia</i>]
9	LOC108990701	delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthetase	Biyolojik Süreçler: Prolin biyosentetik sürecinde görev alır. (GO:0055129//L-proline biosynthetic process) Moleküler İşlevler: ATP bağlama, Glutamat 5-kinaz ve Delta 1-pyrroline 5- carboxylate sentez aktivitelerinde yer alır. (GO:0005524//ATP binding;GO:0004350//glutamate-5-semialdehyde dehydrogenase activity;GO:0004349//glutamate 5-kinase activity) Hücresel Bileşenler: Sitoplazmada bulunur. (GO:0005737//cytoplasm)	K12657//delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthetase [EC:2.7.2.11 1.2.1.41]	XP_018839115.2//delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthase-like [<i>Juglans regia</i>]
10	LOC108983523	Ethylene receptor 2	Moleküler İşlevler: Etilen bağlama ve protein dimerizasyon aktivitesinde yer alır. (GO:0000155//phosphorelay sensor kinase activity;GO:0051740//ethylene binding;GO:0046872//metal ion binding;GO:0005524//ATP binding;GO:0038199//ethylene receptor activity) Hücresel Bileşenler: Endoplazmik retikulum da bulunur. (GO:0016021//integral component of membrane;GO:0005789//endoplasmic reticulum membrane)	K14509//ethylene receptor [EC:2.7.13.-]	KAB1219140.1//Ethylene receptor 2 [<i>Morella rubra</i>]

11	LOC109019453	MLO-like protein 1	YOK	K08472//mlo protein	XP_035548544.1//MLO-like protein 1 isoform X1 [<i>Juglans regia</i>];XP_035548546.1//MLO-like protein 1 isoform X3 [<i>Juglans regia</i>];XP_035548545.1//MLO-like protein 1 isoform X2 [<i>Juglans regia</i>]
12	BGI_novel_G000526	GO:0001678//cellular glucose homeostasis;GO:006096//glycolytic process K00844//hexokinase	YOK	YOK	YOK

Çizelgede yer alan genlerden; LOC108983523: Bu gen, bir etilen reseptörü olarak işlev görebilir ve etilen sinyal iletim yolunun erken aşamalarında rol oynayabilir. Bu, bitkinin stres yanıtlarını düzenlemede kritik olabilir. LOC108986427, LOC109012438, LOC108980683, LOC109011669, LOC108995962, LOC108990546, LOC109021053, LOC109012163, LOC108990701, LOC109019453: Bu genler, farklı biyolojik süreçlerde yer alan çeşitli proteinler kodlar. Bu proteinler, hücrel fonksiyonlar ve bitkinin çevresel streslere verdiği yanıtlar açısından önemlidir. Araştırmalarda, bu genlerin farklı stres koşullarında nasıl ifade edildiği ve hangi biyolojik süreçlerde yer aldığı detaylandırılmıştır. LOC108983523 ve LOC108997341 gibi genler, oksidatif stres altında önemli rol oynayan ve hücrel redoks dengesiyle ilişkili genler arasında yer alabilir.

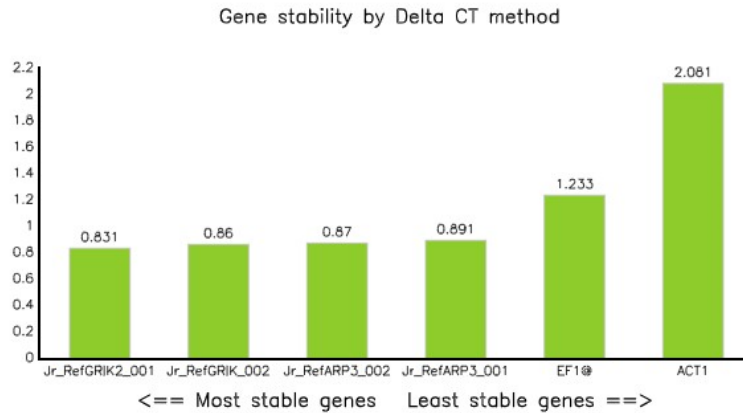
Carotenoid Cleavage Dioxygenase'ler (CCD'ler), karotenoidlerin parçalanması yoluyla bitkilerin tuz stresi altında antioksidan savunmalarını ve stres yanıtlarını düzenlemede önemli bir rol oynayan enzim ailesidir. CCD'ler; Arabidopsis (Tan ve ark., 2003), domates (Simkin ve ark., 2004), petunya (Snowden ve ark., 2005), kavun (Ibdah ve ark., 2006), pamuk (Just ve ark., 2007), mısır (Vallabhaneni ve ark., 2010), pirinç (Vallabhaneni ve ark., 2010), sorgum (Vallabhaneni ve ark., 2010), krizantem (Yoshioka ve ark., 2012), portakal (Rodrigo ve ark., 2013), üzüm (Lashbrooke ve ark., 2013), safran (Ahrazem ve ark., 2016) ve mercimek (Ates, 2018) türlerinde daha önceden tespit edilmiştir. CaM/ CML genleri; Arabidopsis, pirinç, domates, buğday ve yerfıstığı bitki türlerinde önceki araştırmacılar tarafından tespit edilmiştir (He ve ark., 2020; Liu ve ark., 2022; Yang ve ark. 2024). *Arabidopsis thaliana* genomu içerisinde yaklaşık 77 genin potasyum iyonu ile bağlantılı olduğu tespit edilmiştir (Demidchik, 2014). PIP gen ailesi *Arabidopsis thaliana* 13 adet, *Zea mays*'de 13 adet, *O. sativa*'da 11 adet ve *Populus trichocarpa*'da 14 adet gen içerdiği belirlenmiştir (Kjellbom ve ark., 1999; Vera-Estrella ve Bohnert, 2011). *Gymnocarpos przewalskii* bitkisinde yaprak dokusunda cellular reactive oxygen species (ROS) ait tuzluluk stresi altında SOD, APX ve CAT gen ailelerinden sırasıyla yedi, altı ve iki genin ifade edildiği tespit edilmiştir (Qi ve ark., 2023).

Cevizde gen ekspresyonu ve metabolik süreçlerdeki değişikliklere yönelik yapılan çalışmalardan biri olan Zhou ve ark. (2023) çalışmasında, *Phomopsis capsici* enfeksiyonuna karşı cevizin verdiği yanıtlar, RNA analizleri üzerinden incelenmiştir. RNA-seq analizleri sonucunda, toplam 272,661,616 ham okuma elde edilmiş, bu okumalardan %95.82 oranında, yani 262,331,938 temiz okuma sağlanmıştır. Temiz okuma dizileri, ceviz referans genomu ile hizalanmış ve %92.97 oranında referans genoma lokalize olmuştur. Bu yüksek kaliteli veriler, gen ekspresyonu analizleri için temel oluşturmuş ve enfeksiyona yanıt olarak DEG'ler belirlenmiştir. RNA-seq verilerine dayalı olarak, enfekte ceviz dallarında 5,634 farklı ifade edilen gen tespit edilmiştir. Bu genlerden 1,911'i yukarı regüle olmuş, 3,723'ü ise aşağı regüle olmuştur. Gen Ontology (GO) ve KEGG analizleri, bu genlerin karbonhidrat biyosentezi, selüloz metabolizması ve ribozom yapıları gibi biyolojik süreçlerde önemli roller

üstlendiğini ortaya koymuştur. Elde edilen bu sonuçlar, *P. capsici* enfeksiyonunun ceviz bitkisinin gen ekspresyonunu nasıl etkilediğini ve hangi moleküler mekanizmaların bu süreçlerde yer aldığını anlamak açısından değerli bilgiler sunmaktadır.

4.3.8. Farklı Eksprese Olan Genlerin qPCR İle Validasyonu

Fernor ceviz çeşidi tuzluluk stresine hassas, Serr ceviz çeşidi ise tuzluluk stresine toleranslıdır. Bu çalışmada, her iki çeşitte de farklı eksprese olan 12 adet gen için primer dizaynı yapılarak qPCR analizleri gerçekleştirilmiştir. Ayrıca qPCR analizlerinde kullanılmak üzere referans geni tespit etmek amacıyla ceviz RNA seq verileri kullanılarak dört adet primer tasarlanmıştır. Ek olarak, gen dizisi bilinen iki adet primer de (EF1 α ve ACT1) referans gen seçiminde kullanılmıştır. Toplam altı adet referans genin stabilite analiz sonuçları Delta CT metoduna göre incelenmiştir. Yapılan analizler sonucunda RefFinder programında referans gen olarak Jr_RefGRIK2_001 seçilmiştir (Şekil 4.11). Delta CT metoduna göre, Jr_RefGRIK2_001 en düşük stabilite değerine (0.831) sahip olup, bu genin diğer referans genlere göre daha stabil bir ekspresyon gösterdiği ve dolayısıyla qPCR analizlerinde referans gen olarak kullanılmak için en uygun olduğu belirlenmiştir. Jr_RefGRIK2_002 ve Jr_RefARP3_002 genleri de nispeten düşük stabilite değerleri ile stabil kabul edilebilir, ancak Jr_RefGRIK2_001 kadar kararlı değildir. Buna karşın, ACT1 geni en yüksek stabilite değerine (2.081) sahip olup, bu da onun en az stabil gen olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlar doğrultusunda, gen ekspresyon çalışmaları sırasında elde edilen verilerin güvenilirliğini artırmak için Jr_RefGRIK2_001 geninin referans gen olarak kullanılmıştır.



Şekil 4.10. Delta CT metodu ile gen stabilitesinin sonuçları

Tuzluluk stresi ile bağlantılı olduğu tespit edilen 12 adet gen dizileri kullanılarak qPCR analizleri için toplam 14 adet primer tasarlanmıştır. Bu tasarlanan primerlerden toplam 7 adet primerin qPCR sonuçları RNA-seq verileri ile uyumlu olmuştur (Çizelge 4.26). Ancak geri kalan 7 adet primerin gen ifade değerleri ile qPCR sonuçları uyumluluk göstermemiştir. Doğrulaması yapılan primerlerin qPCR ve RNA-seq sonuçları ile uyumluluk durumlarını gösteren grafikler her bir gen için ayrıca çizdirilmiştir. Grafiklerde tuz uygulama ve kontrol gruplarında qPCR sonucu hesaplanan $2^{\Delta\Delta CT}$ ve RNA-seq analizleri sonucunda tespit edilen gen ifade değerleri kullanılmıştır.

Çalışmada yer alan Fernor ve Serr ceviz çeşitlerine ait tuz stresine karşı yanıt veren genlerin kimlikleri ve adları Çizelge 4.26’da sunulmaktadır.

Çizelge 4.26. Genlerin Primer Listesi ve Fonksiyonel Özellikleri

Sıra No	Primer Adı	Kromozom	Gen Kimliği	Gen Tanımı
1	Jr_Salt_2.011	15	LOC109012163	cell redox homeostasis lipoxygenase (LOX)
2	Jr_Salt_2.012			
3	Jr_Salt_010	1	LOC108995962	transmembrane transport;/cellular potassium ion homeostasis;response to salt stress;abscisic acid-activated signaling pathway involved in stomatal movement
4	Jr_Salt_011	4	LOC108990546	removal of superoxide radicals;cellular response to salt stress;cellular response to high light intensity;cellular response to UV-B;cellular response to ozone
5	Jr_Salt_012			
6	Jr_Salt_013	4	LOC108990701	delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthetase
7	Jr_Salt_014			

Tuzluluk stresi ile yüksek bağlantılı cell redox homeostasis lipoxygenase (LOX) geninden tasarlanan Jr_Salt_2.011 ve Jr_Salt_2.012 primerlerin doğrulaması yapılmış, qPCR ve RNA-seq sonuçları uyumlu sonuçlar vermiştir (Şekil 4.12). Jr_Salt_2.011 primerinde kontrol gruplarında (Fernor_kontrol=966.9 ve Serr_kontrol=1495.7) gen ifade değerleri tuz uygulanan örnek gruplarından (Fernor_150mM=293.7 ve Serr_150mM=922.4) daha yüksek değerler hesaplanmıştır. Bu durum qPCR analizlerinde de benzerlik göstermiştir. Aynı genden tasarlanan bir diğer primer Jr_Salt_2.012’de ise validasyon sonuçlarında qPCR ve biyoinformatik analiz sonuçları paralellik göstermiş ve uyumlu

bulunmuştur. LOC109012163 geni hücrel redoks homeostazını düzenleyen ve lipoksigenaz (LOX) ile ilişkilendirilmiş olup kromozom 15 üzerinde yer almaktadır.

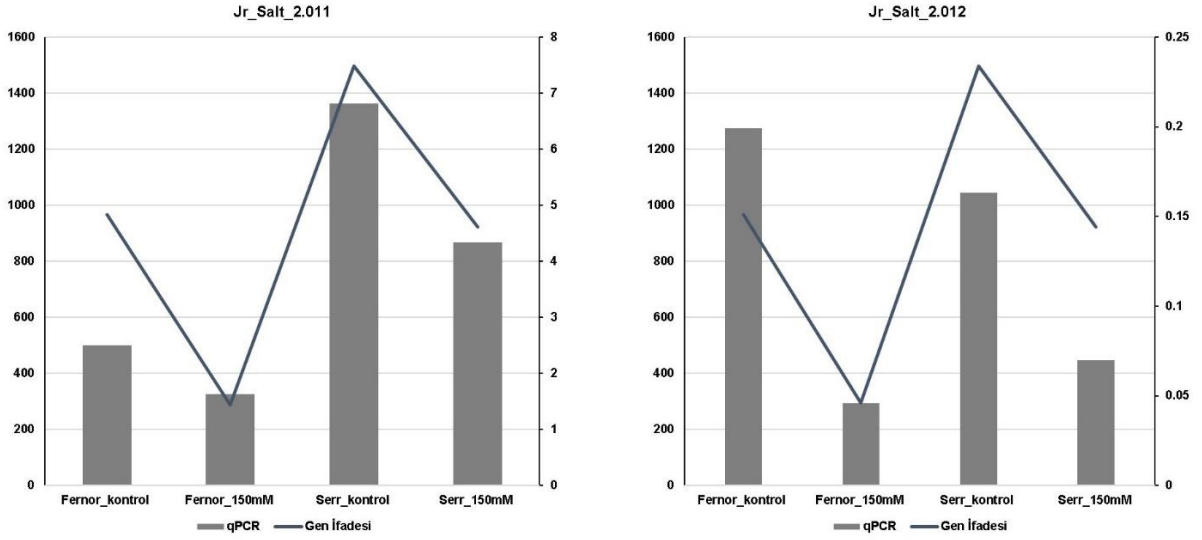
Lipoxygenase (LOX) geni, bitkilerin tuzluluk gibi çevresel stres koşulları sırasında hücrel redoks dengesini korumasında önemli bir rol oynamaktadır. Tuz stresi altında, mitokondri, kloroplast ve peroksizom gibi organellerde reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi artar. Bu durum oksidatif stres oluşturarak hücredeki proteinlere, lipitlere ve DNA'ya zarar verebilir (Mittler, 2002).

LOX geni, lipoxygenase enziminin üretimini düzenleyerek ROS seviyelerini kontrol eder ve oksidatif hasarı azaltmaya yardımcı olur (Wasternack ve Hause, 2013). Lipoxygenase, özellikle lipid peroksidasyonunu yönlendirerek ROS'un etkisiz hale getirilmesinde kritik bir rol oynar. Bu süreç, askorbat-glutasyon döngüsü gibi hücrenin antioksidan mekanizmalarıyla birlikte çalışır (Gill ve Tuteja, 2010).

Tuz stresi yaşayan bitkilerde LOX geninin aktivitesinin artması (yukarı regülasyon), bitkinin çevresel stres koşullarına uyum sağlamasında kilit bir rol oynar. Bu nedenle, LOX geni, stres toleransını artırmayı amaçlayan biyoteknolojik uygulamalarda önemli bir hedef olarak değerlendirilmektedir (Zhu, 2001).

Çalışmada, cell redox homeostasis lipoxygenase (LOX) geninin kontrol gruplarında yüksek düzeyde ifade edildiği, ancak 150 mM NaCl ile oluşturulan tuzluluk stresi altında gen ifadesinin baskılandığı tespit edilmiştir. Ali ve ark. (2024) mısır bitkisinde orta düzeyde tuzluluk stresi (100 mM NaCl) altında LOX geninin ifadesinin arttığını, ancak yüksek düzeyde tuzluluk stresinde (150 mM NaCl) bu ifadenin azaldığını gözlemlemiştir. Araştırmacılar, bu durumun, aşırı stres koşullarında enerji metabolizmasını düzenlemek için LOX gen ekspresyonunun baskılanmasını sağlayan adaptif bir mekanizma (stresli koşullarda enerji tasarrufu yapmak, hücre hasarını azaltmak veya su ve besin kullanımını optimize etmek için geliştirilen özel stratejiler) ile ilgili olabileceğini öne sürmektedir.

Benzer şekilde, Zhu ve ark. (2024), patates bitkisinde LOX gen ailesinin farklı izoformlarının tuzluluk stresine farklı tepkiler verdiğini ortaya koymuştur. Çalışmada kullanılan primerlerin, LOX gen ailesinin farklı izoformlarını hedef alması, bu izoformların çevresel koşullara özgü işlevleri nedeniyle kontrol ve stres grupları arasında gözlenen gen ekspresyonu farklılıklarını açıklayabilmektedir. Fernor ve Serr ceviz çeşitlerinin kontrol gruplarında LOX geninin yüksek seviyede ifade edilmesi, bu genin normal koşullarda temel biyolojik işlevlerde rol oynadığını göstermektedir. Ancak Fernor ve Serr ceviz çeşitlerinin stres koşullarında LOX gen ekspresyonunun azalması, aşırı reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini kontrol etmek ve hücrel dengeyi korumak için devreye giren bir negatif geri besleme mekanizmasının işlediğine işaret etmektedir. Bu bulgular, LOX gen ailesi üzerine yapılan önceki çalışmalarla uyumludur.



Şekil 4.11. Jr_Salt_2.011 ve Jr_Salt_2.012 primerlerinin qPCR ve RNA-Seq ifadesinin belirlenmesi

Tuzluluk stresi ile yüksek bağlantılı LOC108995962 geninden tasarlanan Jr_Salt_010 primerinin doğrulaması yapılmış, qPCR ve RNA-seq sonuçları uyumlu sonuçlar vermiştir (Şekil 4.13). Jr_Salt_010 primerinde kontrol gruplarında (Fernor_kontrol=1.5 ve Serr_kontrol=1.2) qPCR değerleri tuz uygulanan örnek gruplarından (Fernor_150mM=3.3 ve Serr_150mM=2.3) daha düşük değerler tespit edilmiştir. Bu durum RNA-seq sonuçlarında da benzerlik göstermiştir.

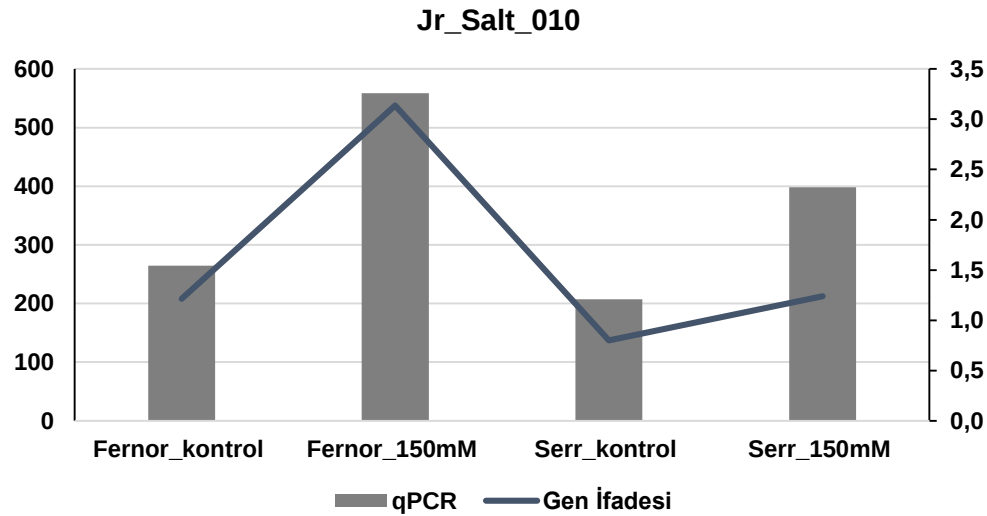
LOC108995962 geni transmembran transportu, potasyum iyon dengesini, tuz stresine yanıtı ve stomatal hareketi düzenleyen ABA-aktif sinyal yolları ile ilişkilidir ve kromozom 1'de bulunmaktadır.

Bitkilerin tuzluluk stresine karşı geliştirdiği adaptasyon mekanizmaları kapsamında iyon taşınımı, stomaların açılıp-kapanmasının düzenlenmesi ve oksidatif stres yönetimi gibi süreçlerde görev alan genlerin ekspresyon profillerinin, stres şiddetine ve genetik arka plana bağlı olarak farklılık gösterebildiği belirtilmiştir (Li ve ark., 2000; Zhang ve ark., 2006; Liu ve ark., 2022).

Liu ve ark. (2022), tuzluluk stresine karşı Na^+/K^+ dengesini düzenleyen genlerin stres toleransında kritik bir rol oynadığını vurgulamıştır. Bu bağlamda, Jr_Salt_010 primerinin ekspresyonunda gözlemlenen artış, LOC108995962 geninin bitkilerin hücresel Na^+ birikimini sınırlayarak K^+ taşınımını desteklediği ve iyon dengesini koruduğu şeklinde yorumlanabilir. Diğer bir tabirle tuzluluk stresi ile bağlantılı LOC108995962 geni 150mM tuz uygulanan örnek gruplarında kontrollere göre daha yüksek ifade değerlerine sahip olduğu görülmüştür. Bu durum tuz uygulanan örneklerde uygulama ile beraber gen aktive olmakta ve hücre içi metabolik reaksiyonların gerçekleşmesinde kilit rol oynayan iyon dengesi bu genin aktive olması ile sağlandığı belirlenmiştir. Yani tuz stresine karşı toleranslığın bu gen sayesinde gerçekleştiği sonucuna varılmıştır. Zhang ve ark. (2006) ise ABA'nın tuzluluk ve kuraklık stresine karşı bitkisel adaptasyon sağlaması hakkında önemli

bir rol oynadığını ve su kaybını sınırlandırarak stres toleransını artırdığını rapor etmiştir. Li ve ark. (2000), tuzluluk ile bağlantılı genlerin ABA ile indüklemesi sonucunda stomaların kapanmasının ve hücrel iyon taşınımının düzenlenmesinde hücrelerindeki protein kinaz enzimi ile ABA sinyal yollarını aktive ettiğine dair sonuçlar rapor etmişlerdir. Bu bağlamda, LOC108995962 geninin ABA ile ilişkili metabolik olaylara katkı sağladığı ve bitkilerin tuz stresıyla başa çıkma kapasitelerini desteklediği düşünülmektedir.

Sonuç olarak, Jr_Salt_010 primerinin 150 mM NaCl ile oluşturulan tuzluluk stresi altında her iki ceviz çeşidinde de LOC108995962 geninin aktive olduğu ve bu genin tuzluluk stresine karşı önemli bir yanıt mekanizmasında rol oynadığı anlaşılmaktadır. Bununla birlikte, Fernor ceviz çeşidinde gözlemlenen daha yüksek gen ifadesi, bu çeşidin genetik yanıt mekanizmalarında bu gene daha fazla ihtiyaç duyduğunu veya gen düzenleme süreçlerinin daha yoğun çalıştığını düşündürmektedir. Buna karşılık, Serr ceviz çeşidinde gözlemlenen daha sınırlı gen ekspresyonu, gen düzenlenmesinin daha kontrollü ve dengeli bir şekilde gerçekleştiğini işaret edebilir. Bu sonuçlar, Jr_Salt_010 primerinin tuzluluk stresine karşı çeşitler arasında farklı düzenleyici mekanizmalarla işlev gördüğünü ve bu sürecin adaptasyon stratejilerinde önemli bir genetik rol üstlendiğini ortaya koymaktadır.



Şekil 4.12. Jr_Salt_010 primerinin qPCR ve RNA-Seq ifadesinin belirlenmesi

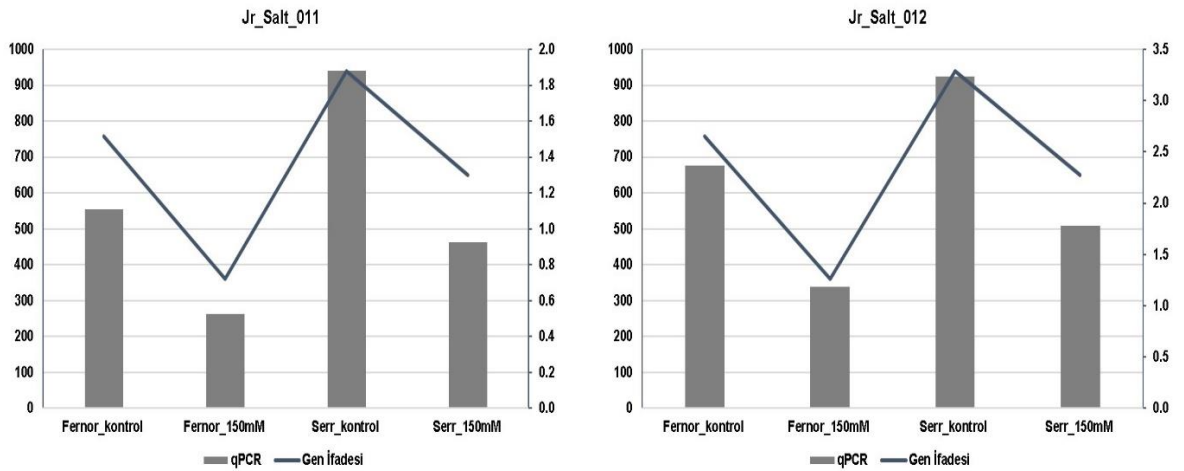
Tuzluluk stresi ile yüksek bağlantılı LOC108990546 geninden tasarlanan Jr_Salt_011 ve Jr_Salt_012 primerlerin doğrulaması yapılmış, qPCR ve RNA-seq sonuçları uyumlu sonuçlar vermiştir (Şekil 4.14). Jr_Salt_011 primerinde kontrol gruplarında (Fernor_kontrol=758.06 ve Serr_kontrol=940.5) gen ifade değerleri tuz uygulanan örnek gruplarından (Fernor_150mM=361.2 ve Serr_150mM=650) daha yüksek değerler hesaplanmıştır. Bu durum qPCR analizlerinde de benzerlik

göstermiştir. Aynı genden tasarlanan bir diğer primer Jr_Salt_012’de ise validasyon sonuçlarında qPCR ve biyoinformatik analiz sonuçları paralellik göstermiş ve uyumlu bulunmuştur. LOC108990546 geni Jr_Salt_011 ve Jr_Salt_012 primerleri, süperoksit radikallerinin uzaklaştırılması, yüksek ışık yoğunluğu, UV-B ve ozon gibi çevresel stres faktörlerine karşı hücrel yanıt mekanizmalarıyla ilişkilendirilmiştir ve kromozom 4 üzerinde yer aldığı tespit edilmiştir.

Çalışmada, tuz stresi; UV-B ışını, ozon ve yüksek ışık yoğunluğu gibi birçok abiyotik stres faktörlerinin gen ekspresyonunu baskıladığını göstermektedir. Özellikle kontrol gruplarında yüksek düzeyde ifade edilen genlerin, 150 mM NaCl uygulaması sonrasında ifadelerinde belirgin bir azalma gözlemlenmiştir.

Bu durum aşırı reaktif oksijen türleri (ROS) üretimi, enerji dağılımı ve metabolik yeniden yapılanma süreçleriyle açıklanmaktadır. Ma ve ark. (2016), orta düzeyde tuz uygulamasının olumlu etkiler yaratabileceğini, ancak yüksek düzeylerde stresin hücrel mekanizmalar üzerinde baskılayıcı bir etkisi olduğunu bildirmiştir. Benzer şekilde, Faseela ve Puthur (2018) ile Takshak ve Agrawal (2019), UV-B ışınının bitkilerde savunma metabolitlerini aktive ettiğini, ancak aşırı stres koşullarında bu savunma mekanizmalarının işlevselliğinin sınırlandığını ifade etmiştir.

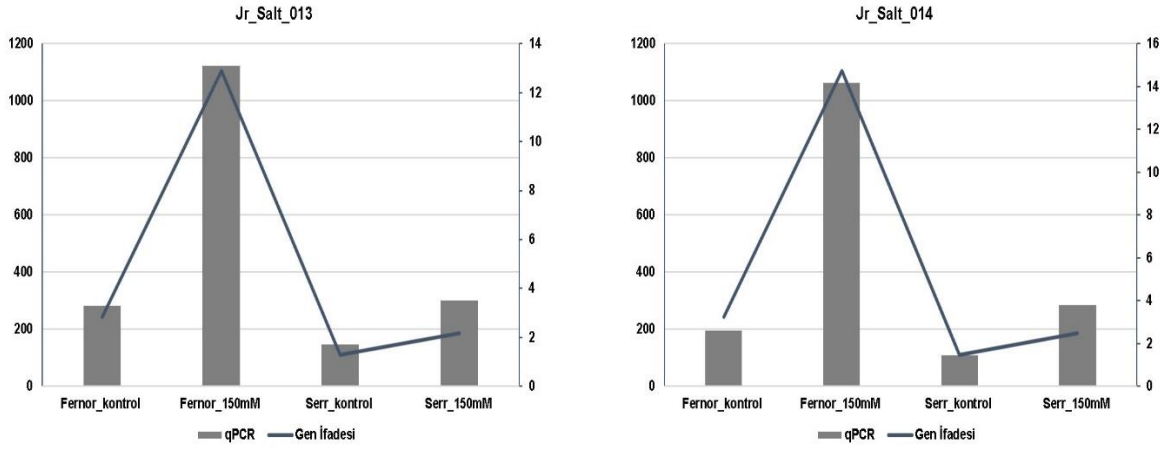
Çalışmada, Serr ve Fenor ceviz çeşitleri arasındaki farklılıkların genetik çeşitlilikten kaynaklanabileceğini ve Fenor ceviz çeşidinin stres koşullarında daha düşük bir dayanıklılık gösterdiğini ortaya koymuştur. Bu bulgular, bitkilerin stres tolerans mekanizmalarının daha iyi anlaşılmasına yönelik önemli bir katkı sağlamakta ve literatürdeki mevcut çalışmalarla tutarlılık göstermektedir.



Şekil 4.13. Jr_Salt_011 ve Jr_Salt_012 primerlerinin qPCR ve RNA-Seq ifadesinin belirlenmesi

Tuzluluk stresi ile yüksek bağlantılı delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthetase geninden tasarlanan Jr_Salt_013 ve Jr_Salt_014 primerlerin doğrulaması yapılmış, qPCR ve RNA-seq sonuçları uyumlu sonuçlar vermiştir (Şekil 4.15). Jr_Salt_013 primerinde (Fernor_kontrol=3.3ve Serr_kontrol=1.7) qPCR değerleri tuz uygulanan örnek gruplarından (Fernor_150mM=13.1 ve Serr_150mM=3.5) daha düşük değerler tespit edilmiştir. Bu durum RNA-seq sonuçlarında da benzerlik göstermiştir. Aynı genden tasarlanan bir diğer primer Jr_Salt_014’de ise validasyon sonuçlarında qPCR ve biyoinformatik analiz sonuçları paralellik göstermiş ve uyumlu bulunmuştur. Jr_Salt_013 ve Jr_Salt_014 primerlerinde LOC108990701 geni prolin biyosentezinde yer alan delta-1-pirrolin-5-karboksilat sentetaz enzimini kodlamakta olup kromozom 4 üzerinde bulunmaktadır.

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar, literatürde Delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthetase (P5CS) geninin tuzluluk stresine adaptasyondaki kritik rolünü vurgulayan bulgularla uyum göstermektedir. Fernor ceviz çeşidinde tuzluluk stresine maruz kalındığında P5CS gen ekspresyonunda ve prolin biyosentezinde oldukça yüksek bir artış gözlenmiş, bu durum bitkinin tuzluluk stresine karşılık dayanım elde etmek için adapte olduğunu göstermiştir. Bu bulgu, Çelik ve Atak (2012) tarafından soya fasulyesinde, Hu ve ark. (1992) tarafından bitki köklerinde ve Razavizadeh ve Ehsanpour (2009) tarafından transgenik bitkilerde rapor edilen P5CS aktivasyonunun prolin birikimi ve osmotik denge üzerindeki olumlu etkilerini destekler niteliktedir. Bununla birlikte, Serr ceviz çeşidinde P5CS gen ekspresyonunun sınırlı düzeyde artış göstermesi, bu çeşidin genetik yapısının stres toleransı açısından avantajlı olduğunu düşündürmektedir. Bu bulgu, Goharrizi ve ark. (2020) tarafından buğdayda ve Feng ve ark. (2022) tarafından tarımsal bitkilerde P5CS’nin genetik ve çevresel streslere adaptasyondaki farklı düzeylerdeki etkilerini açıklayan çalışmalarla örtüşmektedir. Genel olarak, bu sonuçlar P5CS geninin genetik ve fizyolojik farklılıklar nedeniyle çeşitler arasında değişkenlik gösterebileceğini ortaya koymaktadır.



Şekil 4.14. Jr_Salt_013 ve Jr_Salt_014 primerlerinin qPCR ve RNA-Seq ifadesinin belirlenmesi

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

5.1. Sonuç

Bu çalışmada, ceviz genotiplerinin tuzluluk stresine karşı morfolojik, fizyolojik ve moleküler düzeyde verdikleri tepkiler çok yönlü olarak değerlendirilmiş, stres tolerans düzeyleri arasında anlamlı farklılıkların bulunduğu ortaya konmuştur. Ceviz, toprak ve sulama suyundaki tuzluluğa karşı oldukça hassas bir tür olarak bilinmekte olup, bu durum sürdürülebilir ceviz yetiştiriciliğini tehdit etmektedir. Tuz stresine toleranslı çeşitlerin belirlenmesi, hem kimyasal müdahaleye olan ihtiyacı azaltmak hem de uzun vadeli ıslah stratejilerine yön vermek açısından büyük önem taşımaktadır. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar aşağıda maddeler halinde verilmiştir:

- 1) Araştırmanın birinci yılında, 21 farklı ceviz genotipine ait bitkiler 75, 150, 225 ve 300 mM NaCl konsantrasyonlarında tuz uygulamasına tabi tutulmuş; bitki boyu, yaprak sayısı, yaprak sıcaklığı, SPAD değeri, yaprak oransal su içeriği, kök kuru madde miktarı, görsel zarar skalası ve canlılık oranı gibi temel morfolojik ve fizyolojik parametreler izlenmiştir. Artan tuz konsantrasyonlarıyla birlikte bu parametrelerde genel bir azalma eğilimi ortaya çıkmış ve bitkisel gelişimin ciddi şekilde baskılandığı belirlenmiştir.
- 2) Çalışmanın birinci yılında genotipler arasında yapılan değerlendirmeler sonucunda, Sölez-1, Serr ve Maraş-18 çeşitlerinin yüksek tuz seviyelerine rağmen fizyolojik performanslarını büyük ölçüde koruyarak yüksek düzeyde stres toleransı sergilediği; buna karşılık Fernor, Chandler ve Hartley çeşitlerinin ise stres altında ciddi fizyolojik bozulmalar yaşadığı tespit edilmiştir. Özellikle Fernor çeşidinde 300 mM NaCl uygulamasında canlılık oranı %41'e kadar gerilemiş, bu çeşit en hassas çeşit olarak belirlenmiştir.
- 3) Araştırmanın ikinci yılında, birinci yıl çalışmaları sonucunda belirlenen altı ceviz çeşidi (Sölez-1, Serr, Maraş-18, Fernor, Chandler ve Hartley) 150 mM NaCl konsantrasyonunda tuz uygulamasına tabi tutulmuş; yaprak klorofil içeriği (SPAD), yaprak sayısı, yaprak alanı, yaprak kuru madde oranı, yaprak oransal su içeriği (RWC), yaprak su potansiyeli, yaprak ozmotik potansiyel, yaprak sıcaklığı, prolin birikimi, membran zararlanma düzeyi ile Na^+ , Cl^- , K^+ ve Ca^{2+} iyon düzeyleri gibi fizyolojik ve iyonik parametreler detaylı olarak değerlendirilmiştir. Elde edilen veriler, çeşitler arasında tuz stresine karşı anlamlı fizyolojik farkların bulunduğunu göstermiş; tuzluluğa tolerant çeşitlerde iyon birikiminin sınırlandığı, su ilişkileri ve fotosentetik performansın korunduğu, hassas çeşitlerde ise bu parametrelerde belirgin bozulmalar yaşandığı belirlenmiştir.

- 4) Çalışmanın ikinci yılında, tuzluluk stresine tolerant çeşitlerde Na^+ ve Cl^- birikiminin sınırlı kaldığını, buna karşılık K^+ ve Ca^{2+} düzeylerinin korunduğunu göstermiştir. SPAD değeri, yaprak alanı, yaprak sayısı, RWC ve su potansiyeli gibi parametreler, tolerant çeşitlerde stres koşullarında dahi yüksek seviyelerde seyretmiştir. Tuzluluğa hassas çeşitlerde ise bu değerlerde ciddi düşüşler gözlenmiş, iyonik dengenin bozulması ve fotosentetik etkinliğin azalması gibi stres belirtileri belirgin hale gelmiştir.
- 5) Moleküler düzeyde yapılan analizlerde, tolerant Serr ve hassas Fernor çeşitleri kullanılarak RNA-Seq çalışmaları gerçekleştirilmiştir. HISAT2 ve Bowtie2 yazılımları ile referans Chandler ceviz genomuna yapılan hizalamalarda ortalama haritalama oranları %91.5'in üzerinde bulunmuş, Q20 ve Q30 kalite değerlerinin sırasıyla %97.77 ve %93.05 gibi yüksek düzeylerde olması, verilerin güvenilirliğini desteklemiştir. Analizler sonucunda toplam 23,101–24,111 genin ifade edildiği ve 1,330–1,412 arasında yeni genin tanımlandığı belirlenmiştir. Ayrıca, 14,153 yeni transkript tespit edilmiş ve toplam 11,925 DEG ortaya konmuştur.
- 6) Fernor ve Serr çeşitleri arasında yapılan karşılaştırmalarda, üç stres grubunda (Fernor_Kontrol x Fernor_150mM, Serr_Kontrol x Serr_150mM ve Fernor_150mM x Serr_150mM) ortak olarak ifade edilen 161 gen tuz stresine özgü moleküler tepkilerin potansiyel belirleyicileri olarak tanımlanmıştır. Bu genler arasında LOC108980683, LOC108995962, LOC108990546 ve LOC108990701 gibi genlerin ekspresyon düzeylerindeki değişimler özellikle dikkat çekmiştir. Gen Ontology (GO) analizleri, bu genlerin iyon taşınımı, su dengesinin korunması, oksidatif stres yanıtı, prolin biyosentezi ve stomatal hareket gibi stres fizyolojisinde kritik işlevler üstlendiğini göstermiştir.
- 7) Tuzluluk stresine yanıt olarak, 12 farklı gen seçilerek bu genlere yönelik toplam 14 adet gen spesifik primer ile birlikte 4 adet referans gen primeri tasarlanmıştır. Referans genlerin stabilite analizinde Jr_RefGRIK2_001 geni en stabil referans olarak belirlenmiş ve qPCR analizlerinde bu gen kullanılmıştır. RNA-Seq sonuçlarının doğrulanması amacıyla gerçekleştirilen qPCR analizleri sonucunda 7 primerin (Jr_Salt_2.011, Jr_Salt_2.012, Jr_Salt_010, Jr_Salt_011, Jr_Salt_012, Jr_Salt_013 ve Jr_Salt_014) RNA-Seq verileriyle yüksek düzeyde uyum gösterdiği saptanmıştır. Bu doğrulama, prolin biyosentezinde görev alan LOC108990701 (P5CS), iyon taşınımı ve stomatal hareketlerin düzenlenmesinde görev alan LOC108995962, oksidatif stresin kontrolünde yer alan LOC108990546 ve lipoksigenaz (LOX) geni olan LOC109012163 gibi aday genlerin tuz stresine karşı yanıt mekanizmalarında merkezi roller üstlendiğini ortaya koymuştur.

Sonuç olarak, bu çalışma cevizde tuzluluk stresine karşılık gelişen morfolojik, fizyolojik ve moleküler tepkileri bütüncül bir şekilde ortaya koyarak, stres toleransı mekanizmalarının daha iyi anlaşılmasına katkı sağlamıştır. Elde edilen bulgular, özellikle tuz stresine duyarlılığı ile öne çıkan Fernor ve yüksek toleranslı Serr çeşitlerinin model sistemler olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Ayrıca, belirlenen aday genler ve doğrulanan primerler, cevizde tuz toleransını artırmaya yönelik moleküler ıslah çalışmaları ve biyoteknolojik uygulamalar için değerli bir genetik kaynak niteliği taşımaktadır.

5.2. Öneriler

Bu çalışmayla birlikte cevizde tuzluluk stresinin tepkilerini tanımlamada önemli bulgular sağlanmış olsa da, bu türde daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir. Gelecekteki çalışmalar için aşağıdaki öneriler sunulmaktadır:

1. Tuzluluk stresi altındaki bitkilerde sodyum ve potasyum iyonlarının taşınımını düzenleyen proteinlerin ve genlerin işlevlerinin araştırılması önemlidir. Özellikle, bu iyon dengesini sağlayan proteinlerin ve genlerin işleyişini öğrenmek, tarım için daha dayanıklı bitki türleri geliştirmemizi sağlar. Ayrıca, bu süreçte hormonlar, genetik düzenleyiciler ve diğer sinyal yollarının nasıl bir arada çalıştığını keşfetmek, bitkilerin tuza karşı verdiği tepkiyi daha iyi anlamamızı sağlar. Tuzluluk stresi altında bitkilerin iyon dengesini nasıl koruduğu üzerine daha kapsamlı araştırmalar yapılmalıdır.
2. Ceviz çeşit ve genotiplerinin farklı ekolojik ve iklimsel koşullarda tuzluluk stresine yanıtlarını inceleyen çalışmalar gereklidir. Bu, değişen ekolojik durumda bitkilerin tuzluluk stresine karşı etkilerini anlamada yardımcı olabilir. Özellikle, tuzlu topraklarda yetiştirmeye daha uygun olan ceviz çeşitlerini belirlemek, hem mevcut çeşitlerin daha verimli şekilde kullanılmasını sağlar hem de yeni dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesine olanak tanır. Bu araştırmalar, değişen iklim ve çevre koşullarına uyum sağlayacak ceviz türleri yetiştirmek için bir rehber olabilir. Bununla birlikte, ceviz üretimini sürdürülebilir hale getirmek ve iklim değişikliğine karşı daha dirençli tarım sistemleri oluşturmak mümkün olacaktır.
3. Ceviz genotiplerinin tuzluluk stresine verdiği tepkileri daha kapsamlı anlamak için stomatal iletkenlik, fotosentetik aktivite ve klorofil içeriği gibi daha fazla fizyolojik ve biyokimyasal parametre kullanılabilir.
4. Tuzluluk stresi altındaki ceviz genotiplerinde üretilen sekonder metabolitlerin (örneğin; fenolik bileşikler, flavonoidler) içeriğinin belirlenmesiyle savunma mekanizmalarını anlamada önemli bilgiler elde edilmesine olanak sağlayabilir.

5. Tuzluluk stresi altında bitki hormonlarının (örneğin; ABA, gibberellinler, sitokininler) bitki tepkilerinde oynadığı rolün araştırılması, stres sinyalizasyonunun daha iyi anlaşılmasına katkıda bulunabilir.
6. Ceviz meyvelerinin tuzluluk stresi altındaki besin değerleri ve içeriği üzerindeki etkilerini araştırmak önemlidir. Bununla birlikte tüketici alışkanlıkları ve beslenme bakımından önemli olan özelliklerin korunmasını sağlayabilir.
7. Tuzluluk stresi altında ceviz çeşit ve genotiplerinin kök sistemi üzerine de çalışma yapılmalıdır. Özellikle, farklı genotiplerin kök morfolojisi, büyüme dinamikleri ve fizyolojik özellikleri incelenerek tuzluluk koşullarında daha etkin kök yapısı geliştiren genotiplerin belirlenmesi sağlanabilir. Derin ve geniş bir kök sistemine sahip genotiplerin seçimi, topraktan su ve besin alımını optimize ederek bitkilerin stresle başa çıkma kapasitelerini artırabilir. Bunun yanı sıra, köklerin tuzluluk koşullarındaki iyon taşınımı, su iletimi ve hormonal düzenleme mekanizmalarının detaylı bir şekilde incelenmesi, tuzluluk stresine toleranslı çeşitlerin geliştirilmesine önemli katkılar sağlayabilir. Ayrıca, kök sistemi ile ilgili bu bilgiler, genetik ıslah programlarında ve stres toleransı yüksek ceviz genotiplerinin yetiştirilmesinde yol gösterici olabilir.
8. Cevizin tuzluluk stresine karşı tepkilerini ve adaptasyonunu daha iyi anlamak için yapay zeka ve makine öğrenimi algoritmalarının kullanılması, tuzluluğa dayanıklılık tahminlerinde ve büyük veri setlerinin analizinde önemli bir rol oynayabilir. Bu teknolojiler, genetik, fizyolojik ve çevresel verilerden oluşan büyük veri setlerinin işlenmesi ve analizinde etkin bir şekilde kullanılabilir. Özellikle, tuzluluk stresine dayanıklılık gösteren genotiplerin tahmini, stresle ilişkili semptomlarının tanımlanması ve genetik modellerin geliştirilmesi gibi konularda önemli bir rol oynayabilir. Ayrıca, bu yöntemlerle farklı ceviz çeşitlerinin performansı modelleme yapılarak öngörülebilir ve bölgesel yetiştiricilik stratejileri optimize edilebilir. Yapay zekâ tabanlı yaklaşımlar, hem zamandan hem de maliyetten tasarruf sağlayarak ceviz yetiştiriciliğinde daha verimli ve sürdürülebilir çözümler geliştirilmesine katkıda bulunabilir.
9. Elde edilen genetik sonuçlar, ceviz ıslah programlarına entegre edilmelidir. Tuzluluk stresine dayanıklı yeni ceviz çeşitlerinin geliştirilmesiyle birlikte tuzlu topraklarda üretimin sürdürülebilirliği sağlanabilir. Tuzluluğa dayanıklılık bakımından üstün performans gösteren ceviz genotiplerin seçilmesi ve melezleme ıslah programlarına alınması, genetik dayanıklılığı arttırmak için etkili bir yol olabilir.

10. RNA-Seq analizlerinin yüksek maliyetinden dolayı örnek sayısı sınırlı tutulmuştur. Daha uygun maliyet ve daha fazla örnek sayısı ile tuzluluk stresiyle ilişkili aday genlerin daha kapsamlı bir şekilde belirlenmesi kolaylaştırılabilir
11. Tuz stresine karşı duyarlı genotiplerin erken teşhisi için RT-qPCR gibi maliyetli yöntemlere göre agaroz jel elektroforez gibi daha az maliyetli yöntemlere uygun moleküler markörler geliştirilebilir. Bununla birlikte ceviz ıslah programlarında hızlı ve etkili bir şekilde tolerant çeşitlerin seçilmesine olanak tanıyacaktır.





KAYNAKLAR

- Acar, O., ve Demirbaş, S., 2022. Bölüm 2 Parazit Yabancı Otlarla Tarımsal Bitkiler Arasındaki Etkileşimde Antioksidan Savunma Sisteminin Rolü. Bitkilerde Abiyotik ve Biyotik, 35.
- Adish, M., Fekri, M., Hokmabadi, H., 2010. Response of Badami-Zarand Pistachio Rootstock to Salinity Stress. Int. J. Nuts Related Sci. Vol.1(1): 1-11.
- Ahrazem, O., Rubio-Moraga, A., Berman, J., Capell, T., Christou, P., Zhu, C., ve Gómez-Gómez, L., 2016. The carotenoid cleavage dioxygenase CCD 2 catalysing the synthesis of crocetin in spring crocuses and saffron is a plastidial enzyme. New Phytologist, 209(2): 650-663.
- Akca, Y., ve Sahin, U., 2022. Responses of 'Chandler' walnut variety grafted onto different rootstocks to salt stress. International Journal of Horticultural Science and Technology, 9(1): 1-13.
- Akça Y., 2001. Ceviz Yetiştiriciliği. Arı Ofset Matbaası, ISBNN: 975-97498-07.371s.
- Akça, Y., ve Samsunlu, E., 2012. The Effect of Salt Stress on Growth, Chlorophyll Content, Proline and Nutrient Accumulation, and K/Na Ratio in Walnut. Pak. J. Bot., 44(5): 1513-1520.
- Akhoundnejad, Y., Dasgan, H.Y., Aydoğan Çoban, G., 2013. Agronomical Performance of Some Drought Tolerant Melon Genotypes. Soil Water Journal, Vol 2, Number 2 (2): 1445-1448.
- Aktaş, H., 2002. Biberde Tuza Dayanıklılığın Fizyolojik Karakterizasyonu ve Kalıtımı. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana, 105 sayfa.
- Al Busaidi, K. T. S., ve Farag, K. M., 2015. The use of electrolyte leakage procedure in assessing heat and salt tolerance of Ruzaiz date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivar regenerated by tissue culture and offshoots and treatments to alleviate the stressful injury. Journal of Horticulture and Forestry, 7(4): 104-111.
- Ali, Q., Sami, A., Haider, M. Z., Ashfaq, M., ve Javed, M. A., 2024. Antioxidant production promotes defense mechanism and different gene expression level in Zea mays under abiotic stress. Scientific Reports, 14(1): 7114.
- Andersen, C.L., Jensen, J.L. ve Orntoft, T.F., 2004. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. Cancer research, 64(15): 5245–5250.
- Aras, S. ve Eşitken, A., 2019. Responses of Apple Plants to Salinity Stress. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi, 29(2): 253-257.
- Ates, D., 2018. Linkage Mapping of Carotenoid Cleavage Dioxygenase-4 Family in Lentil Genome. Turkish Journal of Field Crops, 23(2): 167-172.

- Audic, S., ve Claverie, J. M., 1997. The significance of digital gene expression profiles. *Genome research*, 7(10): 986-995.
- Avcıoğlu, R., ve Gürel, A., 2000. Bitki Fizyolojisi, Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ders Notları.
- Aydınlı, M., 2021. Armut Yetiştiriciliğinde Kullanılan Farklı Anaçların Tuzluluğa Toleranslarının Morfolojik, Fizyolojik ve Biyokimyasal Parametreler ile İncelenmesi. Doktora Tezi, Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Isparta, 294 sayfa.
- Ashraf, M. F. M. R., and Majid R. Foolad. "Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance." *Environmental and experimental botany* 59.2 (2007): 206-216.
- Bajji, M., Kinet, J. M. & Lutts, S., 2001. The use of the electrolyte leakage method for assessing cell membrane stability as a water stress tolerance test in durum wheat. *Plant Growth Regulation*, 36(1): 61-70.
- Blokhina, O., Virolainen, E. ve Fagerstedt, K. V., 2003. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of Botany*, 91(2): 179-194.
- Boyer, J.S., 1982. Plant Productivity and Environment. *Science*, 218: 443-448.
- Bressan, R.A., 2008. "Stres Fizyolojisi", Editörler: Taiz, L., Zeiger, E., Çeviri Editörü: Türkan D., "Bitki Fizyolojisi", Palme Yayıncılık, Ankara, 591-620.
- Buschmann, C., Lichtenthaler, H.K., 1998. Principles and Characteristics of Multi-Colour Fluorescence Imaging of Plants. *Journal of Plant Physiology*, 152, 297-314.
- Carvalho, A., Grac, A.C., Carocha, V., Pera, S., Lui'S Lousada, J., Lima-Brito, J. Ve Paiva, J.A.P., 2015. An Improved Total RNA Isolation from Secondary Tissues of Woody Species for Coding and Non-Coding Gene Expression Analyses. *Wood Science and Technology*, 49: 647-658.
- Çelik, Ö., ve Atak, Ç., 2012. Evaluation of proline accumulation and delta (1)-pyrroline-5-carboxylate synthetase (P5CS) gene expression during salinity stress in two soybean (*Glycine max* L. Merr.) varieties.
- Chaerle, L., Van Der Straeten, D., 2000. Imaging Techniques and the Early Detection of Plant Stress. *Trends in Plant Science*, 5, 495-501.
- Chaparzadeh, N., ve Hosseinzad-Behboud, E., 2015. Evidence for enhancement of salinity induced oxidative damages by salicylic acid in radish (*Raphanus sativus* L.). *Journal of Plant Physiology and Breeding*, 5(1): 23-33.
- Crawley, M.J., 1997. Life History and Environment. In: *Plant Ecology*. Blackwell. U.K. 73-131s.
- Daşgan, H. Y., Kuşvuran, Ş., Abak, K., and Sarı, N., 2010. Screening and saving of local vegege tarımsal araştırma enstitüsübles for their resistance todrought and salinity, UNDP Project Final Report.
- Daşgan, H.Y., Aktaş, H., Abak, K., Çakmak, İ., 2002. Determination of Screening Techniques to Salinity Tolerance in Tomatoes and Investigation of Genotype Responses. *Plant Science*, 163, 695-703.

- Daşgan, H.Y., Koç, S., 2009. Evaluation of Salt Tolerance in Common Bean Genotypes by Ion Regulation and Searching for Screening Parameters. *Journal of Food. Agriculture Environment*, 7(2): 363-372.
- Daşgan, H.Y., Kusvuran, S., Aydoner, G., Akyol, M., Akhoundnejad Y., Bol, A., Abak, K., 2012. Screening for Salinity and Drought Tolerance in Melons, *Proceedings of The Xth Eucarpia Meeting on Genetics and Breeding of Cucurbitaceae*, 497-502.
- De Hoon, M. J., Imoto, S., Nolan, J., ve Miyano, S., 2004. Open source clustering software. *Bioinformatics*, 20(9): 1453-1454.
- Deinlein, U., Stephan, A. B., Horie, T., Luo, W., Xu, G., ve Schroeder, J. I., 2014. Plant salt-tolerance mechanisms. *Trends in Plant Science*, 19(6): 371-379.
- Demidchik, V., Straltsova, D., Medvedev, S.S., et al., 2014. Stress-induced electrolyte leakage: the role of K⁺-permeable channels and involvement in programmed cell death and metabolic adjustment, *J. Exp. Bot.*, vol. 65, 1259–1270.
- Dlugokecka, E., and Kacperska-Palacz, A., 1978. Re-examination of electrical conductivity method for estimation of drought injury. *Biologia Plantarum*, 20: 262-267.
- Duan, A. Q., Feng, K., Wang, G. L., Liu, J. X., Xu, Z. S., ve Xiong, A. S., 2019. Elevated gibberellin enhances lignin accumulation in celery (*Apium graveolens* L.) leaves. *Protoplasma*, 256: 777-788.
- Fan, S., ve Blake, T. G., 1994. Absciscic acid induced electrolyte leakage in woody species with contrasting ecological requirements. *Plant Physiol*, 89: 817-823.
- Fang, H., Liu, X., Dong, Y. et al., 2021. Transcriptome and proteome analysis of walnut (*Juglans regia* L.) fruit in response to infection by *Colletotrichum gloeosporioides*. *BMC Plant Biol* 21: 249.
- FAO, 2025. Food and Agriculture Organization of the United Nations: Statistical Database. Available at: <http://www.fao.org/faostat/en/> (Erişim Tarihi: Eylül 2024)
- Faseela, P., ve Puthur, J. T., 2018. The imprints of the high light and UV-B stresses in *Oryza sativa* L. 'Kanchana' seedlings are differentially modulated. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 178: 551-559.
- Feng, X., Hu, Y., Zhang, W., Xie, R., Guan, H., Xiong, H., ... ve Lu, Y., 2022. Revisiting the role of delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthetase in drought-tolerant crop breeding. *The Crop Journal*, 10(4): 1213-1218.
- Ferreira, J.F.S., Liu, X. ve Suarez, D.L., 2019. Fruit yield and survival of five commercial strawberry cultivars under field cultivation and salinity stress. *Scientia Horticulturae* 243: 401-410.
- Flowers, T. J., ve Colmer, T. D., 2008. Salinity tolerance in halophytes. *New phytologist*, 945-963.

- Fujita, M., Fujita, Y., Noutoshi, Y., Takahashi, F., Narusaka, Y., YamaguchiShinozaki, K., ve Shinozaki, K., 2006. Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Current opinion in plant biology*, 9(4): 436-442.
- Garriga, M., Munoz, C. A., Caligari, P.D.S. ve Retamales, J.B., 2015. Effect of salt stress on genotypes of commercial (*Fragaria x ananassa*) and Chilean strawberry (*F. chiloensis*). *Scientia Horticulturae* 195: 37-47.
- Gill, S. S., ve Tuteja, N., 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant physiology and biochemistry*, 48(12): 909-930.
- Glenn, E.P., Brown, J.J., Khan, M.J., 1997. Mechanisms of Salt Tolerance in Higher Plants, Edited By Basra, A.S., and Basra, R.K., "Mechanisms of Environmental Stress Resistance in Plants", Harwood Academic Publishers, 83- 110.
- Goharrizi, K. J., Baghizadeh, A., Afroushteh, M., Amirmahani, F., ve Kermani, S. G., 2020. Effects of salinity stress on proline content and expression of $\Delta 1$ -pyrroline-5-carboxylate synthase and vacuolar-type H⁺ subunit E genes in wheat. *Plant Genetic Resources*, 18(5): 334-342.
- Gong HJ, Zhu XY, Chen KM, Wang SM, Zhang CL., 2005. Silicon alleviates oxidative damage of wheat plants in pots under drought. *Plant Science*, 169: 313-321.
- Goni, R., Garcia, P. and Foissac, S., 2009. The qPCR Data Statistical Analysis. *Integromics White Paper*, 1-9.
- Greenway, H. and R. Munns., 1980. Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes. *Annual Review of Plant Physiology*, 30: 149-190.
- Hatami, E., Shokouhian, A. A., Ghanbari, A. R., ve Naseri, L. A., 2018. Alleviating salt stress in almond rootstocks using of humic acid. *Scientia Horticulturae*, 237: 296-302.
- He X, Liu W, Li W, Liu Y, Wang W, Xie P, Kang Y, Liao L, Qian L, Liu Z., 2020. Genome-wide identification and expression analysis of CaM/CML genes in *Brassica napus* under abiotic stress. *Journal Plant Physiol.* 255: 153251.
- Hokmabadi H, Arzani K, Grierson Pf., 2005. Growth, Chemical Composition, and Carbon Isotope Discrimination of Pistachio (*Pistacia Vera L.*) Rootstock Seedling in Response to Salinity. *Aust Journal Agr. Res.* 56: 135-144.
- Hu, C. A., Delauney, A. J., ve Verma, D. P., 1992. A bifunctional enzyme ($\delta 1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase) catalyzes the first two steps in proline biosynthesis in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(19): 9354-9358.
- Ibdah, M., Azulay, Y., Portnoy, V., Wasserman, B., Bar, E., Meir, A., ... ve Lewinsohn, E., (2006). Functional characterization of CmCCD1, a carotenoid cleavage dioxygenase from melon. *Phytochemistry*, 67(15): 1579-1589.

- Javadisaber, J., 2014. Bazı Armut Anaçlarında İn Vitro Koşullarda Tuzluluk Stresi Altında Gen İfade Analizi Üzerinde Çalışmalar. Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi, Ankara, 98s.
- Jazi, M.M., Seyedi, S.M., Ebrahimie, E., Ebrahimi, M., Moro, G.D. ve Botanga, C., 2017. A genome-wide transcriptome map of pistachio (*Pistacia vera* L.) provides novel insights into salinity-related genes and marker discovery. BMC genomics 18: 1-21.
- Ji, X., Tang, J., ve Zhang, J., 2022a. Effects of Salt Stress on the Morphology, Growth and Physiological Parameters of *Juglans microcarpa* L. Seedlings. Plants, 11(18): 2381.
- Ji, X., Tang, J., Fan, W., Li, B., Bai, Y., He, J., ... ve Zhang, J., 2022b. Phenotypic differences and physiological responses of salt resistance of walnut with four rootstock types. Plants, 11(12): 1557.
- Johnson, C.M. ve Ulrich, A., 1959. 2. Analytical Methods For Use in Plant Analysis. California Agricultural Experiment Station. Bull. 78s.
- Jones, R. A., ve Qualset, C. O., 1984. Breeding crops for environmental stress tolerance. In Applications of genetic engineering to crop improvement, Dordrecht: Springer, 305-340.
- Jones, R.A., 1986. The development of salt-tolerant tomatoes: Breeding strategies. Acta Horticulturae, 190: 101-114.
- Just, B. J., Santos, C. A. F., Fonseca, M. E. N., Boiteux, L. S., Oloizia, B. B., ve Simon, P. W., 2007. Carotenoid biosynthesis structural genes in carrot (*Daucus carota*): isolation, sequence-characterization, single nucleotide polymorphism (SNP) markers and genome mapping. Theoretical and Applied Genetics, 114: 693-704.
- Kadioglu, I., ve Yanar, Y., 2004. Allelopathic effects of plant extracts against seed germination of some weeds. Asian Journal of Plant Sciences, 3(4): 472-475.
- Kamiab, F., Talaie, A., Javanshah, A., Khezri, M., ve Khalighi, A., 2012. Effect of Long-Term Salinity on Growth, Chemical Composition and Mineral Elements of Pistachio (*Pistacia vera* cv. Badami-Zarand) Rootstock Seedlings. Annals of Biological Research, 3: 5545-5551.
- Kanehisa, M., Araki, M., Goto, S., Hattori, M., Hirakawa, M., Itoh, M., ... ve Yamanishi, Y., 2007. KEGG for linking genomes to life and the environment. Nucleic acids research, 36: 480-484.
- Karanlık, S., 2001. Değişik Buğday Genotiplerinde Tuz Stresine Dayanıklılık ve Dayanıklılığın Fizyolojik Nedenlerinin Araştırılması. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana, 123 s.
- Karimi, S., Karami, H., Bidgoli, A.M., Tavallali, V., ve Vahdati, K., 2018. Inducing drought tolerance in greenhouse grown *Juglans regia* by imposing controlled salt stress: The role of osmotic adjustment. Scientia Horticulturae 239: 181-192.

- Karimi, S., Rahemi, M., Maftoun, M., Eshghi, E., ve Tavallali, V., (2009). Effects of long-term salinity on growth and performance of two pistachio (*Pistacia L.*) rootstocks. *Australian Journal of Sci*, 3(3): 1630-1639.
- Karipçin, M. Z., 2009. Yerli ve Yabancı Karpuz Genotiplerinde Kuraklığa Toleransın Belirlenmesi. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana, 259 s.
- Kaşka, N., Sütyemez, M., 2001. Bazı yerli ve yabancı ceviz (*Juglans regia L.*) çeşitlerinin farklı ekolojilere uyumları üretim ve pazarlama sorunlarının belirlenmesi üzerine araştırmalar. Türkiye I. Ulusal Ceviz Sempozyumu, Tokat.
- Kjellbom, P., Larsson, C., Johansson, I., Karlsson, M., ve Johanson, U., 1999. Aquaporins and water homeostasis in plants. *Trends in Plant Science*, 4(8): 308-314.
- Kim, D., Langmead, B., ve Hisat, S. S., 2015. A fast spliced aligner with low memory requirements. *Nat Methods* 12: 357-360.
- Kong, L., Zhang, Y., Ye, Z. Q., Liu, X. Q., Zhao, S. Q., Wei, L., ve Gao, G., 2007. CPC: assess the protein-coding potential of transcripts using sequence features and support vector machine. *Nucleic acids research*, 35: 345-349.
- Kumari, G.J., Kumar, S.G., Thippeswamy, M., Annapurnadevi, A., Naik, S.T. ve Sudhakar, C., 2007. Effect of salinity on growth and proteomic changes in two cultivars of mulberry (*Morus alba L.*) with contrasting salt tolerance. *Indian Journal of Biotechnology* Vol 6: 508-518.
- Kusvuran, S., Dasgan, H.Y., Abak, K., Aydoğan, G., 2011. Determination of Salt Tolerance Levels Of Melon Genotypes. *Acta Hort. (Ishs)* 918: 777-783.
- Kuşvuran, Ş., 2010. Kavunlarda Kuraklık ve Tuzluluğa Toleransın Fizyolojik Mekanizmaları Arasındaki Bağlantılar. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana, 356 sayfa.
- Küçükyumruk, C., Yıldız, H., Küçükyumruk, Z. ve Ünlükara, A., 2015. Responses of ‘0900 Ziraat’ Sweet Cherry Variety Grafted on Different Rootstocks to Salt Stress. *Not Bot Horti Agrobi*, 2015, 43(1): 214-221.
- Langmead, B., ve Salzberg, S. L., 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature methods*, 9(4): 357-359.
- Lashbrooke, J. G., Young, P. R., Dockrall, S. J., Vasanth, K., ve Vivier, M. A., 2013. Functional characterisation of three members of the *Vitis vinifera L.* carotenoid cleavage dioxygenase gene family. *BMC plant biology*, 13: 1-17.
- Lewitt, J. 1980. Responses of plants to environmental stress. Academic Press. New York 489-530.
- Liu, Z., Ma, C., Hou, L., Wu, X., Wang, D., Zhang, L., ve Liu, P., 2022. Exogenous SA affects rice seed germination under salt stress by regulating Na⁺/K⁺ balance and endogenous GAs and ABA homeostasis. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(6): 3293.

- Liu, Y., Zhao, H., Cui, M., Wang, T., Gao, X., ve Yang, G., 2020. Cloning and Stress Response of The Jrf2- 2 Gene From *Juglans regia*. *Journal Of Nanjing Forestry University*, 44(3): 58.
- Li, J., Wang, X. Q., Watson, M. B., ve Assmann, S. M., 2000. Regulation of abscisic acid-induced stomatal closure and anion channels by guard cell AAPK kinase. *Science*, 287(5451): 300-303.
- Li, H., Dai, S., Zhang, W., Liu, Z., Song, Y., Zheng, Y., ve Xu, M., 2023. Transcriptome analysis of walnut (*Juglans regia* L.) fruit reveals the function of JrMYB180 in GA3-induced endocarp lignification. *Plant Growth Regulation*, 100(3): 647-655.
- Li, B., ve Dewey, C. N., 2011. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC bioinformatics*, 12: 1-16.
- Li, H., Lin, J., Yang, Q.S., Li, X. G. Ve Chang, Y.H., 2017. Comprehensive analysis of differentially expressed genes under salt stress in pear (*Pyrus betulaefolia*) using RNA-Seq. *Plant Growth Regul*, 82: 409-420.
- Li, R., Shi, F. ve Fukuda, K., 2010. Interactive effects of various salt and alkali stresses on growth, organic solutes, and cation accumulation in a halophyte *Spartina alterniflora* (Poaceae). *Environmental and Experimental Botany*, 68(1): 66-74.
- Li, X., Li, M., Zhou, B., Yang, Y., Wei, Q. ve Zhang, J., 2019. Transcriptome analysis provides insights into the stress response crosstalk in apple (*Malus × domestica*) subjected to drought, cold and high salinity. *Scientific Reports*, 9: 9071.
- Liu, X., Yu, F., Yang, G., Liu, X., ve Peng, S., 2022. Identification of TIFY gene family in walnut and analysis of its expression under abiotic stresses. *BMC genomics*, 23(1): 190.
- Liu Y, Chen W, Liu L, Su Y, Li Y, Jia W, Jiao B, Wang J, Yang F, Dong F., 2022. Genome-wide identification and expression analysis of calmodulin and calmodulin-like genes in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant signaling and behavior*, 17(1): 2013646
- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*, 25: 402-408.
- Lotfi, N., Vahdati, K., Kholdebarin, B., Hassani, D., ve Amiri, R., 2009b. Mineral Composition of Some Walnut Cultivars (*Juglans regia* L.) for Evaluation of Ionome and Ionomics under Salt Stress Condition. *Acta Hort*. 839.
- Lotfi, N., Vahdati, K., Kholdebarin, B., ve Ashrafi, E.N., 2009a. Germination, Mineral Composition, and Ion Uptake in Walnut Under Salinity Conditions. *Hort Science* 44(5): 1352-1357.
- Love, M. I., Huber, W., ve Anders, S., 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome biology*, 15: 1-21.

- Ma, X., Ou, Y. B., Gao, Y. F., Lutts, S., Li, T. T., Wang, Y., ... ve Yao, Y. A., 2016. Moderate salt treatment alleviates ultraviolet-B radiation caused impairment in poplar plants. *Scientific reports*, 6(1): 32890.
- Ma, Y., Xue, H., Zhang, F., Jiang, Q., Yang, S., Yue, P., ... ve Zhang, Z., 2021. The miR156/SPL module regulates apple salt stress tolerance by activating MdWRKY100 expression. *Plant Biotechnology Journal*, 19(2): 311-323.
- Mahouachi, J., 2018. Long-term salt stress influence on vegetative growth and foliar nutrient changes in mango (*Mangifera Indica* L.) seedlings. *Scientia Horticulturae* 234: 95-100.
- Mane, A. V., Deshpande, T. V., Wagh, V. B., Karadge, B., ve Samant, J. S., 2011. A critical review on physiological changes associated with reference to salinity. *International Journal of Environmental Sciences*, 1(6): 1192.
- Marschner, H. 1995. Mineral nutrition of higher plants. Academic Pres, 657-680.
- Matsumoto, K., Tamura, F., Chun, J.P. ve Tanabe, K., 2006. Native Mediterranean Pyrus Rootstock, P. amygdaliformis and P. elaeagrifolia, Present Higher Tolerance to Salinity Stress Compared with Asian Natives. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 75 (6): 450–457.
- Mehdi, H., Chelli-Caabouni, A., Boujnah, D., Boukhris, M., 2010. The Response of Young Pictachio Trees Grown Under Saline Conditions Depends on The Rootstock, 261-265.
- Mistry, J., Finn, R. D., Eddy, S. R., Bateman, A., ve Punta, M., 2013. Challenges in homology search: HMMER3 and convergent evolution of coiled-coil regions. *Nucleic acids research*, 41(12): 121-121.
- Mittler, R., 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in plant science*, 7(9): 405-410.
- Momenpour, A., Bakhshi, D., Imani, A., & Rezaie, H., 2015. Effect of salinity stress on growth characteristics and concentrations of nutrition elements in almond'Shahrood 12','Touno'cultivars and'1-16'genotype budded on GF677 rootstock. *Journal of Crops Improvement*, 17(1).
- Munns, R., James, R. A., ve Läuchli, A., 2006. Approaches to increasing the salt tolerance of wheat and other cereals. *Journal of experimental botany*, 57(5): 1025-1043.
- Munns, R., ve Tester, M., 2008. Mechanisms of salinity tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 59: 651-681.
- Munns, R.,ve Termaat, A., 1986. Whole-plant responses to salinity. *Aust. J. Plant Physiol.*, 13: 143-160.
- Oraei, M., Tabatabaie, S. J., ve Fallahi, E., 2010. The effects of salinity stress and rootstock on the growth, photosynthetic rate, nutrient and sodium concentrations of almond (*Prunus dulcis* Mill.). *Journal of Horticultural Science*, 23(2).
- Ozsolak, F., ve Milos, P. M., 2011. RNA sequencing: advances, challenges and opportunities. *Nature reviews genetics*, 12(2): 87-98.

- Pal, M., Singh, D.K., Rao L.S., ve Singh, K.P., 2004. Indian J. Plant Physiol, 9: 407-412.
- Parsa, A.A., ve Karimian, N., 1975. Effect of Sodium Chloride on Seedling Growth of Two Major Varieties of Iranian Pistachio (*P. Vera L.*). J. Hort. Sci., 50: 41-46.
- Pertea, M., Pertea, G. M., Antonescu, C. M., Chang, T. C., Mendell, J. T., ve Salzberg, S. L., 2015. StringTie enables improved reconstruction of a transcriptome from RNA-seq reads. Nature biotechnology, 33(3): 290-295.
- Pfaff, M.W., Tichopad, A., Prgomet, C. ve Neuvians, T.P., 2004. Determination of Stable Housekeeping Genes, Differentially Regulated Target Genes and Sample Integrity, Bestkeeper-Excel-Based Tool using Pair-Wise Correlations. Biotechnology Letters, 26:509–515.
- Qi, J., Luo, Y., Huang, H., Lu, S., Zhao, F., Deng, Z., ve Qiu, Y., 2023. Molecular Mechanism of Response and Adaptation of Antioxidant Enzyme System to Salt Stress in Leaves of *Gymnocarpos przewalskii*. Plants, 12(19): 3370.
- Qin, Y., Yu, H., Cheng, S., Liu, Z., Yu, C., Zhang, X., ... ve Gong, X., 2022. Genome-wide analysis of the WRKY gene family in *Malus domestica* and the role of MdWRKY70L in response to drought and salt stresses. Genes, 13(6): 1068.
- Radwan, O., Arro, J., Keller, C. Ve Korban, S.S., 2015. RNA-Seq Transcriptome Analysis in Date Palm Suggests Multi-Dimensional Responses to Salinity Stress. Tropical Plant Biol. 8:74–86.
- Ranjbar, A., Damme, P. V., Samson, R., ve Lemeur, R. (2002). Leaf water status and photosynthetic gas exchange of *Pistacia khinjuk* and *P. mutica* exposed to osmotic drought stress. Acta Horticulturae, 591: 423-428.
- Razavizadeh, R., ve Ehsanpour, A., 2009. Effects of salt stress on proline content, expression of delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthetase, and activities of catalase and ascorbate peroxidase in transgenic tobacco plants. Biological Letters, 46(2): 63-75.
- Rio, D. C., 2014. Reverse transcription–polymerase chain reaction. Cold Spring Harbor Protocols, (11), pdb-prot080887.
- Rodrigo, M. J., Alquézar, B., Alós, E., Medina, V., Carmona, L., Bruno, M., ... ve Zacarías, L., 2013. A novel carotenoid cleavage activity involved in the biosynthesis of Citrus fruit-specific apocarotenoid pigments. Journal of experimental botany, 64(14): 4461-4478.
- Romero-Aranda, R., Moya, J. L., Tadeo, F. R., Legaz, F., Primo-Millo, E., ve Talón, M., 1998. Physiological and anatomical disturbances induced by chloride salts in sensitive and tolerant citrus: beneficial and detrimental effects of cations. Plant, cell & environment, 21(12), 1243-1253.

- Saadamand, A.R., Banihashemi, Z., Maftoun, M. ve Sepaskhah, A.R., 2007. Interactive Effect of Soil Salinity and Water Stress on Growth and Chemical Compositions of Pistachio Nut Tree, *Journal Of Plant Nutrition*, 30:12, 2037-2050.
- Sánchez, F. J., Andres, E. F., Tenorio, J. L. and Ayerbe, L., 2004. Growth of epicotyls, turgor maintenance and osmotic adjustment in pea plants (*Pisum sativum* L.) subjected to water stress, *Field Crops Research*, 86: 81-90.
- Shah, S. S., Mohammad, F. I. D. A., Shafi, M., Bakht, J. E. H. A. N., ve Zhou, W. E. I. J. U. N., 2011. Effects of cadmium and salinity on growth and photosynthesis parameters of Brassica species. *Pakistan Journal of Botany*, 43(1): 333-340.
- Shi, W., Zhang, D., & Ma, Z., 2022. Transcriptome analysis of genes involved in fatty acid and lipid biosynthesis in developing walnut (*Juglans regia* L.) seed kernels from Qinghai Plateau. *Plants*, 11(23): 3207.
- Shkolnik-Inbar, D., ve Bar-Zvi, D., 2010. ABI4 mediates abscisic acid and cytokinin inhibition of lateral root formation by reducing polar auxin transport in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 22(11): 3560-3573.
- Silver, N., Best, S., Jiang, J. and Thein, S.L., 2006. Selection of Housekeeping Genes for Gene Expression Studies in Human Reticulocytes Using Real- Time PCR. *BMC Molecular Biology*, 7:33.
- Simkin, A. J., Schwartz, S. H., Auldrige, M., Taylor, M. G., & Klee, H. J., 2004. The tomato carotenoid cleavage dioxygenase 1 genes contribute to the formation of the flavor volatiles β -ionone, pseudoionone, and geranylacetone. *The Plant Journal*, 40(6): 882-892.
- Singh, S., Shyamal, S., ve Panda, A. C., 2022. Detecting RNA–RNA interactome. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 13(5): 1715s.
- Snowden, K. C., Simkin, A. J., Janssen, B. J., Templeton, K. R., Loucas, H. M., Simons, J. L., ... ve Klee, H. J., 2005. The Decreased apical dominance1/*Petunia hybrida* CAROTENOID CLEAVAGE DIOXYGENASE8 gene affects branch production and plays a role in leaf senescence, root growth, and flower development. *The Plant Cell*, 17(3), 746-759.
- Spiegel-Roy, P., Mazigh, D. and Evenari, M., 1997. Responses of Pistachio to Low Soil Moisture Condition. *Journal of Ameri Society of Horticultural. Science*, 102: 470-473.
- Şahin, U., 2018. Bazı ceviz anaçlarının tuz stresine tolerans düzeylerinin karşılaştırılması. Yüksek lisan tezi, GaziOsmanPaşa Üniversitesi, Tokat, 88s.
- Şen, M. S., Karadeniz, T., Beyhan, Ö., 2011. Sorularla Ceviz Yetiştiriciliği. ÜÇM yayıncılık ISBN: 978-605-89150-3-9, 208s.

- Şen, M.S., 1986. Karadeniz, T., Beyhan, Ö., 2011. Sorularla Ceviz Yetiştiriciliği. Başak Matbaacılık, 208s.
- Şimşek, H., Akça, Y., Ünlükara, A. ve Çekiç, Ç., 2017. Şebin Ceviz Çeşidinin Stres Koşullarına Dayanımının Belirlenmesi. Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, ISSN:34 (Ek Sayı), 141-150
- Taarit, M., Msaada, K., Hosni, K. ve Marzouk, B., 2010. Changes in fatty acid and essential oil composition of sage (*Salvia officinalis* L.) leaves under NaCl stress. *Food Chemistry*, 119(3): 951-956.
- Taiz, L., ve Zeiger, E., 2002. Plant Physiology, Chapter 25 of plant Physiology, 602-611.
- Talaat, N. B., Ghoniem, A. E., Abdelhamid, M. T. ve Shawky, B. T., 2015. Effective microorganisms improve growth performance, alter nutrients acquisition and induce compatible solutes accumulation in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants subjected to salinity stress. *Plant Growth Regulation*, 75(1): 281-295.
- Tan, B. C., L. M. Joseph, W. T. Deng, L. Liu, Q. B. Li, K. Cline and D. R. Mccarty., 2003. Molecular characterization of the Arabidopsis 9-cis epoxycarotenoid dioxygenase gene family. *The Plant Journal*. 35: 44-56.
- Takshak, S., ve Agrawal, S. B., 2019. Defense potential of secondary metabolites in medicinal plants under UV-B stress. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 193: 51-88.
- Topçu, H., 2019. Antepfıstığı çiçek tomurcuklarında erkek ve dişi organlarının gelişiminde etkili olan miRNA'ların belirlenmesi ve ekspresyonu. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana, 156s.
- Trapnell, C., Roberts, A., Goff, L., Pertea, G., Kim, D., Kelley, D. R., ... ve Pachter, L., 2012. Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nature protocols*, 7(3): 562-578.
- Tufan, N., 2016. Yerel ceviz çeşidinde (*Juglans regia* L.) abiyotik stres faktörlerine karşı dayanıklılık mekanizmasının belirlenmesi. *Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi*, 3:1308-8750
- TUIK, 2025. Türkiye İstatistik Kurumu. İstatistikler için veri portalı. <https://biruni.tuik.gov.tr/medas/?kn=92&locale=tr> (Erişim tarihi: Eylül 2024)
- Türkan, İ., Bor, M., Özdemir, F., Koca, H., 2005. Differential Responses of Lipid Peroxidation and Antioxidants in the Leaves of Drought-Tolerant *P. Acutifolius* Gray and Drought Sensitive *P. Vulgaris* L. Subjected to Polyethylene Glycol Mediates Water Stress. *Plant Science*, 168: 223-231.
- Vahdati, K., 2013. Walnut tolerance to abiotic stresses: approaches and prospects. In VII International Walnut Symposium, 1050: 399-406.

- Vahdati, K., 2014. Walnut Tolerance to Abiotic Stresses: Approaches and Prospects. *Acta Hort. (ISHS)*, 1050:399-406
- Valero, D., ve Khemira, H., 2016. Differential Response of Two Almond Rootstocks to Chloride Salt Mixtures in The Growing Medium. *Физиология Растений*, 63(1): 1-9.
- Vallabhaneni, R., Bradbury, L. M., ve Wurtzel, E. T., 2010. The carotenoid dioxygenase gene family in maize, sorghum, and rice. *Archives of biochemistry and biophysics*, 504(1): 104-111.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., ve Speleman, F., 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome biology*, 3: 1-12.
- Vera-Estrella, R., ve Bohnert, H. J., 2011. Physiological roles for the PIP family of plant aquaporins. *The Plant Plasma Membrane*, 193-222.
- Wang, B., Zhang, J., Pei, D., ve Yu, L., 2021. Combined effects of water stress and salinity on growth, physiological, and biochemical traits in two walnut genotypes. *Physiologia Plantarum*, 172(1): 176-187.
- Wani, A. S., Ahmad, A., Hayat, S. H. ve Fariduddin, Q., 2013. Salt-induced modulation in growth, photosynthesis and antioxidant system in two varieties of *Brassica junica*. *Saudi Journal of Biological Science*, 20(2): 183-193.
- Wasternack, C., ve Hause, B., 2013. Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development..*Annals of botany*, 111(6): 1021-1058.
- Wu, R., Wang, Y., Wu, T., Xu, X., ve Han, Z., 2018. Functional characterisation of MdMYB44 as a negative regulator in the response to cold and salt stress in apple calli. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 93(4): 347-355.
- Ya-bin, Z., Wei, T., Li-huan, W., Ya-wen, H., Xian-wen, L. Ve Yong-sheng, L., 2019. Kiwifruit (*Actinidia chinensis*) R1R2R3-MYB transcription factor *AcMYB3R* enhances drought and salinity tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Integrative Agriculture*, 18(2): 417-427.
- Yaghubi, K., Vafaei, Y., Ghaderi, N., ve Javadi, T., 2019. Potassium silicate improves salinity resistant and affects fruit quality in two strawberry cultivars grown under salt stress. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 50(12): 1439-1451.
- Yang, G. Y., Zhang, W. H., Sun, Y. D., Zhang, T. T., Hu, D., ve Zhai, M. Z., 2017. Two novel WRKY genes from *Juglans regia*, JrWRKY6 and JrWRKY53, are involved in abscisic acid-dependent stress responses. *Biologia plantarum*, 61(4): 611-621.
- Yang, D., Chen, T., Wu, Y., Tang, H., Yu, J., Dai, X., ... ve Tan, X., 2024. Genome-wide analysis of the peanut CaM/CML gene family reveals that the AhCML69 gene is associated with resistance to *Ralstonia solanacearum*. *BMC genomics*, 25(1): 200.

- Yeo, A.R., K.S. Lee, P. Izard, P.J. Boursier ve T.J. Flowers., 1991. Short and long term effects of salinity on leaf growth in Rice (*Oryza sativa* L.), *J. Exp. Bot.*, 42: 881-889.
- Yoshioka, S., Aida, R., Yamamizo, C., Shibata, M., ve Ohmiya, A., 2012. The carotenoid cleavage dioxygenase 4 (CmCCD4a) gene family encodes a key regulator of petal color mutation in chrysanthemum. *Euphytica*, 184: 377-387.
- You, F. M., Huo, N., Gu, Y. Q., Luo, M. C., Ma, Y., Hane, D., ... ve Anderson, O. D., 2008. BatchPrimer3: a high throughput web application for PCR and sequencing primer design. *BMC bioinformatics*, 9: 1-13.
- Yu, Z., Zhang, D., Zeng, B., Liu, X., Yang, J., Gao, W., ve Ma X., 2022. Characterization of the WRKY gene family reveals its contribution to the adaptability of almond (*Prunus dulcis*), 10: e13491.
- Yun-peng, Z., Xiu-juan, Q., Jin-yong, C., Zhi, L., Dan-feng, B., Cui-guo, W. ve Jin-bao, F., 2018. Growth and physiological responses of four kiwifruit genotypes to salt stress and resistance evaluation. *Journal of Integrative Agriculture*, 17(0): 60345-7.
- Zhang, J., Zhang, W., Ji, F., Qiu, J., Song, X., Bu, D., ... ve Pei, D., 2020. A high-quality walnut genome assembly reveals extensive gene expression divergences after whole-genome duplication. *Plant biotechnology journal*, 18(9): 1848.
- Zhang, J., Jia, W., Yang, J., ve Ismail, A. M., 2006. Role of ABA in integrating plant responses to drought and salt stresses. *Field crops research*, 97(1): 111-119.
- Zhao, Q., ve Dixon, R. A., 2011. Transcriptional networks for lignin biosynthesis: more complex than we thought?. *Trends in plant science*, 16(4):227-233.
- Zhou, L., Zhu, T., Han, S., Li, S., Liu, Y., Lin, T., ve Qiao, T., 2023. Changes in the Histology of Walnut (*Juglans regia* L.) Infected with *Phomopsis capsici* and Transcriptome and Metabolome Analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(5): 4879.
- Zhu, J., Chen, L., Li, Z., Wang, W., Qi, Z., Li, Y., ... ve Liu, Z., 2024. Genome-Wide Identification of LOX Gene Family and Its Expression Analysis under Abiotic Stress in Potato (*Solanum tuberosum* L.). *International Journal of Molecular Sciences*, 25(6): 3487.
- Zhu, J. K., 2001. Plant salt tolerance. *Trends in plant science*, 6(2): 66-71.



ÖZGEÇMİŞ

Mesut ADA. İlköğrenimini 2002 yılında Bitlis Türkiye Odalar ve Borsalar Birliği İlkokulu'nda, Ortaöğrenimini ise 2006 yılında Bitlis Yabancı Dil Ağırlıklı Lisesi'nde tamamlamıştır. Lisans eğitimini 2011 yılında Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi'nde, Yüksek Lisans eğitimini ise 2013 yılında Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nde tamamlamıştır. Meslek hayatına 2012-2014 yılları arasında Kahramanmaraş Aksu Sera Tarım Sanayi ve Ticaret AŞ'de Üretim Sorumlusu olarak başlamış, 2014-2015 yılları arasında Şırnak/İdil Ziraat Odası Tarımsal Danışmanlık ve Yayım Hizmetleri'nde Tarım Danışmanı olarak görev yapmıştır. 2018 yılından itibaren Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü'nde Araştırma Görevlisi olarak görevine devam etmektedir.