



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**BUĞDAY (*Triticum aestivum* L.) DOKU KÜLTÜRÜNDE TUZ
STRESİNİN ETKİLERİ**

Ayşe ŞEN

**Biyoloji Anabilim Dalı
Genel Biyoloji Programı**

Danışman

Yard.Doç.Dr. Sema ALİKAMANOĞLU

Haziran, 2005

İSTANBUL



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**BUĞDAY (*Triticum aestivum* L.) DOKU KÜLTÜRÜNDE TUZ
STRESİNİN ETKİLERİ**

Ayşe ŞEN

**Biyoloji Anabilim Dalı
Genel Biyoloji Programı**

Danışman

Yard.Doç.Dr. Sema ALİKAMANOĞLU

Haziran, 2005

İSTANBUL

Bu Yüksek Lisans çalışması İ.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliği tarafından Yeni fen kod T-467/25062004 No'lu proje olarak desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Hızlı artan dünya nüfusunun beslenme sorununun çözümünde, tarım alanlarındaki ürün verimini sınırlayan tuzluluk gibi çeşitli etmenlere karşı mücadelede bitki metabolizmasında meydana gelen değişikliklerin anlaşılmasına yönelik yapılan çalışmalar son yıllarda giderek yaygınlaşmıştır. Bu tez çalışmasının bu konuda yapılan çalışmalara katkılar sağlayacağı inancındayım.

Bu tez çalışmam boyunca, büyük sabır ve emek harcayan, gerek bilimsel gerekse manevi yönde gelişmemde sonsuz emeği geçen ve fikirleri ile beni aydınlatan değerli hocam, Sayın **Yard. Doç. Dr. Sema ALİKAMANOĞLU**'na en derin teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Tez çalışmam sırasında enzim aktivitesi konusunda fikir ve görüşlerinden yararlandığım Sayın **Doç. Dr. Nazlı ARDA**'ya, istatistiksel hesaplamalarda ve doku kültürü çalışmalarında bana yardımcı olan, bilgi ve tecrübesi ile bana yol gösteren Sayın **Arş. Gör. Orkun YAYCILI**'ya, tezimde kullandığım jel fotoğraflarının çekilmesindeki yardımlarından dolayı Sayın **Araş. Gör. Özgür ÇAKIR**'a ve bu tezin yazım aşamasında bana yardımcı olan Biyolog arkadaşım Sevgili **Ernaz ALTUNDAĞ**'a teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca maddi ve manevi destekleri ile bu günlere gelmemi sağlayan, tez çalışmam boyunca benden ilgi ve sevgilerini bir an olsun esirgemeyen sevgili annem **Fatmagül ŞEN**'e, sevgili babam **Seyitahmet ŞEN**'e ve sevgili kardeşim **Mustafa ŞEN**'e sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

İstanbul, Haziran 2005

Ayşe ŞEN

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİL LİSTESİ.....	iv
TABLO LİSTESİ	vi
ÖZET.....	viii
SUMMARY.....	ix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR	3
2.1. Buğday ve Buğday Doku Kültürü	3
2.2. Tuz Stresi.....	6
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	13
3.1. Deney Materyallerinin Eldesi.....	13
3.2. Doku Kültürünün Kurulması.....	13
3.2.1. Besiyerinin Hazırlanması.....	13
3.2.2. Yüzey Sterilizasyonu.....	13
3.2.3. Eksplantların Eldesi ve Kültür Ortamına Ekimi.....	13
3.2.4. Kültür Ortamında Oluşan Kallusların ve Rejenere Olan Bitkilerin Taze Ağırlıklarının Saptanması.....	15
3.3. Klorofil Miktarının Saptanması.....	15
3.4. Protein Miktarı, Süperoksit Dismutaz, Peroksidaz ve Katalaz Aktivitelerinin Belirlenmesi.....	16

3.5. Suda Çözünebilir Protein Tayini.....	16
3.6. Süperoksit Dismutaz Aktivitesi.....	17
3.7. Peroksidaz Enzim Aktivitesi.....	17
3.8. Peroksidaz Jel Elektroforezi	19
3.9. Katalaz Enzim Aktivitesi.....	19
3.10. İstatiksel Analizler.....	21
4. BULGULAR	22
4.1. Tekirdağ Çeşidi.....	22
4.1.1. Tuz Stresinin Kallus Oluşumu ve Kallus Taze Ağırlığı Üzerine Etkisi.....	22
4.1.2. Tuz Stresinin Rejenerasyon ve Bitki Taze Ağırlığı Üzerine Etkisi.....	24
4.1.3. Tuz Stresinin Klorofil Miktarına Etkisi.....	27
4.1.4. Tuz Stresinin Suda Çözünebilir Protein Miktarını Üzerine Etkisi.....	28
4.1.5. Tuz Stresinin Süperoksit Dismutaz Aktivitesine Etkisi.....	28
4.1.6. Tuz Stresinin Peroksidaz Enzim Aktivitesine Etkisi.....	30
4.1.7. Tuz Stresinin Katalaz Enzim Aktivitesine Etkisi.....	31
4.2. Pehlivan Çeşidi.....	33
4.2.1. Tuz Stresinin Kallus Oluşumu ve Kallus Taze Ağırlığı Üzerine Etkisi.....	33
4.2.2. Tuz Stresinin Rejenerasyon ve Bitki Taze Ağırlığı Üzerine Etkisi.....	35
4.2.3. Tuz Stresinin Klorofil Miktarına Etkisi.....	38
4.2.4. Tuz Stresinin Suda Çözünebilir Protein Miktarını Üzerine Etkisi.....	39
4.2.5. Tuz Stresinin Süperoksit Dismutaz Aktivitesine Etkisi.....	39
4.2.6. Tuz Stresinin Peroksidaz Enzim Aktivitesine Etkisi.....	40
4.2.7. Tuz Stresinin Katalaz Enzim Aktivitesine Etkisi.....	42
4.3. Flamura-85 Çeşidi.....	43
4.3.1. Tuz Stresinin Kallus Oluşumu ve Kallus Taze Ağırlığı Üzerine Etkisi.....	43
4.3.2. Tuz Stresinin Rejenerasyon ve Bitki Taze Ağırlığı Üzerine Etkisi.....	45
4.3.3. Tuz Stresinin Klorofil Miktarına Etkisi.....	49
4.3.4. Tuz Stresinin Suda Çözünebilir Protein Miktarını Üzerine Etkisi.....	49
4.3.5. Tuz Stresinin Süperoksit Dismutaz Aktivitesine Etkisi.....	50
4.3.6. Tuz Stresinin Peroksidaz Enzim Aktivitesine Etkisi.....	51
4.3.7. Tuz Stresinin Katalaz Enzim Aktivitesine Etkisi.....	53
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	54
KAYNAKLAR	65
ÖZGEÇMİŞ	72

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 3.1	: BSA standardına göre çizilen kalibrasyon eğrisi.....	16
Şekil 4.1	: Kontrol ve farklı konsantrasyonlarda NaCl stresi uygulanan buğday bitkisine ait Tekirdağ çeşidinden kurulan 28 günlük kültürlerde ortalama kallus taze ağırlık yüzdeleri.....	23
Şekil 4.2	: Kontrol ve farklı konsantrasyonlarda NaCl stresi uygulanmış buğday bitkisine ait Tekirdağ çeşidinin olgun embriyo eksplantlarından kurulan 28 günlük kültürler.....	26
Şekil 4.3	: Kontrol ve farklı konsantrasyonlarda NaCl stresi uygulanan buğday bitkisine ait Tekirdağ çeşidinden kurulan 28 günlük kültürlerde ortalama bitki taze ağırlık yüzdeleri.....	27
Şekil 4.4	: Buğday bitkisine ait Tekirdağ çeşidinde rejenere olan bitkilerdeki peroksidaz aktivitesinin nativ poliakrilamid jel görüntüsü.....	31
Şekil 4.5	: Kontrol ve farklı konsantrasyonlarda NaCl stresi uygulanan buğday bitkisine ait Pehlivan çeşidinden kurulan 28 günlük kültürlerde ortalama kallus taze ağırlık yüzdeleri.....	34
Şekil 4.6	: Kontrol ve 0.1 M NaCl stresi uygulanmış buğday bitkisinin Pehlivan çeşidinde ait olgun embriyo eksplantlarından kurulan 28 günlük kültürler.....	37
Şekil 4.7	: Kontrol ve 0.2 M NaCl stresi uygulanmış buğday bitkisinin Pehlivan çeşidinde ait olgun embriyo eksplantlarından kurulan 28 günlük kültürler.....	37
Şekil 4.8	: Kontrol ve farklı konsantrasyonlarda NaCl stresi uygulanmış buğday bitkisine ait Pehlivan çeşidinden kurulan 28 günlük kültürlerde ortalama bitki taze ağırlık yüzdeleri.....	36
Şekil 4.9	: Buğday bitkisine ait Pehlivan çeşidinde rejenere olan bitkilerdeki peroksidaz aktivitesinin nativ poliakrilamid jel görüntüsü.....	41
Şekil 4.10	: Kontrol ve farklı konsantrasyonlarda NaCl stresi uygulanan buğday bitkisinin Flamura-85 çeşidinden kurulan 28 günlük kültürlerde ortalama kallus taze ağırlık yüzdeleri.....	44
Şekil 4.11	: Kontrol ve 0.05 M NaCl stresi uygulanmış buğday bitkisinin Flamura-85 çeşidinde ait olgun embriyo eksplantlarından kurulan 28 günlük kültürler.....	47
Şekil 4.12	: Kontrol ve 0.1 M NaCl stresi uygulanmış buğday bitkisinin Flamura-85 çeşidinde ait olgun embriyo eksplantlarından kurulan 28 günlük kültürler.....	47
Şekil 4.13	: Kontrol ve 0.25 M NaCl stresi uygulanmış buğday bitkisinin Flamura-85 çeşidinde ait olgun embriyo eksplantlarından kurulan 28 günlük kültürler.....	48
Şekil 4.14	: Kontrol ve farklı konsantrasyonlarda NaCl stresi uygulanan buğday bitkisinin Flamura-85 çeşidinden kurulan 28 günlük kültürlerde ortalama bitki taze ağırlık yüzdeleri	48

Şekil 4.15 : Buğday bitkisine ait Flamura-85 çeşidinde rejenere olan bitkilerdeki peroksidaz aktivitesinin nativ poliakrilamid jel görüntüsü.....**52**

TABLO LİSTESİ

Tablo 3.1	: Doku kültürü için hazırlanan besiyerinin içeriği.....	14
Tablo 3.2	: Doku kültürü için hazırlanan kallus ve rejenerasyon besiyerinin içeriği.....	15
Tablo 3.3	: Süreoksit dismutaz enzim aktivitesini tespit etmek için kullanılan tampon içeriği.....	18
Tablo 3.4	: Peroksidaz enzim aktivitesini tespit etmek için kullanılan tampon içeriği.....	18
Tablo 3.5	: Nativ Elektrofrez Jelinin Hazırlanmasında Kullanılan Çözeltiler ve Tamponlar	20
Tablo 3.6	: Katalaz enzim aktivitesini tespit etmek için kullanılan tampon içeriği.....	21
Tablo 4.1	: Kontrol ve farklı konsantrasyonlarda NaCl stresi uygulanan Buğday bitkisine ait Tekirdağ çeşidinin 28 günlük kallus kültüründe ekilen eksplant sayısı, kallus sayısı ve yüzdesi ile ortalama kallus taze ağırlığı.....	23
Tablo 4.2	: Kontrol ve farklı konsantrasyonlarda NaCl stresi uygulanan Buğday bitkisine ait Tekirdağ çeşidinin 28 günlük embriyo kültürlerinde ekilen eksplant sayısı, rejenere olan bitki sayısı ve rejenerasyon yüzdesi ile ortalama bitki taze ağırlığı.....	25
Tablo 4.3	: Kontrol ve farklı konsantrasyonlarda tuz stresi uygulanmış 28 günlük buğday bitkisine ait Tekirdağ çeşidinden kurulan kültürlerin yapraklarındaki klorofil a, klorofil b ve total klorofil miktarı.....	28
Tablo 4.4	: Buğday bitkisine ait Tekirdağ çeşidinde rejenere olan bitkilerdeki suda çözünebilir protein miktarı.....	29
Tablo 4.5	: Buğday bitkisine ait Tekirdağ çeşidinde rejenere olan bitkilerdeki süperoksit dismutaz aktivitesi.....	29
Tablo 4.6	: Buğday bitkisine ait Tekirdağ çeşidinde rejenere olan bitkilerdeki peroksidaz enzim aktivitesi.....	30
Tablo 4.7	: Buğday bitkisine ait Tekirdağ çeşidinde rejenere olan bitkilerdeki katalaz enzim aktivitesi.....	32
Tablo 4.8	: Kontrol ve farklı konsantrasyonlarda NaCl uygulanan buğday bitkisine ait Pehlivan çeşidinin 28 günlük kallus kültürlerinde, eksplant sayısı, kallus sayısı ve yüzdesi ile ortalama kallus taze ağırlığı.....	34
Tablo 4.9	: Kontrol ve farklı konsantrasyonlarda NaCl uygulanan buğday bitkisine ait Pehlivan çeşidinin 28 günlük embriyo kültürlerinde, eksplant sayısı, rejenere olan bitki sayısı ve yüzdesi ile ortalama bitki taze ağırlığı.....	36
Tablo 4.10	: Kontrol ve farklı konsantrasyonlarda tuz stresi uygulanan 28 günlük buğday bitkisine ait Pehlivan çeşidinden kurulan kültürlerin yapraklarındaki klorofil a, klorofil b ve total klorofil miktarları	38

Tablo 4.11	: Buğday bitkisine ait Pehlivan çeşidinde rejenere olan bitkilerdeki suda çözünebilir protein miktarları.....	39
Tablo 4.12	: Buğday bitkisine ait Pehlivan çeşidinde rejenere olan bitkilerdeki süperoksit dismutaz aktivitesi	40
Tablo 4.13	: Buğday bitkisine ait Pehlivan çeşidinde rejenere olan bitkilerdeki peroksidaz enzimaktivitesi	40
Tablo 4.14	: Buğday bitkisine ait Pehlivan çeşidinde rejenere olan bitkilerdeki katalaz enzim aktivitesi	42
Tablo 4.15	: Kontrol ve farklı konsantrasyonlarda NaCl uygulanan buğday bitkisine ait Flamura-85 çeşidinin 28 günlük kallus kültürlerinde, eksplant sayısı, kallus sayısı ve yüzdesi ile ortalama kallus taze ağırlığı.....	44
Tablo 4.16	: Kontrol ve farklı konsantrasyonlarda NaCl uygulanan buğday bitkisine ait Flamura-85 çeşidinin 28 günlük embriyo kültürlerinde, eksplant sayısı, rejenere olan bitki sayısı ve yüzdesi ile ortalama bitki taze ağırlığı.....	46
Tablo 4.17	: Kontrol ve farklı konsantrasyonlarda tuz stresi uygulanan 28 günlük buğday bitkisine ait Flamura-85 çeşidinden kurulan kültürlerin yapraklarındaki klorofil a, klorofil b ve total klorofil miktarları.....	49
Tablo 4.18	: Buğday bitkisine ait Flamura-85 çeşidinde rejenere olan bitkilerdeki suda çözünebilir protein miktarları	50
Tablo 4.19	: Buğday bitkisine ait Flamura-85 çeşidinde rejenere olan bitkilerdeki süperoksit dismutaz aktivitesi.....	51
Tablo 4.20	: Buğday bitkisine ait Flamura-85 çeşidinde rejenere olan bitkilerdeki peroksidaz enzim aktivitesi.....	51
Tablo 4.21	: Buğday bitkisine ait Flamura-85 çeşidinde rejenere olan bitkilerdeki katalaz enzim aktivitesi.....	53

ÖZET

Buğday (*Triticum aestivum* L.) Doku Kültüründe Tuz Stresinin Etkileri

Abiyotik streslerden biri olan tuzluluk, tarımsal alanlarda verimliliği olumsuz yönde etkileyen önemli bir etmendir. Günümüzde biyoteknolojik gelişmeler ile tuzluluk gibi çeşitli stres koşullarına toleranslı bitki türlerinin seleksiyonu mümkün olmaktadır.

Bu çalışmada Tekirdağ, Pehlivan ve Flamura-85 buğday çeşitlerinin *in vitro* doku kültürleri kurulmuş ve bu kültürlerde farklı tuz konsantrasyonların etkisi belirlenmiştir.

Buğday doku kültürlerinde, uygulanan tuz konsantrasyonlarındaki artışa bağlı olarak, her üç çeşidin, kallus oluşumu ve bitki rejenerasyon yüzdesi, kallus ve bitki taze ağırlığı ve klorofil miktarlarında azalma saptanmıştır. Tuzluluk koşulları altında Tekirdağ ve Pehlivan çeşitlerinin suda çözünebilir protein miktarlarında azalış gözlenirken Flamura-85 çeşidinin suda çözünebilir protein miktarlarında artış saptanmıştır. Ayrıca her üç çeşitte tuz stresine cevap olarak süperoksit dismutaz, peroksidaz ve katalaz enzim aktivitelerinin arttığı belirlenmiştir.

SUMMARY

Effects of Salt Stress on Wheat (*Triticum aestivum* L.) Tissue Culture

Salinity, which is one of abiotic stresses, is an important factor that negatively affects the productivity in agricultural fields. Today, with the developing of biotechnology, the selection of plant species tolerant to various stress conditions such as salinity is possible.

In this study, *in vitro* tissue cultures of Tekirdağ, Pehlivan and Flamura-85 wheat varieties were established and effects of different salt concentrations on these cultures were examined.

Depending on the increase in salt concentrations applied, a decrease was detected in percentages of callus formation and plant regeneration, in fresh weights of callus and plant and in chlorophyll amounts of each three varieties in wheat tissue cultures. An increase was observed in soluble protein amounts of Flamura-85 variety under salinity conditions, while a decrease was observed in soluble protein amounts of Tekirdağ and Pehlivan varieties. In addition, an increase in superoxide dismutase, peroxidase and catalase enzyme activities were determined at each three varieties as in response to salt stress.

1. GİRİŞ

Dünyada sulanabilir tarım alanlarının artan tuzluluk sorunu ile karşı karşıya kalması tarımsal gıda üretimini olumsuz yönde etkilemektedir. İnsanların temel gıda gereksinimlerinin karşılanması, tarımsal alanların en iyi şekilde kullanılarak tarımsal üretimin artırılmasına bağlıdır. Bu yüzden tarım yapılan tuzlu topraklarda, ortaya çıkan ekonomik kayıpların azaltılması veya ortadan kaldırılması bu topraklarda yetiştirilebilecek en uygun bitki türlerinin seçilmesini gerektirmektedir.

Abiyotik stres faktörlerinden biri olan tuzluluk, diğer stres faktörleri gibi (sıcaklık, ağır metaller, mineral eksikliği, kuraklık, don, zararlı mikroorganizmalar, parazit bitkiler, pestisitler, insektisitler vb.) bitkilerin büyümesini, gelişmesini ve ürün verimini olumsuz yönde etkilemektedir [1, 2]. Tuzluluk bitkilerde su potansiyelinde değişmelere, iyon dengesizliğine ve toksisiteye neden olmaktadır. Bunun sonucunda hücre membranlarının organizasyonu bozulmakta, fotosentez azalmakta ve bitki gelişiminde bozukluklar ortaya çıkmaktadır. Ayrıca tuz stresi ile reaktif oksijen türevlerinin üretiminin artması, bitkilerde oksidatif strese yol açmaktadır. Reaktif oksijen türevleri hücre membranlarının yapısındaki lipidleri oksitleyerek membranların yapısının bozulmasına, DNA'da mutasyonlara, protein ve enzimlerin yapısında ise dejenerasyonlara neden olmaktadır. Strese bağlı reaktif oksijen türevlerinin üretimi hücre savunma mekanizmalarının başedebileceği seviyeyi aştığı durumlarda, hücrede oluşan yapısal ve fonksiyonel zararlanmalar sonucu bitkinin ölümü gibi ekstrem olaylar meydana gelebilmektedir [1, 2, 3].

Bu araştırmaya; ülkemiz tarımında önemli bir yer tutan buğday (*Triticum aestivum* L.) bitkisine ait Tekirdağ, Pehlivan ve Flamura-85 çeşitlerinin olgun embriyolarından kurulan kallus ve rejenerasyon kültürlerinde, kallus ve rejenere olan bitki taze ağırlıkları, rejenere olan bitkilerin klorofil ve suda çözünebilir protein miktarları, antioksidant enzimlerden süperoksit dismutaz, peroksidaz ve katalaz aktiviteleri gibi

biyokimyasal ve fizyolojik parametreler üzerine farklı konsantrasyonlardaki tuz stresinin etkisini belirlemek amaçlanmıştır.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. BUĞDAY ve BUĞDAY DOKU KÜLTÜRÜ

Buğday bitkisi, Gramineae familyasından *Triticum* cinsine ait bir bitkidir. Monokotil bir bitki olan buğday bitkisi, kendi kendini dölleyebilen, kökleri saçaklı, meyvesi karyopsis tipinde olan, tek yıllık bir bitkidir [4, 5]. Her türlü iklim koşullarına uyum gösterebilmesi, hammadde olarak kullanım alanının genişliği ve beslenmede önemli yer tutması nedeniyle, dünyanın her tarafında en çok yetiştirilen tarım ürünleri arasında yer almaktadır.

Buğday bitkisinin, diploid ($2n=14$ kromozomlu), tetraploid ($2n=28$ kromozomlu) ve heksaploid ($2n=42$ kromozomlu) türleri mevcuttur. 42 kromozomlu *Triticum aestivum* L. (ekmeklik buğday) ve 28 kromozomlu *Triticum durum* Desf. (durum buğdayı) ülkemizde yetiştirilen en yaygın buğday türleridir [5].

Danenin sertliğine (sert, yarı sert ve yumuşak buğdaylar), danenin rengine (kırmızı ve beyaz buğdaylar) ve ekiliş dönemine göre (yazlık ve kışlık buğdaylar) buğday bitkisi kendi içinde sınıflara ayrılır [6].

2004-2005 sezonunda dünya buğday üretimi yaklaşık 617 milyon ton civarında gerçekleşmiştir. Ülkemiz bu üretimin 21 milyon tonluk kısmını karşılamış ve % 3 lük pay ile 8. sırada yer almıştır [6].

Genetik değeri ve verim potansiyeli yüksek ticari çeşitlerin seçilerek kullanılması tarımda çok önemli bir yer tutmaktadır. Bitki doku kültürü teknikleri kullanılarak kontrollü koşullar altında gerçekleştirilen *in vitro* seleksiyon yöntemi ile populasyon içerisinde istenilen özelliklere sahip genotiplerin seçilmesi mümkün olabilmektedir.

Son yıllarda *in vitro* hücre ve doku kültürü teknikleri, klasik bitki ıslah programlarına yardımcı olarak geliştirilmektedir. Bitki doku kültürü, bitkilerin sahip olduğu totipotensi yeteneğinden yararlanılarak aseptik şartlarda, bitkilerden alınan hücre (meristem hücreleri, kallus hücreleri vb.), doku (çeşitli bitki kısımları) ve organ (üreme organları, çiçek, kök, embriyo, gövde vb.) kısımlarının yapay besiyerleri içerisinde geliştirilerek yeni bir birey oluşturulmasıdır. Bitkiden alınarak büyümesi için yapay ortama taşınan hücre, doku ve organ kısımlarına eksplant denir. Eksplantlardan amaca uygun şekilde organogenez, embriyogenez veya kallus dokusu teşvik edilerek *in vitro* şartlarda bitki oluşumu sağlanabilir. Bitki doku kültürü teknikleri ile embriyo kültürleri, meristem kültürleri, kallus kültürleri, haploid kültürler, süspansiyon kültürleri, protoplast kültürleri kurulabilir [7, 8].

Uygun besiyerine yerleştirilen eksplantın aktif bir şekilde çoğalarak farklılaşmamış hücre topluluğu oluşturduğu kallus kültürleri başlangıç materyali olarak bitki doku kültüründe sıklıkla kullanılmaktadır [8].

Bitkilerin tohum ve tohum taslaklarından embriyoların izole edilerek kültür ortamına taşınması ile oluşturulan embriyo kültürleri ile embriyonal büyüme ve farklılaşma üzerine kimyasal ve fiziksel faktörlerin etkileri incelenebilir. Ayrıca embriyo kültürleri ile tohumların dormansi periyodu kırılabilen, haploid bitki eldesi ve genetik yapıların korunması sağlanabilmektedir [8].

Tahılların endospermi kullanarak ilk başarılı *in vitro* kültür La Rue tarafından 1949 yılında kurulmuştur. Gamborg ve Eleveigh, 1968 yılında 2,4-D (2,4-diklorofenoksi asetik asit), B vitamini ve sukroz içeren farklı besi ortamları kullanarak buğdayda süspansiyon kültürünü gerçekleştirmişlerdir [9]. Sonraki yıllarda buğday bitkisinde olgun embriyo, olgunlaşmamış embriyo, yaprak tomurcuğu, olgunlaşmamış infloresans, ovul, tohum ve endosperm destekli olgun embriyo gibi farklı eksplantlar kullanılarak *in vitro* kültürler kurulmuştur [9-21].

Yapılan çalışmalarda buğday doku kültürlerinde olgun ve olgunlaşmamış embriyo eksplantlarından yüksek oranda kallus ve bitki rejenerasyonu elde edildiği bildirilmektedir [10-13].

Özgen ve diğ. 12 farklı kışlık buğday çeşitlerinin olgun ve olgunlaşmamış embriyolarını eksplant olarak kullandıkları kallus kültüründe Murashige ve Skoog (MS) besiyerine 2,4-D ilave ederek, olgunlaşmamış embriyolardan % 53.3 – 93.3 arasında ve olgun embriyolardan ise % 80 - 98.3 arasında değişen oranlarda kallus teşviki gözlemlenmiştir. Bu kallus kültürlerinden elde edilen rejenerantların oranı ise sırası ile % 27.9 - 96.7 ve % 90.9 -100 arasında değişmektedir [10].

Buğday doku kültüründe bitki rejenerasyonunu ve kallus teşvikini, eksplantın seçimi, kültür ortamının içeriği, besiyerine eklenen büyüme düzenleyicileri ve genotip etkilemektedir [10, 11, 13].

Buğday bitkisinden kurulan kültürlerde rejenerasyonu teşvik etmek amacı ile besiyerinin belirlenmesi konusunda birçok araştırma yapılmıştır. Buğday doku kültüründe yaygın olarak MS besiyeri kullanılmakla birlikte Linsmair ve Skoog (LS) ve CHU (N₆) gibi farklı besiyerleri de kullanılmaktadır [13, 14, 21, 22].

Almansouri ve diğ. 3 farklı durum buğdayı çeşidinden kurdukları embriyo kültürlerinde LS besiyerini kullanmışlar ve embriyolardan bitki gelişiminin % 95 in üzerinde olduğunu saptamışlardır [21]. 28 farklı durum buğday ile yapılan bir başka çalışmada ise olgunlaşmamış embriyo eksplantlarından kurulan kallus kültüründe MS besiyeri kullanılmış ve % 86 - 100 arasında değişen oranlarda kallus elde edildiği saptanmıştır [13].

Virkant ve Rashid, buğday yaprak eksplantlarını kullandıkları çalışmada MS besiyerinde % 56 oranında embriyonik kallus ve N₆ besiyerinde ise % 67 oranında embriyonik kallus oluşumu meydana geldiğini bildirmektedirler [14].

Doku kültürü çalışmalarında rejenerasyon ve kallus oluşumunu teşvik etmede bitki büyüme düzenleyicilerinin konsantrasyonlarının saptanması büyük önem taşımaktadır. Buğday doku kültürü çalışmalarında büyüme düzenleyicilerinden oksin olarak 2,4-D ve indol-3-asetik asit (IAA), sitokinin olarak ise 6-benzilaminopurin (BAP) tercih

edilmektedir. Kùltùrlerde 2 - 4 mg/l 2,4-D hormonunun kallus teşviki için daha etkili olduğunu buna karşılık dűřük konsantrasyonlarda 2,4-D kullanımının ise rejenerasyon yeteneğini arttırdığı bildirilmektedir [9, 19, 22].

MS besiyerine 10 μ M 2,4-D ve 1 μ M IAA ilave edilerek kurulan kallus kùltùrlerinde buğday embriyolarında % 90 ın izerinde kallus teşviki gűzlenmiřtir [19]. Buėday embriyolarının eksplant olarak kullanıldığı bir başka çalışmada ise, 0.2 mg/l 2,4-D, 1mg/l BAP ve 0.2 mg/l IAA hormon ilavesiyle hazırlanan besiyerindeki rejenerasyonun, 0.2 mg/l 2,4-D ve 2 mg/l BAP hormon ilavesiyle hazırlanan besiyerindeki rejenerasyona oranının 5/7 olduğu bildirilmektedir [22]

6 heksaploid kışlık *Triticosecale Wittmack* eřidininin olgunlaşmamış embriyo, olgun embriyo ve endosperm destekli olgun embriyo eksplantlarından kurulan kùltùrlerde kallus izerinden indirekt rejenerasyon sonucu, bitki rejenerasyonunun % 53.5 – 98.8 arasında olduğunu tespit edilmiştir. Rejenerasyon yùzdeleri arasındaki bu değişimin genotip farklılığından kaynaklandığı bildirilmektedir [11].

Bitki doku kùltùrù, tuz toleransı ve bitki geleişim seviyeleri arasındaki korelasyonu araştırmak için uygun metodlardır [23]. Çevresel faktűrlerin kontrol altına alındığı bu kùltùrlerde aynı yapıdaki doku veya tek bir bitki hùcresi ile çalışmak mùmkùn olmaktadır. Bitki doku kùltùrù teknikleri ile tuz stresine karşı oluşan toleransın molekùler temelleri araştırılabilmekte, tuz stresi koşullarında bitkilerde oluşan bu değişikliklere bağlı olarak bitki metabolizmasında ortaya çıkan fizyolojik ve biyokimyasal olaylar incelenabilmekte ve tuza toleranslı bitki soylarının seleksiyonu sağlanabilmektedir [24].

2.2. TUZ STRESİ

Tuzluluk, uezellikle kurak ve yarı kurak iklim bűlgelerinde őrùn verimini sınırlayan ana streslerden biridir [25]. Tùrkiye’de yapılan etùtlere gűre, drenaj problemlili toprakların yarıdan fazlası, toplam arazinin % 2 si veya yaklařık 1.5 milyon ha arazi tuzluluk ve/veya alkalilikten etkilenmektedir. Ùlkemizde tuzdan etkilenmiř toprakların

miktarları; hafif tuzlu topraklar 615 000 ha, tuzlu topraklar 505 000 ha, hafif tuzlu-alkali topraklar 126 000 ha ve tuzlu-alkali topraklar ise 265 000 ha dır. Türkiye'nin iç kısımlarında tuzlar, tortul kayalardan, volkanik depozitlerden, sulama suyundan ve taban suyundan kaynaklanırken, kıyı bölgelerinde tuzlanma, daha çok alüvyal materyalin deniz yakınında veya içinde depolanmasından kaynaklanmaktadır. Buralardaki taban suyu yüksek ve tuzlu olduğundan, kış mevsiminde üst toprak katmanındaki tuzlar yıkanamamaktadır. Türkiye'nin topraklarının yüzeyinde veya profilinde biriken NaCl, CaCl₂, MgCl₂ gibi klorürler, Na₂SO₄ ve MgSO₄ gibi sülfatlar, NaNO₃ ve KNO₃ gibi nitratlar, NaCO₃ ve NaHCO₃ gibi karbonat ve bikarbonatlar ile boratlar, toprağın oluştuğu ana maddeden ileri gelebileceği gibi, daha yukarı arazilerden aşağılara yıkanma ile, yüksek taban suyundan, düşük kaliteli sulama suyundan veya yanlış sulama tekniklerinden meydana gelmektedir [26].

Bilinçsiz sulama, yanlış gübreleme ve yanlış toprak işleme gibi etmenlerle ortaya çıkan tuzluluk, tarımda verimin giderek azalmasına neden olmakta ve özellikle son yıllarda sulamanın yeni başladığı GAP bölgesinde bir sorun olmak üzere [27].

Toprakların tuzlanmasında, bilinçsiz sulama yanında, drenaj olanaklarının yetersizliği ve yüksek taban suyunun rolü de çok büyüktür. Özellikle, sulama sonucu toprakların tuzlu ve alkali hale dönüşmesi, sulu tarımın uygulandığı bölgelerde güncel bir sorundur. Drenaj şebekelerinin yetersizliği ve sulama sonucu yükselen taban suyu, kurak bölgelerde tuzluluğun başlıca nedenidir. Bitki kök bölgesinde fazla miktarda eriyebilir tuzların birikmesi, toprakta tuzluluk sorununun ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Böyle bir toprakta, kültür bitkilerinin çimlenme, büyüme ve ürün verimleri, mevcut tuzların cinsi ve miktarlarına bağlı olarak azalmakta ve hatta tamamen durmaktadır [28].

Tuzluluk, bitki gelişimi ve verimini azaltan temel etmenlerden biri olarak dünyadaki arazilerin toplam % 7 sini etkilemektedir. Tarım yapılan alanların % 23 ü ve sulanan alanların % 20 si tuzluluktan etkilenmekte ve her yıl dünyada % 10 oranında tuzlulukta artış eğilimi görülmektedir [28].

Bitkiler, tuzlu ortamda yaşayabilme kapasitelerine göre halofitler ve glikofitler olarak iki gruba ayrılırlar. Halofitler, yüksek tuz konsantrasyonlarında gelişebilen bitkilerdir.

Glikofitler ise tuza duyarlı bitkilerdir. Pek çok bitki glikofit olup yüksek konsantrasyonda tuz stresini tolere edemez. Yüksek konsantrasyonda tuz varlığı, toprağın osmotik potansiyelini azaltmakta ve bunun sonucu olarak bitkilerde iyon dağılımındaki ve su potansiyelindeki dengenin bozulmasına neden olmaktadır. İyon ve su dengesindeki şiddetli değişiklikler bitkilerde moleküler düzeyde zararlanmalara, bitki büyümesinin durmasına ve bitki ölümünün meydana gelmesine neden olur [2, 29].

Topraklardaki tuzluluğun bitkilerde su açığı yaratmasının temel nedeni, toprağın osmotik basıncının düşmesi sonucu bitkilerin topraktan su alımının azalmasıdır. Protoplazmada biriken Na^+ ve Cl^- konsantrasyonlarının artması iyon dengesizliğine neden olmaktadır [30]. Özellikle protoplazmada Na^+ birikimi K^+ , Mg^{+2} ve Ca^{+2} alımını engellemektedir [31]. Ayrıca Na^+ yapraklarda birikerek klorofil moleküllerindeki Mg^{+2} ile yer değiştirmesi sonucu klorofillerin yapısı bozulmakta ve klorozis oluşmaktadır [32].

Stres durumunun devam etmesi halinde bitkilerde kök büyümesi engellenmekte, sürgünlerin boyu kısalmakta, yapraklar küçülmekte ve hücrelerin ölümü gerçekleşmektedir. Köklerde, tomurcuklarda, yaprak kenarlarında ve sürgün uçlarında nekrozlar oluşmakta, yapraklar sararmakta ve sürgünün tüm kısımlarında kurumalar meydana gelmektedir. Solunum zincirinde fotofosforilasyon ve fosforilasyon ile az enerji üretilmekte, fotosentez miktarı ve bitki gelişim hızı düşmektedir. Fotosentez ve solunumun azalması, verimin ve kalitenin düşmesine ve biyomas üretiminin azalmasına neden olmaktadır [24].

Tuz stresinin, bitkiler üzerinde yaptığı etkiyi gösteren birçok çalışma yapılmıştır. Sairam ve diğ., Fogle ve Munns'un, yaptıkları çalışmada osmotik stresin buğday fidelerinin kök büyümesini azalttığını ve bunun sonucunda bitkilerin topraktan yeterli besini alamadıklarını tespit ettiklerini bildirmektedirler [31]. Mısır, yonca ve mavi ayrık bitkilerinden kurulan su kültürlerine değişik konsantrasyonlarda tuz stresi uygulanmış ve tuz konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak çeşitlerin çimlenme hızlarının, kök uzunluklarının ve fide boylarının azaldığı tespit edilmiştir [33].

Büyüyen ve genişleyen hücrelerde turgor basıncının azalması ve bu hücrelerdeki kritik metabolik basamaklar üzerine tuz akümülyasyonunun toksik etkisi, bitki büyüme inhibisyonunda etkilidir. Büyüme inhibisyonunun çeşitli bitki türleri arasında farklılıklar göstermesinin nedeni ise genotipik tuz direncinin farklı olmasından ve farklı oranlarda tuz akümülyasyonundan kaynaklandığı bildirilmektedir [34].

Biyokimyasal incelemeler tuz stresi altında bulunan bitkilerde reaktif oksijen türevlerinin üretiminin arttığını göstermektedir. Bitkiler maruz kaldıkları stres faktörlerine karşı oksijenin uyarılmış formları olan singlet oksijen, süperoksit ve hidroksil radikallerini oluşturarak cevap verirler. Bitki hücrelerinde bu radikallerin başlıca üretim yeri kloroplastlardaki ve mitokondrideki elektron transfer zinciri ile peroksizomlardır. Sitotoksik etki gösteren reaktif oksijen türevleri hücrelerdeki lipid, protein ve nükleik asitlere zarar verirler [35-38].

Bitkiler, reaktif oksijen türevlerinin zararlı etkilerinden korunmak için bazı mekanizmalar geliştirmişlerdir. Stres sonucu oluşan reaktif oksijen türevleri, bitki hücrelerindeki toksik ürünlerin artışına bağlı olarak antioksidant savunma mekanizmalarında yer alan çeşitli enzimlere sinyal göndererek bu mekanizmaları harekete geçirirler [35].

Mitokondri ve kloroplastlardaki elektron transfer zincirleri süperoksit radikallerinin başlıca oluşum yerleridir. Süperoksit radikallerinin enzimatik veya enzimatik olmayan dismutasyonu sonucu hidrojen peroksit (H_2O_2) oluşur. Hidrojen peroksidin bir diğer oluşum yolu da peroksizomlardaki gliyoksilat çemberinde yağların β -oksidasyonudur. Oksitleyici özelliği nedeniyle biyolojik sistemlerden derhal uzaklaştırılması gereken H_2O_2 , demir, bakır gibi metal iyonlarının varlığında hidroksil radikalının oluşumuna neden olur [35-38].

Son derece reaktif olan hidroksil radikalının DNA ile tepkimesi, baz modifikasyonlarına, baz delesyonlarına ve zincir kırılmalarına neden olabilir. Ayrıca proteinlerin oksidasyonu sonucu proteinleri proteolitik yıkıma uğratar, membran lipidlerinin peroksidasyonuna neden olarak zar yapısını bozar ve geçirgenliğini artırarak hücrenin ölmesine sebep olur [35-38].

Stres altında oluşan diğ er bir reaktif oksijen türevi ise singlet oksijendir. Singlet oksijen eksitasyon sonucu oluşabileceğ i gibi süperoksit radikalinin dismutasyonu sonucunda da oluşabilir [36-39]. Doymamış yağ asitleri ile doğrudan tepkimeye girerek peroksi radikalini oluşturur ve hidroksil radikalleri kadar etkin bir şekilde lipid peroksidasyonunu başlatabilir [39]. Lipid peroksidasyonu ise hücre membranlarının yapısı ve işlevleri üzerine etkili olan en önemli zararlanmalarından biridir.

Bitkilerde tuz stresi altında lipid peroksidasyonunun önemli bir göstergesi malondialdehid (MDA) miktarının artmasıdır ve bu konuda çeşitli araştırmalar yapılmıştır. Neto ve diğ. tuza toleranslı ve tuza duyarlı mısır çeşitleri ile yaptıkları çalışmada 100 mM'lık NaCl stresi altında tuza toleranslı olan çeşidin yapraklarındaki MDA miktarının kontrole göre çok fazla artış göstermediğ ini, fakat tuza duyarlı olan çeşidin yapraklarındaki MDA miktarının kontrole göre % 24 lük bir artışa neden olduğunu bildirmişlerdir [40]. 3 soğan çeşidi ile yapılan bir başka çalışmada ise artan tuz konsantrasyonuna bağı lı olarak her üç varyetenin MDA miktarlarında anlamlı bir artış saptanmıştır [41].

Bitkilerde tuzluluğ a bağı lı olarak protein içeriğ inde de değı şmeler olduğ u yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Proteinler, tuzluluğ a karşı bitkilerde osmotik düzenleyici olarak rol almakta ve farklı bitkilerde artış veya azalış göstermektedirler [42]. Proteinlerdeki sülfür ve tiyol grupları stres durumunda oluşan reaktif oksijen metabolitlerine karşı son derece duyarlıdırlar [43].

Ashraf ve Harris çalışmalarında, Ashraf ve O'Leary'nin tuza duyarlı ve tuza toleranslı buğday çeşitleri ile yaptıkları çalışmada, tuz stresi altında suda çözünebilir protein miktarlarının tuza duyarlı olan çeşitlerde daha fazla olduğunu buna karşılık Ashraf ve Washeed'in mercimek çeşitleri ile yaptıkları çalışmada ise tuz stresi altında yapraklardaki suda çözünebilir protein miktarının azaldığını tespit ettiklerini bildirmektedirler [44].

Bitkiler reaktif oksijen metabolitlerinin zararlı etkilerinden korunmak için bazı mekanizmalar geliştirmişlerdir. Bu direnç mekanizmaları enzimatik ve enzimatik

olmayan antioksidant savunma sistemleridir. Bitkilerde stres karşısında oluşan bu direnç mekanizmalarının belirlenmesi, istenilen özellikteki bitki çeşitlerinin seleksiyonu için önemlidir.

Bitkilerin antioksidant savunma sistemlerinde başlıca antioksidant enzimler arasında süperoksit dismutaz, peroksidaz, askorbat peroksidaz, katalaz, glutatyon S-transferaz, glutatyon reduktaz ve glutatyon peroksidaz gibi antioksidant enzimler yer alır. Bitkilerin yapılarında strese karşı biriktirdikleri enzimatik olmayan osmoprotektanlar ise kuaterner amino asit bileşikleri (prolin, glisin betain, β -alanin betain, prolin betain vb.), basit şekerler (fruktoz ve glukoz vb.), alkol şekerleri (gliserol ve metil inositol vb.), kompleks şekerler (trehaloz, rafinoz, ve fruktans vb.), sülfatlı bileşikler (kolin o-sülfat, dimetil sülfat propironat vb.), C vitamini (askorbik asid) ve E vitamini (α -tokoferol) dir [36- 38, 45].

Tuzluluk gibi çevresel stres faktörleri sonucu bitkilerde meydana gelen süperoksit radikallerinin ortamdaki uzaklaştırılması görevini önemli antioksidant enzimlerden biri olan süperoksit dismutaz üstlenmiştir. Süperoksit dismutaz, süperoksit radikallerini hidrojen peroksit ve oksijene dönüştürür. Bu dismutasyon reaksiyonu sonucu oluşan ve canlı sistemlerde oldukça toksik etki gösteren hidrojen peroksit enzimatik savunma görevi yapan peroksidaz ve katalaz enzimleri tarafından su ve oksijene dönüştürülür [36-39].

Bor ve Türkan, şeker pancarı çeşitleri ile yaptıkları çalışmada 0-500 mM arasında değişen tuz konsantrasyonlarındaki artışa bağlı olarak katalaz, peroksidaz, askorbat peroksidaz, süperoksit dismutaz ve glutatyon reduktaz aktivitelerinde kontrol gruplarına göre artış saptamışlardır [46]. Pirinç bitkisi ile yapılan başka bir çalışmada ise 150 mmol/l tuz stresinin pirinç yapraklarındaki guaiacol peroksidaz, askorbat peroksidaz, süperoksit dismutaz ve glutatyon reduktaz aktivitelerinin kontrol gruplarına göre arttırdığı gözlenmiştir [47].

Topraktaki tuzluluk oranının düşürmek için yapılan teknolojik çalışmalar oldukça masraflıdır. Tuzluluk oranının az olduğu topraklarda da çeşitli etmenler nedeni ile yavaş seyreden bir tuzluluk kaçınılmaz olacağından genetik dayanıma yönelmek zorunlu

olmaktadır [48]. Bu durumda genetik dayanıklılık önem kazanmakta ve stres şartlarına dayanıklı genotiplerin saptanması ve performanslarının tespit edilmesi gerekmektedir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. DENEY MATERYALLERİNİN ELDESİ

Araştırmamızda üç farklı buğday çeşidine ait tohumlar kullanılmıştır. Tekirdağ, Pehlivan ve Flamura-85 buğday (*Triticum aestivum* L.) çeşitlerine ait tohumlar Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nden temin edilmiştir.

3.2. DOKU KÜLTÜRÜNÜN KURULMASI

3.2.1. Besiyerinin Hazırlanması

Tekirdağ, Pehlivan ve Flamura-85 buğday (*Triticum aestivum* L.) çeşitlerine ait tohumların olgun embriyolarından kurulacak olan kültürlerde rejenerasyonu teşvik etmek amacı ile MS besiyeri (Tablo 3.1) ve büyüme düzenleyicisi olarak 2,4-D kullanılarak kallus ve rejenerasyon besiyerleri hazırlandı (Tablo 3.2). Seçici besiyeri oluşturmak amacı ile 0; 0.05; 0.1; 0.15; 0.2; 0.25 M NaCl ilave edildi. Besiyerinin pH si 5.8 e ayarlandı ve 10 g/l agar ilave edilerek 1.2 atmosfer basınç, 121 °C'de 20 dakika otoklavda steril edildi. Steril besiyeri aseptik koşullarda steril kültür kaplarına döküldü.

3.2.2. Yüzey Sterilizasyonu

Her üç çeşide ait buğday tohumları yüzey sterilizasyonu için % 70 lik etil alkolde 5 dakika bekletilip 3 kez steril saf su ile yıkandıktan sonra, 20 dakika % 20 lik ticari çamaşır suyunda bekletildi ve 3-4 kez steril saf su ile yıkandı. Daha sonra tohumlar 35°C'lik etüvde 2 saat süre ile steril saf suda bekletilerek şişmeleri sağlandı [10].

3.2.3. Eksplantların Eldesi ve Kültür Ortamına Ekimi

Şişmeye bırakılan tohumların embriyoları, aseptik koşullar altında steril pens ve bistüri yardımı ile endospermlerinden ayrılarak içerisinde farklı konsantrasyonlarda NaCl bulunan kallus ve rejenerasyon besiyerlerine ekildi.

Kültürler, 26 °C'de, 16 saat gün / 8 saat karanlık gün periyoduna sahip büyüme kabinine yerleştirildi ve 28 gün boyunca gözlemleri yapıldı.

Tablo 3.1 Doku kültürleri için hazırlanan MS besiyerinin içeriği.

İnorganik Tuzlar	mg/l
Ammonium nitrate	1650.0
Borik acid	6.2
Calcium chloride anhydrous	332.2
Cobalt chloride 6H ₂ O	0.025
Cubric sulfate 5H ₂ O	0.025
Sodium EDTA	37.26
Ferrous sulfate 7H ₂ O	27.8
Magnesium sulfate	180.7
Manganase sulfate H ₂ O	16.9
Molydic acid	0.25
Potassium iodide	0.83
Potassium nitrate	1900.0
Potassium phosphate monobasic	170.0
Zinc sulfate 7H ₂ O	8.6

Tablo 3.2: Doku kültürü için hazırlanan kallus ve rejenerasyon besiyerinin içeriği

	Besiyeri	Büyüme Düzenleyicisi 2,4-D (mg/ml)	Şeker (g/l)
Kallus Besiyeri	MS	3	20
Rejenerasyon Besiyeri	MS	0.1	20

3.2.4. Kültür Ortamında Oluşan Kallusların ve Rejenere Olan Bitkilerin Taze Ağırlıklarının Saptanması

Kontrol ve farklı konsantrasyonlarda tuz stresine maruz bırakılan Tekirdağ, Pehlivan ve Flamura-85 çeşitlerine ait olgun buğday embriolarından kurulan kültürlerde oluşan kallusların ve rejenere olan bitkilerin taze ağırlıkları 28. günde tek tek tartılarak saptandı.

3.3. KLOROFİL MİKTARININ SAPTANMASI

Kontrol ve tuz stresi uygulanan kültürlerde rejenere olan bitkilerin klorofil miktarları saptandı. Bunun için rejenere olan kültürlerin yaprakları 1/20 (w/v) olacak şekilde % 80 lik soğuk aseton içerisinde soğuk havanda ekstre edildi. Homojenat 20 dakika 3000 rpm' de santrifüj edildi. Üst sıvı alındı ve klorofil a pigmenti için 645 nm, klorofil b pigmenti için 663 nm dalga boyunda absorpsiyon değerleri saptandı. Arnon (1949) formülünde yerine konularak mg total klorofil/l değerleri saptandı [49].

$$\text{Total klorofil} = 20.2 \times D_{645} + 8.02 \times D_{663}$$

$$\text{Klorofil a} = 12.7 \times D_{663} - 2.69 \times D_{645}$$

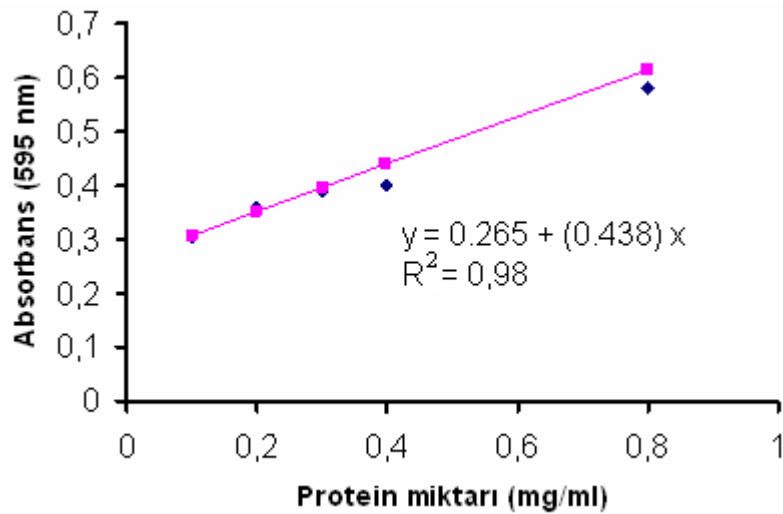
$$\text{Klorofil b} = 22.9 \times D_{645} - 4.68 \times D_{663}$$

3.4. PROTEİN MİKTARI, SÜPEROKSİT DİSMUTAZ, PEROKSİDAZ ve KATALAZ AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ

Kontrol ve tuz stresi uygulanan kültürlerde rejenera olan bitkilerden alınan yaprak örnekleri 1/10 (w/v) olacak şekilde fosfat tamponu (pH 7) içinde homojenize edildi. Homojenat +4°C'de 15 000 rpm'de 30 dakika santrifüj edildi. Üst sıvı suda çözünebilir protein miktarı, süperoksit dismutaz, peroksidaz ve katalaz aktivitelerinin tayini için kullanıldı.

3.5. SUDA ÇÖZÜNEBİLİR PROTEİN TAYİNİ

Suda çözünebilir proteinlerin tayini Bradford yöntemine göre yapıldı [50]. Bovin serum albumin (BSA)'nin farklı konsantrasyonlarından hazırlanan standartlar için 595 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçüldü ve BSA'nın konsantrasyonlarından yararlanılarak standart grafik çizildi ve doğru denklemi çıkarıldı (Şekil 3.1). Yaprak örneklerinden elde edilen ekstraksiyon üst sıvısından 40 µl alınarak Bradford belirteci ile 2 ml'ye tamamlandı ve 595 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçüm yapıldı. Elde edilen absorpsiyon değerleri standart grafik yardımı ile belirlenerek suda çözünebilir protein konsantrasyonu saptandı.



Şekil 3.1: BSA standardına göre çizilen kalibrasyon eğrisi.

3.6. SÜPEROKSİT DİSMUTAZ AKTİVİTESİ

Stres altında oluşan süperoksit radikalleri nitroblue tetrazolyum (NBT) ile reaksiyona girerek renkli formazon kristalleri oluşturur. Reaksiyon ortamında antioksidant enzimlerden olan süperoksit dismutaz varlığında süperoksit radikalleri ortamdan uzaklaştırıldığı için formazon oluşumu inhibe olmaktadır. Süperoksit dismutaz aktivitesini belirlemek için kültürlerden elde edilen ekstraksiyon üst sıvısından 30 µl alınarak üzerine 2 ml substrat tamponu ve riboflavin eklendi (Tablo 3.2). Bu karışım 15 dakika 15 W'lık floresan ışık altında bekletildikten sonra 560 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçüm yapıldı [31]. Blank (kör örnek) süperoksit dismutaz içermediği için inhibisyona uğramamış tepkime kabul edilip değeri 100 olarak alındı. Tüm örnekler için % inhibisyon değeri bunlara ait değerlerin blank ile oranlanarak 100 den çıkarılması sonucu aşağıdaki formüle göre hesaplandı [51].

$$\% \text{ İnhibisyon Değeri} = 100 - [\text{Örnek Absorbans} \times 100 / \text{Blank}]$$

3.7. PEROKSİDAZ ENZİM AKTİVİTESİ

Kültürlerden elde edilen ekstraksiyon üst sıvısından 25 µl alınarak üzerine 2 ml substrat tamponu eklendi (Tablo 3.3). Enzim aktivitesi ürünlerdeki artışın 470 nm dalga boyundaki absorpsiyonuna bakılarak spektrofotometrik olarak ölçüldü. Bunun için 10 sn aralıkla 2 dakika içerisinde absorbans değerleri saptandı [52].

Tablo 3.2: Süperoksit dismutaz enzim aktivitesini tespit etmek için kullanılan tampon içeriği

Tampon Adı	İçeriği
Ezme Tamponu pH 7	0.1 M Fosfat Tamponu
Substrat Tamponu	1.5 M Na ₂ CO ₃ 200 mM L-Metionin 2.25 mM NBT 3 mM Etilendiamintetraasetik asit (EDTA) 0.1 M Fosfat Tamponu distile H ₂ O
Katalizör	60 µM Riboflavin

Tablo 3.3: Peroksidaz enzim aktivitesini tespit etmek için kullanılan tampon içeriği

Tampon Adı	İçeriği
Ezme Tamponu pH 7	0.1 M Fosfat Tamponu
Substrat Tamponu	40mM H ₂ O ₂ % 1.6 guaiacol

3.8. PEROKSİDAZ JEL ELEKTROFOREZİ

Kültür ortamında rejenere olan bitkilerden izole edilen peroksidazın varlığını karakterize etmek için nativ poliakrilamid jel elektroforezi kullanıldı. Bunun için hazırlanan % 7 lik alt jel, jel kasetine döküldü ve 1 saat polimerizasyon için oda sıcaklığında bekletildi. Polimerize olan alt jelin üzerine hazırlanan % 3.125 lik 5 ml üst jel döküldü. Üst jelin polimerizasyonundan sonra jel kaseti nativ elektroforez tamponu içeren elektroforez tankına yerleştirildi. Örnekler yükleme tamponu ile 2:1 oranında karıştırılarak jele yüklendi (Tablo 3.4). Peroksidaz örnekleri 150 V'ta yaklaşık 5 saat yürütüldü. Elektroforez sonunda 40 mM H₂O₂ ve % 1.6 guaiacol içeren 0.1 M fosfat tamponu içerisinde 15 dakika çalkalandı ve peroksidaz enzimine ait bantların fotoğrafları çekildi [53].

3.9. KATALAZ ENZİM AKTİVİTESİ

Kültürlerden elde edilen ekstraksiyon üst sıvısından 2 ml alınarak üzerine 1 ml substrat tamponu eklendi (Tablo 3.5). Enzim aktivitesi substrat tamponundaki H₂O₂ konsantrasyonundaki azalışın 240 nm dalga boyundaki absorpsiyonuna bakılarak spektrofotometrik olarak ölçüldü. Bunun için 10 sn aralıkla 2 dakika içerisinde absorbans değerleri saptandı [54].

Tablo 3.4: Nativ Elektroforez Jelinin Hazırlanmasında Kullanılan Çözeltiler ve Tamponlar

Tampon Adı	İçeriği	Konsantrasyonu
% 7 lik Alt Jel	Akrilamid	% 7 T
	Metilenbisakrilamid	% 5 C _{bis}
	Tris	947 mM
	N,N,N',N'- Tetrametilenetilendiamin (TEMED)	20 µl
	Amonyum persülfat Riboflavin	% 0.06 %0.002
% 3.125 lik Üst Jel	Akrilamid	% 3.125 T
	Metilenbisakrilamid	% 5 C _{bis}
	Tris	158 mM
	N,N,N',N'- Tetrametilenetilendiamin TEMED	20µl % 0.06
	Amonyum persülfat Riboflavin	%0.002
Elektroforez Tamponu pH 8.89	Tris	37.6 mM
	Glisin	40 mM
Yükleme Tamponu	Sukroz	% 50
	Bromfenol Mavisi	% 0.1

Tablo 3.5: Katalaz enzim aktivitesini tespit etmek için kullanılan tampon içeriği

Tampon Adı	İçeriği
Ezme Tamponu pH 7	0.1 M Fosfat tamponu
Substrat Tamponu	30mM H ₂ O ₂ 0.05 M Fosfat tamponu pH 7

3.10. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

Kontrol ve farklı NaCl konsantrasyonları uygulanmış kültürlerde 28. günde oluşan kallus taze ağırlıklarının ve rejenere olan bitki taze ağırlıklarının istatistiksel değerlendirmeleri, varyans analizine göre yapıldı. İstatistiksel olarak anlamlı bulunan kallus ve bitkilerin taze ağırlıklarının karşılaştırılmasında Dunnet's testi uygulandı [55].

4. BULGULAR

4.1. TEKİRDAĞ ÇEŞİDİ

4.1.1. Tuz Stresinin Kallus Oluşumu ve Kallus Taze Ağırlığı Üzerine Etkisi

Tekirdağ çeşidine ait tohumların olgun embriyo eksplantlarından kurulan kallus kültürlerine 0, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2 ve 0.25 M NaCl uygulandı. Uygulanan tuz stresinin konsantrasyonuna bağlı olarak 28 gün süre ile kültürlerin gözlemleri yapıldı ve tuz stresinin Tekirdağ çeşidinin kallus kültürleri üzerine olan etkisi saptandı.

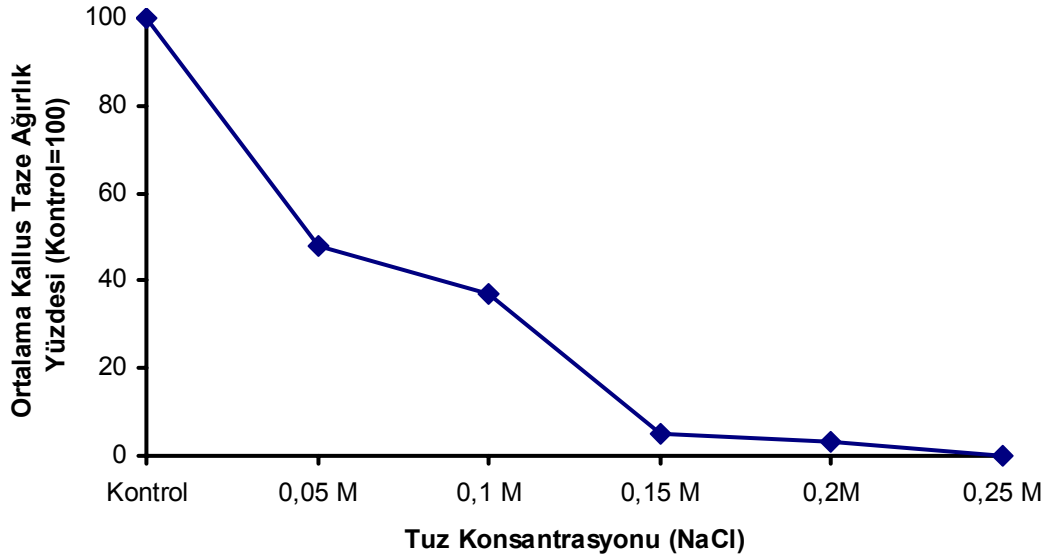
Tekirdağ çeşidine ait embriyo kültürlerinde 28. günde eksplant sayısı, kallus sayısı ve yüzdesi ile ortalama kallus taze ağırlıkları Tablo 4.1 de sunulmuştur. Kontrol ve 0.05 M NaCl uygulanan kültürlerde tüm eksplantlardan kallus oluşumu meydana gelmiştir. İlk tuz konsantrasyonu olan 0.05 M NaCl konsantrasyonunun kallus oluşumu üzerine her hangi bir etkisi görülmezken 0.1 M NaCl stresi uygulanan kültürlerde kallus oluşum yüzdesi % 96, 0.15 M NaCl konsantrasyonunda % 16, 0.2 M NaCl konsantrasyonunda % 12 dir. Kontrol grubu ile 0.05 M NaCl ve 0.1 M NaCl konsantrasyonları arasında belirgin bir fark görülmezken yüksek tuz konsantrasyonlarında kallus oluşumunun etkilendiği görülmektedir. 0.25 M NaCl konsantrasyonunda ise kallus oluşumu gözlenmemiştir.

Kontrol gruplarında 80.9 mg olan ortalama kallus taze ağırlığı, 0.05 M NaCl uygulamasında 39.1 mg, 0.1 M NaCl uygulamasında 30 mg, 0.15 M NaCl uygulamasında 4.1 mg ve 0.2 M NaCl uygulamasında ise 2.6 mg olarak tuz konsantrasyonlarına bağlı olarak bir azalma göstermiştir. Kontrol grubuna göre, ortalama kallus taze ağırlığı bakımından belirgin bir düşüşün olduğu 0.05 M NaCl konsantrasyonundan itibaren saptanmıştır. Tekirdağ çeşidine ait tohumların olgun embriyo eksplantlarından kurulan kültürlerde oluşan kallusların ortalama taze ağırlıkları, uygulanan NaCl konsantrasyonlarından etkilenmektedir (Şekil 4.1).

Tablo 4.1: Kontrol ve farklı konsantrasyonlarda NaCl uygulanan buğday bitkisine ait Tekirdağ çeşidinin 28 günlük kallus kültürlerinde, eksplant sayısı, kallus sayısı ve yüzdesi ile ortalama kallus taze ağırlığı.

Tuz Konsantrasyonları	Eksplant Sayısı	Oluşan Kallus		Ortalama Kallus Taze Ağırlığı (mg)
		Sayısı	%	
Kontrol	50	50	100	80.9 a*
0.05 M NaCl	50	50	100	39.1 b
0.1 M NaCl	50	48	96	30 b
0.15 M NaCl	50	8	16	4.1 c
0.2 M NaCl	50	6	12	2.6 c
0.25 M NaCl	50	-	-	-

*Aynı harfle gösterilmeyenler, kontrol ve uygulanan tüm tuz konsantrasyonlarında kallus taze ağırlık ortalamaları arasındaki farkların Dunnet's testine göre 0.05 seviyesinde önemli olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.1: Kontrol ve farklı konsantrasyonlarda NaCl stresi uygulanan buğday bitkisine ait Tekirdağ çeşidinden kurulan 28 günlük kültürlerde ortalama kallus taze ağırlık yüzdeleri.

Yapılan istatistiksel değerlendirmeler sonucunda uygulanan NaCl konsantrasyonlarının ortalama kallus taze ağırlığı üzerine etkisi önemli bulunmuştur ($P<0.05$).

Deney gruplarının birbiri ile karşılaştırılması Dunnet's testine göre yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre kallus taze ağırlığı bakımından kontrole göre uygulanan tüm tuz konsantrasyonlardaki farklar önemlidir ($P<0.05$). 0.05 M ve 0.1 M NaCl konsantrasyonlarındaki kallusların taze ağırlıkları arasındaki farklar önemsiz, kontrol grubu ile arasındaki farklar önemlidir. Ayrıca 0.15 M ve 0.2 M NaCl konsantrasyonlarındaki kallusların taze ağırlıkları arasındaki farklar önemsiz ancak kontrol ve 0.05 M ve 0.1 M NaCl konsantrasyonlarındaki kallusların taze ağırlıkları arasındaki farklar önemlidir ($P<0.05$).

4.1.2. Tuz Stresinin Rejenerasyon ve Bitki Taze Ağırlığı Üzerine Etkisi

Farklı konsantrasyonlardaki tuz stresinin etkisini belirlemek için Tekirdağ çeşidine ait tohumların olgun embriyolarından kurulan kültürlere 0, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2 ve 0.25 M NaCl uygulandı ve tuz konsantrasyonunun embriyo kültürlerinde rejenerasyon üzerine olan etkisi saptandı.

Farklı tuz konsantrasyonlarında rejenere olan Tekirdağ çeşidine ait 28 günlük embriyo kültürlerinde rejenere olan bitkilerin sayısı ve yüzdesi ile ortalama bitki taze ağırlıkları Tablo 4.2 de sunulmuştur. Tekirdağ çeşidinde tuz konsantrasyonlarındaki artışa bağlı olarak rejenerasyon yeteneğinde bir düşüşün meydana geldiği saptanmıştır. Tekirdağ çeşidinde kontrolde % 86 olan rejenerasyon yeteneği 0.1 M NaCl uygulamasında %36, 0.2 M NaCl uygulamasında ise % 4 tür. 0.25 M NaCl etkisinde ise kültür ortamında rejenerasyon meydana gelmemiştir. Uygulanan tuz konsantrasyonlarının eksplantların rejenere olmalarını etkilediği görülmektedir (Şekil 4.2). Tekirdağ çeşidine ait embriyo kültürlerinde 28. günde ortalama bitki taze ağırlıklarında NaCl uygulamasına bağlı olarak azalma görülmektedir. Kontrol gruplarında 268.3 mg olan ortalama bitki taze ağırlığı 0.05 M NaCl konsantrasyonunda 140.5 mg, 0.1 M NaCl konsantrasyonunda 63.3 mg, 0.15 M NaCl konsantrasyonunda 27.6 mg ve 0.2 M NaCl konsantrasyonunda ise 3 mg dir. Ortalama bitki taze ağırlığı 0.05 M NaCl uygulamasından itibaren belirgin bir düşüş göstermektedir (Şekil 4.3).

Tablo 4.2: Kontrol ve farklı konsantrasyonlarda NaCl uygulanan buğday bitkisine ait Tekirdağ çeşidinin 28 günlük embriyo kültürlerinde, eksplant sayısı, rejenere olan bitki sayısı ve yüzdesi ile ortalama bitki taze ağırlığı.

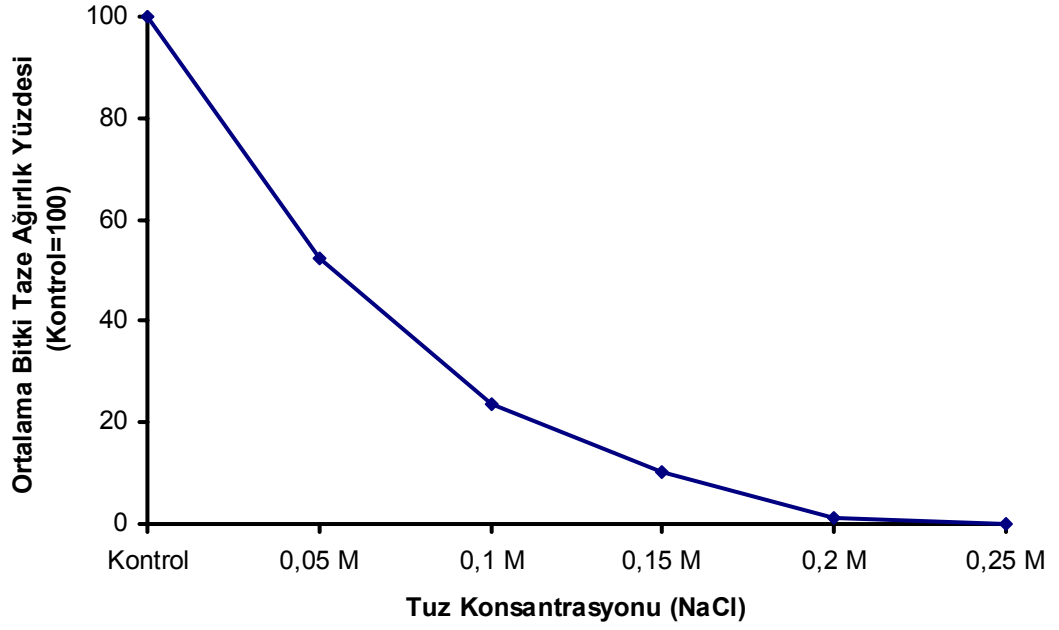
Tuz Konsantrasyonları	Eksplant Sayısı	Rejenere Olan Bitki		Ortalama Bitki Taze Ağırlığı (mg)
		Sayısı	%	
Kontrol	50	43	86	268.3 a*
0.05 M NaCl	50	31	62	140.5 b
0.1 M NaCl	50	18	36	63.3 c
0.15 M NaCl	50	10	20	27.6 cd
0.2 M NaCl	50	2	4	3 d
0.25 M NaCl	50	-	-	-

*Aynı harfle gösterilmeyenler, kontrol ve uygulanan tüm tuz konsantrasyonlarında bitki taze ağırlık ortalamaları arasındaki farkların Dunnet's testine göre 0.05 seviyesinde önemli olduğunu göstermektedir.

Yapılan istatistiksel değerlendirmeler sonucunda uygulanan NaCl konsantrasyonlarının ortalama bitki taze ağırlığı üzerine etkisi önemli bulunmuştur ($P<0.05$).

Deney gruplarının birbiri ile karşılaştırılması Dunnet's testine göre yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre bitki taze ağırlığı bakımından kontrol ile uygulanan tüm tuz konsantrasyonları arasındaki farklar önemlidir. 0.05 M NaCl konsantrasyonu ile kontrol ve diğer deney grupları arasındaki farklar önemlidir ($P<0.05$). 0.1 M NaCl ve 0.15 M NaCl konsantrasyonlarında rejenere olan bitkilerin taze ağırlıkları arasındaki farklar önemsiz, ancak kontrol grubu arasındaki farklar önemlidir. 0.15 M NaCl ve 0.2 M NaCl konsantrasyonlarında rejenere olan bitkilerin taze ağırlıkları arasındaki farklar önemsiz ancak kontrol grubu arasındaki farklar önemlidir ($P<0.05$).





Şekil 4.3: Kontrol ve farklı konsantrasyonlarda NaCl stresi uygulanan buğday bitkisine ait Tekirdağ çeşidinden kurulan 28 günlük kültürlerde ortalama bitki taze ağırlık yüzdeleri.

4.1.3. Tuz Stresinin Klorofil Miktarına Etkisi

Kontrol ve farklı konsantrasyonlarda tuz stresi uygulanarak kurulan Tekirdağ çeşidine ait kültürlerde rejenere olan bitkilerin yapraklarındaki klorofil miktarını saptamak amacı ile spektrofotometrik ölçümler yapıldı. 645 nm ve 663 nm dalga boylarında absorbans değerleri ölçülerek klorofil a, klorofil b ve total klorofil miktarları hesaplandı. Tablo 4.3 te görüldüğü gibi farklı konsantrasyonlarda tuz stresine maruz bırakılan kültürlerin yapraklarındaki total klorofil miktarlarında bir azalış saptandı. 0.2 M NaCl bulunan besiyerinde rejenere olan bitkilerin yapraklarında bulunan klorofil a, klorofil b ve total klorofil miktarı diğer deney gruplarındaki kültürlerde rejenere olan bitkilerin yapraklarındaki klorofil miktarlarına göre belirgin bir azalma göstermektedir.

Tablo 4.3: Kontrol ve farklı konsantrasyonlarda tuz stresi uygulanan 28 günlük buğday bitkisine ait Tekirdağ çeşidinden kurulan kültürlerin yapraklarındaki klorofil a, klorofil b ve total klorofil miktarları.

Tuz Konsantrasyonu	Yapraklardaki Klorofil Miktarı (mg / g x taze ağırlık)		
	Total Klorofil	Klorofil a	Klorofil b
Kontrol	0.748 ± 0.039	0.417 ± 0.029	0.331 ± 0.011
0.05 M NaCl	0.516 ± 0.016	0.282 ± 0.009	0.234 ± 0.024
0.1 M NaCl	0.482 ± 0.004	0.254 ± 0.003	0.228 ± 0.002
0.15 M NaCl	0.334 ± 0.014	0.183 ± 0.008	0.151 ± 0.007
0.2 M NaCl	0.220 ± 0.028	0.114 ± 0.002	0.106 ± 0.027

± Standart Sapma

4.1.4. Tuz Stresinin Suda Çözünabilir Protein Miktarı Üzerine Etkisi

Kontrol ve farklı konsantrasyonlarda tuz stresi uygulanarak kurulan Tekirdağ çeşidine ait kültürlerde rejenere olan bitkilerin yapraklarındaki suda çözünabilir protein derişimi 595 nm dalga boyundaki spektrofotometrik absorbans değerleri kullanılarak standart grafik yardımı ile saptandı. Tablo 4.4 te görüldüğü gibi farklı konsantrasyonlarda tuz stresine maruz bırakılan kültürlerin yapraklarındaki suda çözünabilir protein miktarı uygulanan tuzun konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak kontrol gruplarına göre tüm deney gruplarında azalış göstermektedir. Yüksek tuz konsantrasyonu uygulanan kültürlerdeki suda çözünabilir protein miktarları, 0.05 M NaCl ve 0.1 M NaCl uygulanan gruplardaki suda çözünabilir protein miktarına göre bir artış göstermiştir.

4.1.5. Tuz Stresinin Süperoksit Dismutaz Aktivitesine Etkisi

Kontrol ve farklı konsantrasyonlarda tuz stresi uygulanarak kurulan Tekirdağ çeşidine ait kültürlerde rejenere olan bitkilerin yapraklarındaki süperoksit dismutaz aktivitesini saptamak amacı ile 560 nm dalga boyunda spektrofotometrik absorbans değerleri ölçüldü. Tablo 4.5 te görüldüğü gibi farklı konsantrasyonlarda tuz stresini uygulanan kültürlerin yapraklarındaki süperoksit dismutaz aktivitesi tuz konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak kontrol gruplarına göre tüm gruplarda belirgin bir artış göstermekle birlikte en fazla süperoksit dismutaz aktivitesi 0.2 M tuz stresi uygulanan deney gruplarında saptandı.

Tablo 4.4: Buğday bitkisine ait Tekirdağ çeşidinde rejenere olan bitkilerdeki suda çözünebilir protein miktarları.

Tuz Konsantrasyonları	Suda çözünebilir protein miktarları (mg / g × taze ağırlık)
Kontrol	1.91
0.05 M NaCl	0.83
0.1 M NaCl	0.87
0.15 M NaCl	1.40
0.2 M NaCl	1.22

Tablo 4.5: Buğday bitkisine ait Tekirdağ çeşidinde rejenere olan bitkilerdeki süperoksit dismutaz aktivitesi.

Tuz Konsantrasyonu	% İnhibisyon Değeri
Kontrol	13.7
0.05 M NaCl	16.31
0.1 M NaCl	30.02
0.15 M NaCl	26.71
0.2 M NaCl	38.06

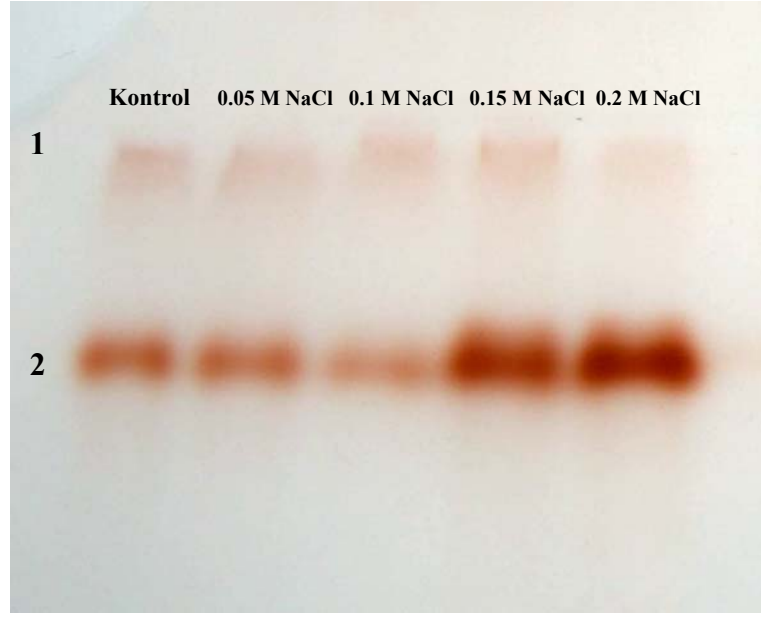
4.1.6. Tuz Stresinin Peroksidaz Enzim Aktivitesine Etkisi

Tekirdağ çeşidine ait buğday tohumlarının olgun emriyolarından kurulan doku kültürlerinde kontrol ve farklı konsantrasyonlarda tuz stresi uygulanan kültürlerin rejenere olan bitkilerin yapraklarındaki peroksidaz aktivitesini saptamak amacı ile yapılan spektrofotometrik ölçüm sonuçları Tablo 4.6 da verilmiştir. Uygulanan tuz stresine yanıtta peroksidaz enzim aktivitesinin kontrol grubuna göre artış gösterdiği saptanmıştır.

Tablo 4.6. Buğday bitkisine ait Tekirdağ çeşidinde rejenere olan bitkilerdeki peroksidaz enzim aktivitesi.

Tuz Konsantrasyonları	Peroksidaz enzim aktivitesi ($\Delta A / \text{dak.} \times g \times \text{taze ağırlık}$)
Kontrol	67.61
0.05 M NaCl	94.07
0.1 M NaCl	105.82
0.15 M NaCl	112.37
0.2 M NaCl	118.76

Peroksidaz varlığını moleküler düzeyde göstermek amacı ile nativ poliakrilamid jel elektroforezi yapıldı. Elektroforez sonucunda Tekirdağ çeşidine ait jel üzerinde kontrol ve NaCl stresi uygulanan tüm deney gruplarında iki izoenzim bandı görüldü. Artan NaCl konsantrasyonuna bağlı olarak polimorfizm gözlenmezken 0.15 M ve 0.2 M NaCl stresine maruz bırakılan bitkilerde 2. izoenzim bantları daha yoğun olarak belirlendi (Şekil 4.4).



Şekil 4.4: Buğday bitkisine ait Tekirdağ çeşidinde rejenere olan bitkilerdeki peroksidaz aktivitesinin nativ poliakrilamid jel görüntüsü.

4.1.7. Tuz Stresinin Katalaz Enzim Aktivitesine Etkisi

Kontrol ve farklı konsantrasyonlarda tuz stresi uygulanarak kurulan Tekirdağ çeşidine ait kültürlerde rejenere olan bitkilerin yapraklarındaki katalaz aktivitesini saptamak amacı ile spektrofotometrik ölçümler yapıldı. 240 nm dalga boyunda absorbanans değeri ölçülerek $\Delta A / \text{dak} \times \text{g} \times \text{taze}$ ağırlık formülüne göre katalaz aktivitesi hesaplandı. Tablo 4.7 de görüldüğü gibi kontrol gruplarında $0.25 \Delta A / \text{dak} \times \text{g} \times \text{taze}$ ağırlık olan katalaz aktivitesi uygulanan tuz konsantrasyonuna bağlı olarak artış göstererek 0.1 M NaCl uygulamasında $0.35 \Delta A / \text{dak} \times \text{g} \times \text{taze}$ ağırlığa 0.2 M NaCl uygulamasında ise $0.73 \Delta A / \text{dak} \times \text{g} \times \text{taze}$ ağırlığa yükselerek rejenere olan bitkilerin yapraklarında belirgin bir artış gösterdiği saptanmıştır .

Tablo 4.7: Buğday bitkisine ait Tekirdağ çeşidinde rejenere olan bitkilerdeki katalaz enzim aktivitesi.

Tuz Konsantrasyonları	Katalaz enzim aktivitesi ($\Delta A / \text{dak.} \times \text{g} \times \text{taze ağırlık}$)
Kontrol	0.25
0.05 M NaCl	0.28
0.1 M NaCl	0.35
0.15 M NaCl	0.40
0.2 M NaCl	0.73

4.2. PEHLİVAN ÇEŞİDİ

4.2.1. Tuz Stresinin Kallus Oluşumu ve Kallus Taze Ağırlığı Üzerine Etkisi

Pehlivan çeşidine ait tohumların olgun embriyo eksplantlarından kurulan kallus kültürlerine 0, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2 ve 0.25 M NaCl uygulandı. Uygulanan tuz stresinin konsantrasyonuna bağlı olarak 28 gün süre ile kültürlerin gözlemleri yapıldı ve tuz stresinin Pehlivan çeşidinin kallus kültürleri üzerine olan etkisi saptandı.

Pehlivan çeşidine ait embriyo kültürlerinde 28. günde eksplant sayısı, kallus sayısı ve yüzdesi ile ortalama kallus taze ağırlıkları Tablo 4.8 de sunulmuştur. Kültür ortamına ekilen eksplantların kallus oluşturma yüzdeleri kontrol grubunda % 100 iken 0.05 M NaCl uygulamasında % 30, 0.1 M NaCl konsantrasyonunda % 18, 0.15 M NaCl konsantrasyonunda % 10, 0.2 M NaCl konsantrasyonunda ise % 18 dir. 0.25 M NaCl konsantrasyonunda ise kallus oluşumu gözlenmemiştir. Tuz stresi uygulanan tüm gruplarda kontrol gruplarına göre kallus oluşumunun etkilendiği görülmektedir. Uygulanan ilk tuz konsantrasyonu olan 0.05 M NaCl konsantrasyonundan itibaren bu etki görülmektedir.

Kontrol gruplarında 56.4 mg olan ortalama kallus taze ağırlığı, 0.05 M NaCl uygulamasında 10.9 mg, 0.1 M NaCl uygulamasında 4.7 mg, 0.15 M NaCl uygulamasında 2.3 mg ve 0.2 M NaCl uygulamasında ise 3.7 mg dir. Kontrol grubuna göre, ortalama kallus taze ağırlığı bakımından belirgin bir düşüş 0.05 M NaCl konsantrasyonundan itibaren saptanmıştır. Pehlivan çeşidine ait tohumların olgun embriyo eksplantlarından kurulan kültürlerde oluşan kallusların ortalama taze ağırlıkları, uygulanan NaCl konsantrasyonlarından etkilenmektedir (Şekil 4.5).

Yapılan istatistiksel değerlendirmeler sonucunda uygulanan NaCl konsantrasyonlarının ortalama kallus taze ağırlığı üzerine etkisi önemli bulunmuştur ($P < 0.05$).

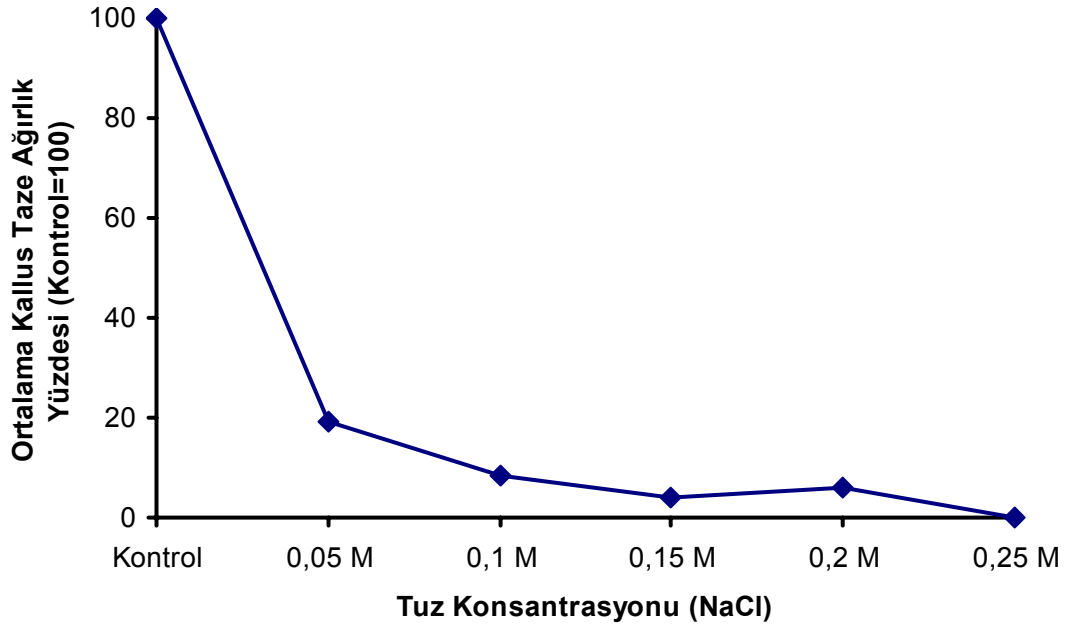
Deney gruplarının birbiri ile karşılaştırılması Dunnet's testine göre yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre kallus taze ağırlığı bakımından kontrole ile uygulanan tüm tuz

konsantrasyonlardaki farklar önemlidir ($P<0.05$). Farklı konsantrasyonlarda NaCl uygulanan tüm deney gruplarındaki kallus taze ağırlıkları arasındaki farklar istatistiksel bakımdan önemsiz bulunmuştur ($P<0.05$)

Tablo 4.8: Kontrol ve farklı konsantrasyonlarda NaCl uygulanan buğday bitkisine ait Pehlivan çeşidinin 28 günlük kallus kültürlerinde, eksplant sayısı, kallus sayısı ve yüzdesi ile ortalama kallus taze ağırlığı.

Tuz Konsantrasyonları	Eksplant Sayısı	Oluşan Kallus		Ortalama Kallus Taze Ağırlığı (mg)
		Sayısı	%	
Kontrol	50	50	100	56.4 a*
0.05 M NaCl	50	15	30	10.9 b
0.1 M NaCl	50	9	18	4.7 b
0.15 M NaCl	50	5	10	2.3 b
0.2 M NaCl	50	9	18	3.7 b
0.25 M NaCl	50	-	-	-

* Aynı harfle gösterilmeyenler, kontrol ve farklı konsantrasyonlarda tuz uygulanan deney gruplarındaki kallus taze ağırlık ortalamaları arasındaki farkların, Dunnet's testine göre 0.05 seviyesinde önemli olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.5: Kontrol ve farklı konsantrasyonlarda NaCl stresi uygulanan buğday bitkisine ait Pehlivan çeşidinden kurulan 28 günlük kültürlerde ortalama kallus taze ağırlık yüzdesi.

4.2.2. Tuz Stresinin Rejenerasyon ve Bitki Taze Ağırlığı Üzerine Etkisi

Farklı konsantrasyonlardaki tuz stresinin etkisini belirlemek için Pehlivan çeşidine ait tohumların olgun embriyolarından kurulan kültürler 0, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2 ve 0.25 M NaCl uygulandı ve tuz konsantrasyonunun embriyo kültürlerinde rejenerasyon üzerine olan etkisi saptandı.

Farklı tuz konsantrasyonlarında rejenere olan Pehlivan çeşidine ait 28 günlük embriyo kültürlerinde rejenere olan bitkilerin sayısı ve yüzdesi ile ortalama bitki taze ağırlıkları Tablo 4.9 da sunulmuştur. Pehlivan çeşidinde tuz konsantrasyonlarındaki artışa bağlı olarak rejenerasyon yeteneğinde bir düşüşün meydana geldiği saptanmıştır. Pehlivan çeşidinde kontrolde % 82 olan rejenerasyon yeteneği 0.1 M NaCl uygulamasında % 44, 0.2 M NaCl uygulamasında ise % 4 tür. 0.25 M NaCl etkisinde ise kültür ortamında rejenerasyon meydana gelmemiştir. Uygulanan tuz konsantrasyonlarının eksplantların rejenere olmalarını etkilediği görülmektedir (Şekil 4.6 ve Şekil 4.7). Pehlivan çeşidine ait embriyo kültürlerinde 28. günde ortalama bitki taze ağırlıklarında NaCl uygulamasına bağlı olarak azalma görülmektedir. Kontrol gruplarında 271.3 mg olan ortalama bitki taze ağırlığı 0.05 M NaCl konsantrasyonunda 132 mg, 0.1 M NaCl konsantrasyonunda 80.2 mg, 0.15 M NaCl konsantrasyonunda 21.3 mg ve 0.2 M NaCl konsantrasyonunda ise 0.93 mg dır. Ortalama bitki taze ağırlığı 0.05 M NaCl uygulamasından itibaren belirgin bir düşüş göstermektedir (Şekil 4.8).

Yapılan istatistiksel değerlendirmeler sonucunda uygulanan NaCl konsantrasyonlarının ortalama bitki taze ağırlığı üzerine etkisi önemli bulunmuştur ($P < 0.05$).

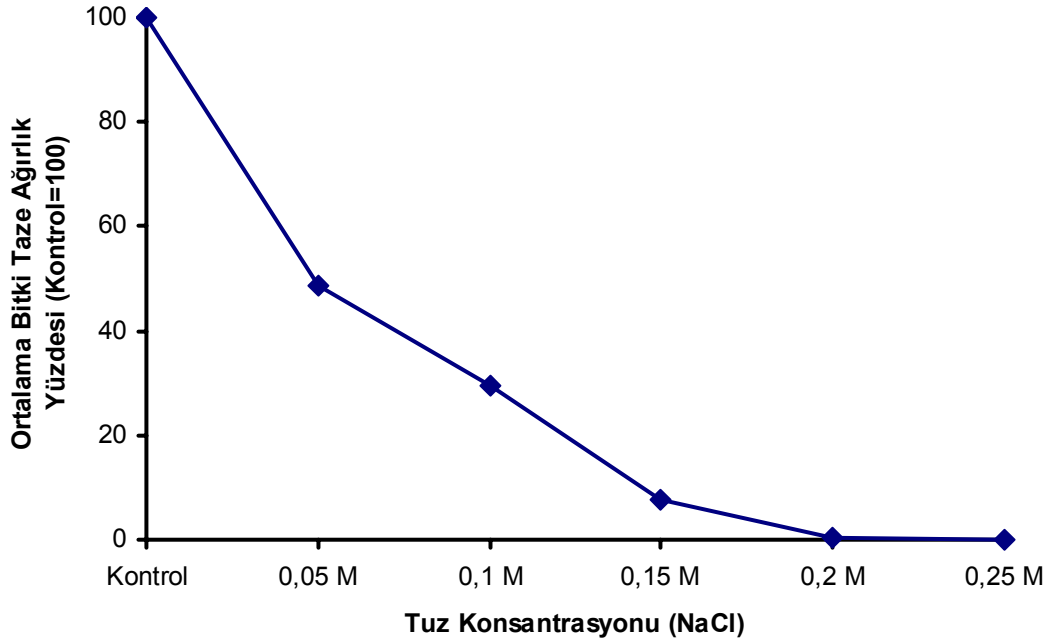
Deney gruplarının birbiri ile karşılaştırılması Dunnet's testine göre yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre bitki taze ağırlığı bakımından kontrol ile uygulanan tüm tuz konsantrasyonları arasındaki farklar önemlidir. 0.05 M NaCl konsantrasyonu ile 0.1 M NaCl konsantrasyonlarında rejenere olan bitkilerin taze ağırlıkları arasındaki farklar önemsiz, ancak kontrol grubu arasındaki farklar önemlidir. 0.1 M NaCl ve 0.15 M NaCl konsantrasyonlarında rejenere olan bitkilerin taze ağırlıkları arasındaki farklar önemsiz, ancak kontrol grubu arasındaki farklar önemlidir. 0.15 M NaCl ve 0.2 M NaCl konsantrasyonlarında rejenere olan bitkilerin taze ağırlıkları arasındaki farklar önemsiz, ancak kontrol grubu arasındaki farklar önemlidir.

farklar önemsiz ancak 0.2 M NaCl konsantrasyonlarında rejenere olan bitkilerin taze ağırlıkları ile kontrol ve diğer deney grupları arasındaki farklar önemlidir ($P<0.05$).

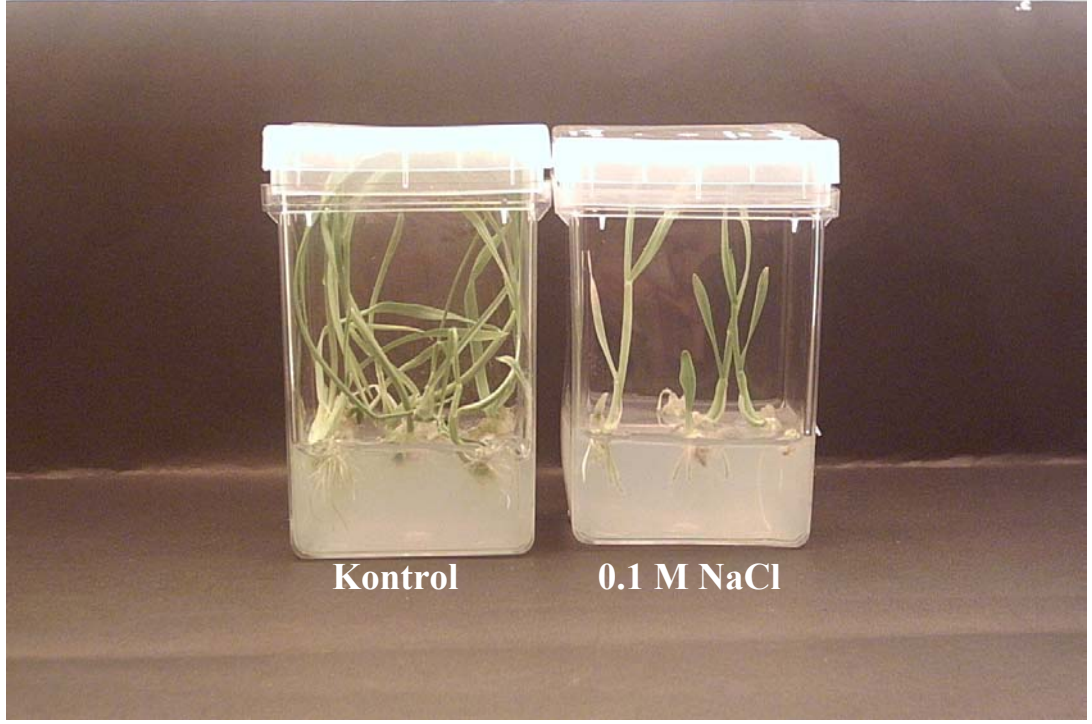
Tablo 4.9: Kontrol ve farklı konsantrasyonlarda NaCl uygulanan buğday bitkisine ait Pehlivan çeşidinin 28 günlük embriyo kültürlerinde, eksplant sayısı, rejenere olan bitki sayısı ve yüzdesi ile ortalama bitki taze ağırlığı.

Tuz Konsantrasyonları	Eksplant Sayısı	Rejenere Olan Bitki		Ortalama Bitki Taze Ağırlığı (mg)
		Sayısı	%	
Kontrol	50	41	82	271.3 a*
0.05 M NaCl	50	28	56	132 b
0.1 M NaCl	50	22	44	80.2 bc
0.15 M NaCl	50	15	30	21.3 cd
0.2 M NaCl	50	2	4	0.93 d
0.25 M NaCl	50	-	-	-

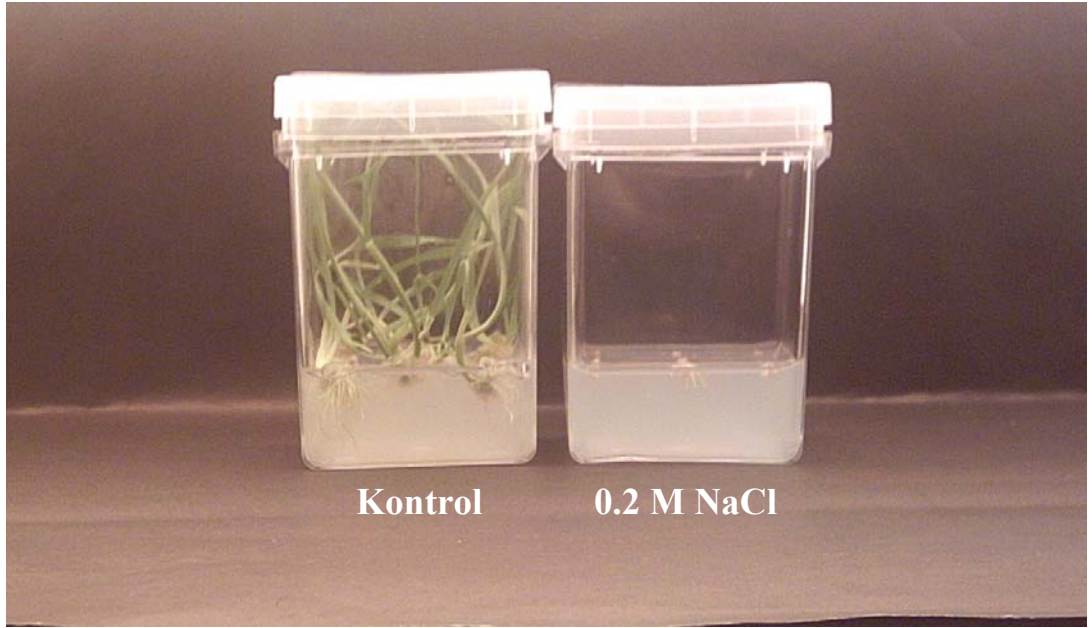
* Aynı harfle gösterilmeyenler, kontrol ve farklı konsantrasyonlarda tuz uygulanan deney gruplarındaki kallus taze ağırlık ortalamaları arasındaki farkların, Dunnet's testine göre 0.05 seviyesinde önemli olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.8: Kontrol ve farklı konsantrasyonlarda NaCl stresi uygulanan buğday bitkisinin Pehlivan çeşidinden kurulan 28 günlük kültürlerde ortalama bitki taze ağırlık yüzdeleri.



Şekil 4.6: Kontrol ve 0.1 M NaCl stresi uygulanmış buğday bitkisinin Pehlivan çeşidine ait olgun embriyo eksplantlarından kurulan 28 günlük kültürler.



Şekil 4.7: Kontrol ve 0.2 M NaCl stresi uygulanmış buğday bitkisinin Pehlivan çeşidine ait olgun embriyo eksplantlarından kurulan 28 günlük kültürler.

4.2.3. Tuz Stresinin Klorofil Miktarına Etkisi

Kontrol ve farklı konsantrasyonlarda tuz stresi uygulanarak kurulan Pehlivan çeşidine ait kültürlerde rejenere olan bitkilerin yapraklarındaki klorofil miktarını saptamak amacı ile spektrofotometrik ölçümler yapıldı. 645 nm ve 663 nm dalga boylarında absorbans değerleri ölçülerek klorofil a, klorofil b ve total klorofil miktarları hesaplandı. Tablo 4.10 da görüldüğü gibi farklı konsantrasyonlarda tuz stresine maruz bırakılan kültürlerin yapraklarındaki total klorofil miktarlarında bir azalış saptandı. Yüksek tuz konsantrasyonu olarak uygulanan 0.2 M NaCl konsantrasyonunda rejenere olan bitkilerin yapraklarında bulunan klorofil a, klorofil b ve total klorofil miktarı diğer deney gruplarındaki kültürlerde rejenere olan bitkilerin yapraklarındaki klorofil miktarlarına göre belirgin bir düşüş göstermektedir.

Tablo 4.10: Kontrol ve farklı konsantrasyonlarda tuz stresi uygulanan 28 günlük buğday bitkisine ait Pehlivan çeşidinden kurulan kültürlerin yapraklarındaki klorofil a, klorofil b ve total klorofil miktarları.

Tuz Konsantrasyonu	Yapraklardaki Klorofil Miktarı (mg / g x taze ağırlık)		
	Total Klorofil	Klorofil a	Klorofil b
Kontrol	0.838 ± 0.033	0.485 ± 0.23	0.353 ± 0.01
0.05 M NaCl	0.639 ± 0.006	0.325 ± 0.004	0.314 ± 0.002
0.1 M NaCl	0.359 ± 0.0063	0.184 ± 0.003	0.175 ± 0.0034
0.15 M NaCl	0.297 ± 0.0062	0.150 ± 0.037	0.147 ± 0.003
0.2 M NaCl	0.141 ± 0.023	0.094 ± 0.007	0.047 ± 0.02

± Standart Sapma

4.2.4. Tuz Stresinin Suda Çözünebilir Protein Miktarı Üzerine Etkisi

Kontrol ve farklı konsantrasyonlarda tuz stresi uygulanarak kurulan Pehlivan çeşidine ait kültürlerde rejenere olan bitkilerin yapraklarındaki suda çözünebilir protein derişimi 595 nm dalga boyundaki spektrofotometrik absorbans değerleri kullanılarak standart grafik yardımı ile saptandı. Tablo 4.11 de görüldüğü gibi farklı konsantrasyonlarda tuz stresine maruz bırakılan kültürlerin yapraklarındaki suda çözünebilir protein miktarı uygulanan tuzun konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak kontrol gruplarına göre tüm deney gruplarında azalış görülmekle birlikte en fazla etkilenen deney grubunun. 0.1 M NaCl konsantrasyonunda olduğu saptanmıştır.

Tablo 4.11: Buğday bitkisine ait Pehlivan çeşidinde rejenere olan bitkilerdeki suda çözünebilir protein miktarları.

Tuz Konsantrasyonları	Suda çözünebilir protein miktarları (mg / g × taze ağırlık)
Kontrol	1.40
0.05 M NaCl	0.59
0.1 M NaCl	0.30
0.15 M NaCl	0.66
0.2 M NaCl	0.52

4.2.5. Tuz Stresinin Süperoksit Dismutaz Aktivitesine Etkisi

Kontrol ve farklı konsantrasyonlarda tuz stresi uygulanarak kurulan Pehlivan çeşidine ait kültürlerde rejenere olan bitkilerin yapraklarındaki süperoksit dismutaz aktivitesini saptamak amacı ile 560 nm dalga boyunda spektrofotometrik absorbans değerleri ölçüldü. Tablo 4.12 de görüldüğü gibi farklı konsantrasyonlarda tuz stresini uygulanan kültürlerin yapraklarındaki süperoksit dismutaz aktivitesi tuz konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak kontrol gruplarına göre tüm gruplarda belirgin bir artış göstermekle birlikte en fazla süperoksit dismutaz aktivitesi 0.2 M tuz stresini uygulanan deney gruplarında saptandı.

Tablo 4.12: Buğday bitkisine ait Pehlivan çeşidinde rejenere olan bitkilerdeki süperoksit dismutaz aktivitesi.

Tuz Konsantrasyonu	% İnhibisyon Değeri
Kontrol	8.27
0.05 M NaCl	17.26
0.1 M NaCl	21.98
0.15 M NaCl	18.44
0.2 M NaCl	30.73

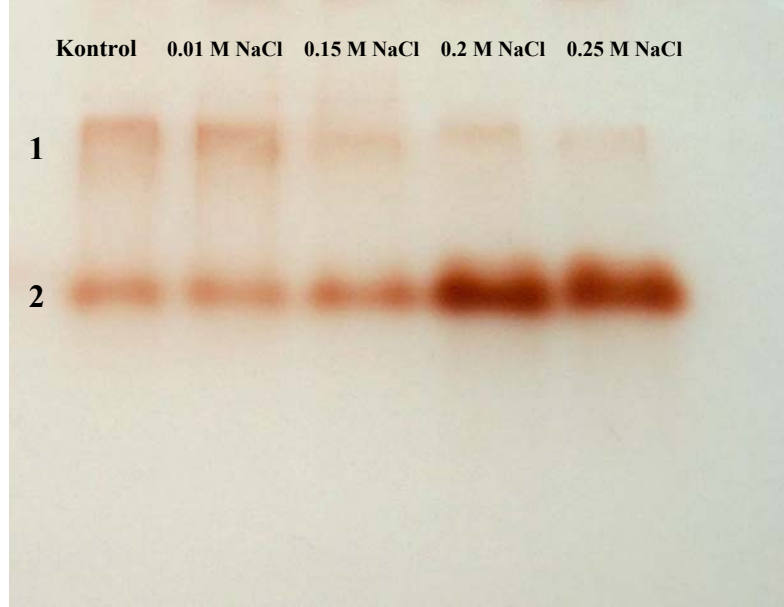
4.2.6. Tuz Stresinin Peroksidaz Enzim Aktivitesine Etkisi

Kontrol ve farklı konsantrasyonlarda tuz stresi uygulanarak kurulan Pehlivan çeşidine ait kültürlerde rejenere olan bitkilerin yapraklarındaki peroksidaz enzim aktivitesini saptamak amacı ile yapılan spektrofotometrik ölçüm sonuçları Tablo 4.13 te verilmiştir. Kontrol grubunda 53.47 $\Delta A / \text{dak.} \times \text{g} \times \text{taze ağırlık}$ olan peroksidaz aktivitesi uygulanan tuz konsantrasyonuna bağlı olarak bir artış göstererek 0.1 M NaCl konsantrasyonunda 99.50 $\Delta A / \text{dak.} \times \text{g} \times \text{taze ağırlık}$, 0.2 M NaCl konsantrasyonunda ise 114.56 $\Delta A / \text{dak.} \times \text{g} \times \text{taze ağırlık}$ değerine ulaşmıştır.

Tablo 4.13: Buğday bitkisine ait Pehlivan çeşidinde rejenere olan bitkilerdeki peroksidaz enzim aktivitesi.

Tuz Konsantrasyonları	Peroksidaz enzim aktivitesi ($\Delta A / \text{dak.} \times \text{g} \times \text{taze ağırlık}$)
Kontrol	53.47
0.05 M NaCl	97.43
0.1 M NaCl	99.50
0.15 M NaCl	104.03
0.2 M NaCl	114.56

Peroksidaz varlığını moleküler düzeyde göstermek amacı ile nativ poliakrilamid jel elektroforezi kullanıldı. Elektroforez sonucunda jel üzerinde kontrol ve farklı konsantrasyonlarda NaCl stresi uygulanan deney gruplarına ait iki izoenzim bandı görüldü. Artan NaCl konsantrasyonuna bağlı olarak polimorfizm gözlenmezken 0.15 M ve 0.2 M NaCl stresine maruz bırakılan bitkilerde 2. izoenzim bantları daha yoğun olarak belirlendi (Şekil 4.9).



Şekil 4.9: Buğday bitkisine ait Pehlivan çeşidinde rejenere olan bitkilerdeki peroksidaz aktivitesinin nativ poliakrilamid jel görüntüsü.

4.2.7. Tuz Stresinin Katalaz Enzim Aktivitesine Etkisi

Kontrol ve farklı konsantrasyonlarda tuz stresi uygulanarak kurulan Pehlivan çeşidine ait kültürlerde rejenere olan bitkilerin yapraklarındaki katalaz aktivitesini saptamak amacı ile spektrofotometrik ölçümler yapıldı. 240 nm dalga boyunda absorpsiyon değeri ölçülerek $\Delta A / \text{dak} \times \text{g} \times \text{taze ağırlık}$ formülüne göre katalaz aktivitesi hesaplandı. Tablo 4.14 te görüldüğü gibi kontrol gruplarında 0,32 $\Delta A / \text{dak} \times \text{g} \times \text{taze ağırlık}$ olan katalaz aktivitesi uygulanan tuz konsantrasyonuna bağlı olarak artış göstererek 0.1 M NaCl uygulamasında 0.39 $\Delta A / \text{dak} \times \text{g} \times \text{taze ağırlık}$ 0.2 M NaCl uygulamasında ise 0.49 $\Delta A / \text{dak} \times \text{g} \times \text{taze ağırlık}$ yükselerek rejenere olan bitkilerin yapraklarında belirgin bir artış gösterdiği saptanmıştır .

Tablo 4.14: Buğday bitkisine ait Pehlivan çeşidinde rejenere olan bitkilerdeki katalaz enzim aktivitesi.

Tuz Konsantrasyonları	Katalaz enzim aktivitesi ($\Delta A / \text{dak} \times \text{g} \times \text{taze ağırlık}$)
Kontrol	0.32
0.05 M NaCl	0.37
0.1 M NaCl	0.39
0.15 M NaCl	0.36
0.2 M NaCl	0.49

4.3. FLAMURA-85 ÇEŞİDİ

4.3.1. Tuz Stresinin Kallus Oluşumu ve Kallus Taze Ağırlığı Üzerine Etkisi

Flamura-85 çeşidine ait tohumların olgun embriyo eksplantlarından kurulan kallus kültürlerine 0, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2 ve 0.25 M NaCl uygulandı. Uygulanan tuz stresinin konsantrasyonuna bağlı olarak 28 gün süre ile kültürlerin gözlemleri yapıldı ve tuz stresinin Flamura-85 çeşidinin kallus kültürleri üzerine olan etkisi saptandı.

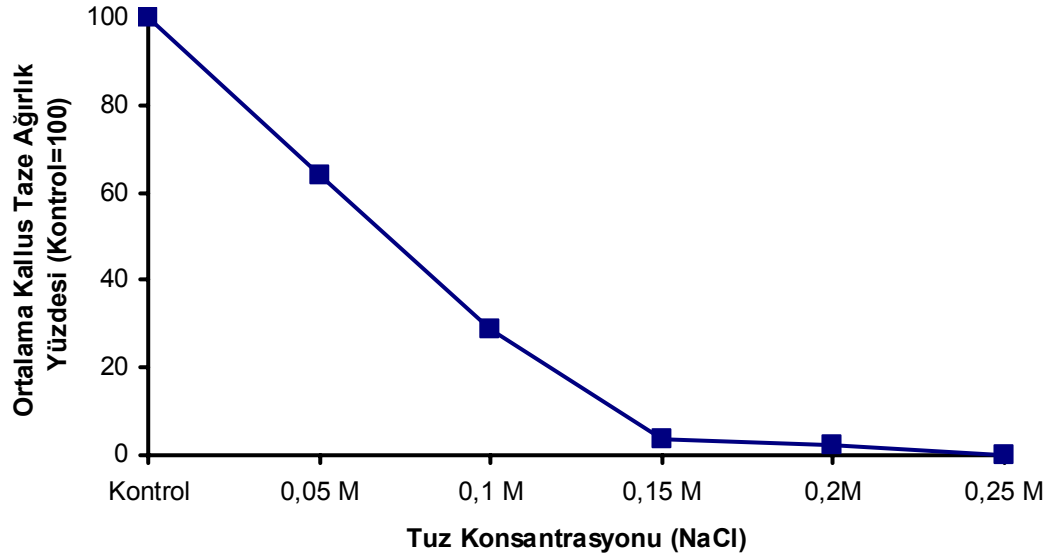
Flamura-85 çeşidine ait embriyo kültürlerinde 28. günde eksplant sayısı, kallus sayısı ve yüzdesi ile ortalama kallus taze ağırlıkları Tablo 4.15 te sunulmuştur. Kontrol ve 0.05 M NaCl uygulanan kültürlerde tüm eksplantlardan kallus oluşumu meydana gelmiştir. İlk tuz konsantrasyonu olan 0.05 M NaCl konsantrasyonunun kallus oluşumu üzerine her hangi bir etkisi görülmezken 0.1 M NaCl stresi uygulanan kültürlerde kallus oluşum yüzdesi % 72, 0.15 M NaCl konsantrasyonunda % 10, 0.2 M NaCl konsantrasyonunda % 6 dır. 0.1 M NaCl uygulamasından itibaren kallus oluşumunun etkilendiği görülmektedir. 0.25 M NaCl konsantrasyonunda ise kallus oluşumu gözlenmemiştir.

Kontrol gruplarında 47.8 mg olan ortalama kallus taze ağırlığı, 0.05 M NaCl uygulamasında 30.1 mg, 0.1 M NaCl uygulamasında 13.7 mg, 0.15 M NaCl uygulamasında 1.8 mg ve 0.2 M NaCl uygulamasında ise 1 mg olarak tuz konsantrasyonlarına bağlı olarak bir azalma göstermiştir. Kontrol grubuna göre, ortalama kallus taze ağırlığı bakımından belirgin bir düşüşün olduğu 0.05 M NaCl konsantrasyonundan itibaren saptanmıştır. Flamura-85 çeşidine ait tohumların olgun embriyo eksplantlarından kurulan kültürlerde oluşan kallusların ortalama taze ağırlıkları, uygulanan NaCl konsantrasyonlarından etkilenmektedir (Şekil 4.10).

Tablo 4.15: Kontrol ve farklı konsantrasyonlarda NaCl uygulanan buğday bitkisine ait Flamura-85 çeşidinin 28 günlük kallus kültürlerinde, eksplant sayısı, kallus sayısı ve yüzdesi ile ortalama kallus taze ağırlığı.

Tuz Konsantrasyonları	Eksplant Sayısı	Oluşan Kallus		Ortalama Kallus Taze Ağırlığı (mg)
		Sayısı	%	
Kontrol	50	50	100	47.8 a*
0.05 M NaCl	50	50	100	30.1 b
0.1 M NaCl	50	36	72	13.7 c
0.15 M NaCl	50	5	10	1.8 d
0.2 M NaCl	50	3	6	1 d
0.25 M NaCl	50	-	-	-

* Aynı harfle gösterilmeyenler, kontrol ve farklı konsantrasyonlarda tuz uygulanan deney gruplarındaki kallus taze ağırlık ortalamaları arasındaki farkların, Dunnet's testine göre 0.05 seviyesinde önemli olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.10: Kontrol ve farklı konsantrasyonlarda NaCl stresi uygulanan buğday bitkisinin Flamura-85 çeşidinden kurulan 28 günlük kültürlerde ortalama kallus taze ağırlık yüzdeleri.

Yapılan istatistiksel değerlendirmeler sonucunda uygulanan NaCl konsantrasyonlarının ortalama kallus taze ağırlığı üzerine etkisi önemli bulunmuştur ($P<0.05$).

Deney gruplarının birbiri ile karşılaştırılması Dunnet's testine göre yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre kallus taze ağırlığı bakımından kontrole göre uygulanan tüm tuz konsantrasyonlardaki farklar önemlidir ($P<0.05$). 0.15 M ve 0.2 M NaCl konsantrasyonlarındaki kallusların taze ağırlıkları arasındaki farklar önemsiz ancak kontrol ve bu konsantrasyonların, 0.05 M NaCl ve 0.1 M NaCl konsantrasyonlarındaki kallusların taze ağırlıkları ile arasındaki farklar önemlidir ($P<0.05$).

4.3.2. Tuz Stresinin Rejenerasyon ve Bitki Taze Ağırlığı Üzerine Etkisi

Farklı konsantrasyonlardaki tuz stresinin etkisini belirlemek için Flamura-85 çeşidine ait tohumların olgun embriyolarından kurulan kùltürlere 0, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2 ve 0.25 M NaCl uygulandı ve tuz konsantrasyonunun embriyo kùltürlerinde rejenerasyon üzerine olan etkisi saptandı.

Farklı tuz konsantrasyonlarında rejenerasyon olan Flamura-85 çeşidine ait 28 günlük embriyo kùltürlerinde rejenerasyon olan bitkilerin sayısı ve yüzdesi ile ortalama bitki taze ağırlıkları Tablo 4.16 da sunulmuştur. Flamura-85 çeşidinde tuz konsantrasyonlarındaki artışa bağlı olarak rejenerasyon yeteneğinde bir düşüşün meydana geldiği saptanmıştır. Flamura-85 çeşidinde kontrolde % 100 olan rejenerasyon yeteneği 0.1 M NaCl uygulamasında % 46, 0.2 M NaCl uygulamasında ise % 14 , 0.25 M NaCl uygulamasında % 6 dır. Uygulanan tuz konsantrasyonlarının eksplantların rejenerasyon olmalarını etkilediği görülmektedir (Şekil 11, 12 ve 13).

Flamura-85 çeşidine ait embriyo kùltürlerinde 28. günde ortalama bitki taze ağırlıklarında NaCl uygulamasına bağlı olarak azalma görülmektedir. Kontrol gruplarında 231.6 mg olan ortalama bitki taze ağırlığı 0.05 M NaCl konsantrasyonunda 159.9 mg, 0.1 M NaCl konsantrasyonunda 67.2 mg, 0.15 M NaCl konsantrasyonunda 26.3 mg, 0.2 M NaCl konsantrasyonunda 9.3 mg ve 0.25 M NaCl konsantrasyonunda ise 2.5 mg dır. Ortalama bitki taze ağırlığı 0.05 M NaCl uygulamasından itibaren belirgin bir düşüş göstermektedir (Şekil 14).

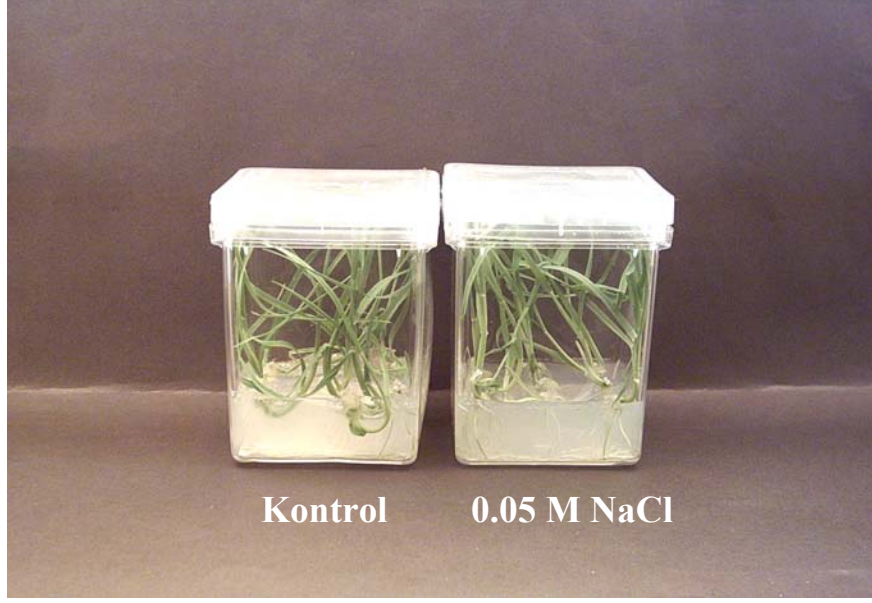
Yapılan istatistiksel değerlendirmeler sonucunda uygulanan NaCl konsantrasyonlarının ortalama bitki taze ağırlığı üzerine etkisi önemli bulunmuştur ($P<0.05$).

Deney gruplarının birbiri ile karşılaştırılması Dunnet's testine göre yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre kallus taze ağırlığı bakımından kontrole göre uygulanan tüm tuz konsantrasyonlardaki farklar önemlidir ($P<0.05$). 0.15 M NaCl, 0.2 M NaCl ve 0.25 M NaCl konsantrasyonlarındaki kallusların taze ağırlıkları arasındaki farklar önemsiz ancak bu konsantrasyonların, kontrol, 0.05 M NaCl ve 0.1 M NaCl konsantrasyonlarındaki kallusların taze ağırlıkları ile arasındaki farklar önemlidir. ($P<0.05$).

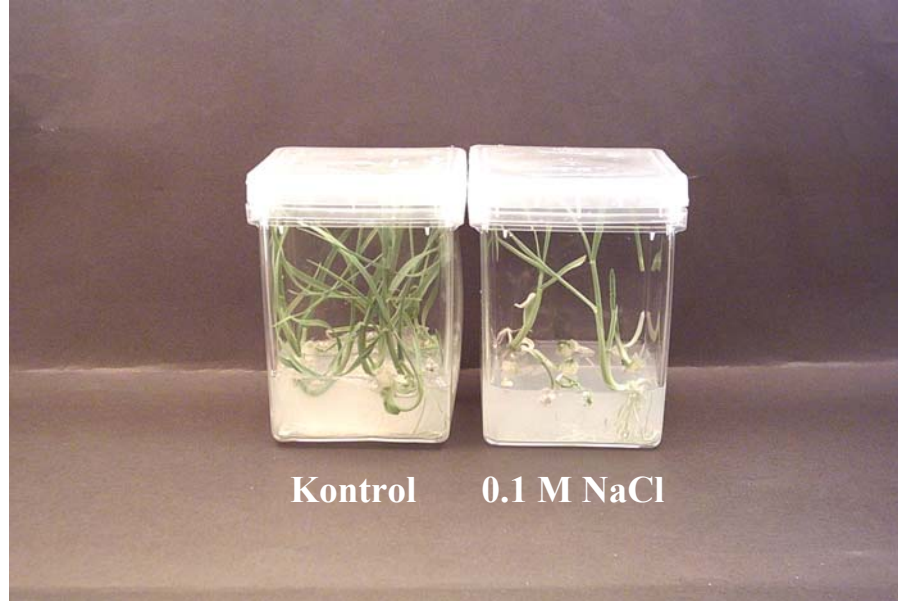
Tablo 4.16: Kontrol ve farklı konsantrasyonlarda NaCl uygulanan buğday bitkisine ait Flamura-85 çeşidinin 28 günlük embriyo kültürlerinde, eksplant sayısı, rejenere olan bitki sayısı ve yüzdesi ile ortalama bitki taze ağırlığı.

Tuz Konsantrasyonları	Eksplant Sayısı	Rejenere Olan Bitki		Ortalama Bitki Taze Ağırlığı (mg)
		Sayı	%	
Kontrol	50	50	100	231.6 a*
0.05 M NaCl	50	42	84	159.9 b
0.1 M NaCl	50	23	46	67.2 c
0.15 M NaCl	50	14	28	26.3 d
0.2 M NaCl	50	7	14	9.3 d
0.25 M NaCl	50	3	6	2.5 d

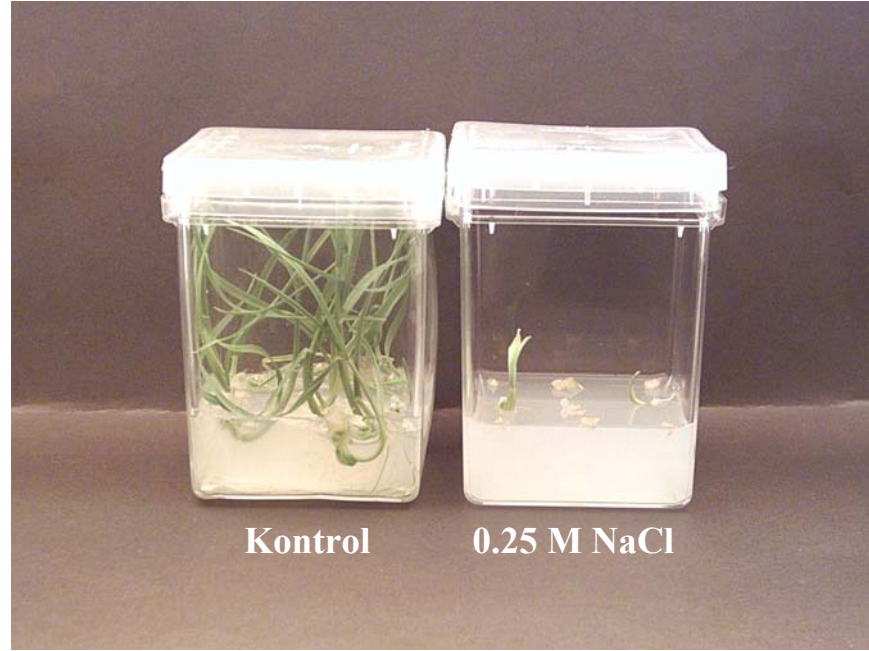
* Aynı harfle gösterilmeyenler, kontrol ve farklı konsantrasyonlarda tuz uygulanan deney gruplarındaki kallus taze ağırlık ortalamaları arasındaki farkların, Dunnet's testine göre 0.05 seviyesinde önemli olduğunu göstermektedir.



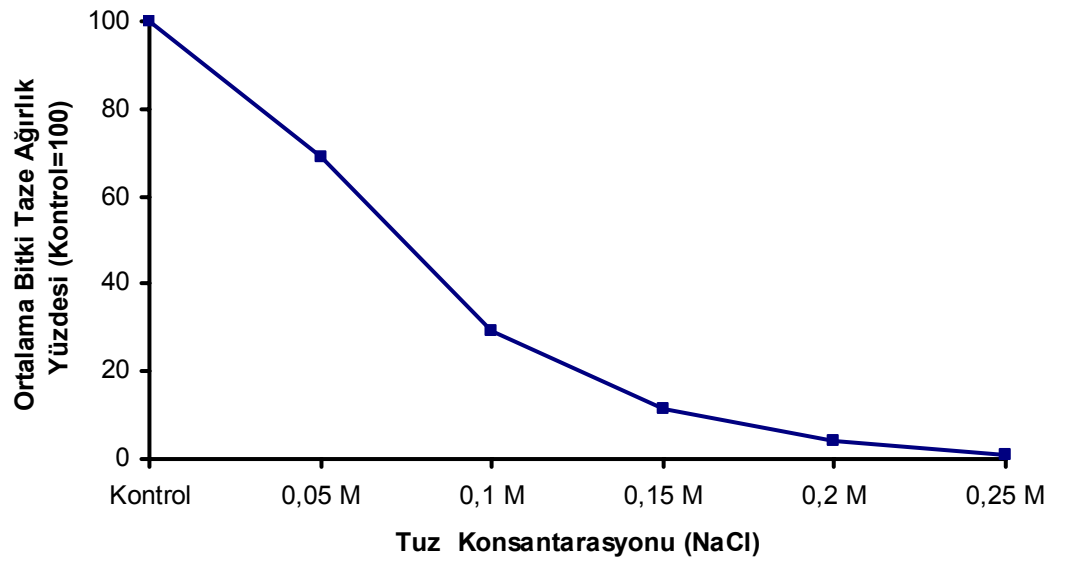
Şekil 4.11: Kontrol ve 0.05 M NaCl stresi uygulanmış buğday bitkisinin Flamura-85 çeşidine ait olgun embriyo eksplantlarından kurulan 28 günlük kültürler.



Şekil 4.12: Kontrol ve 0.1 M NaCl stresi uygulanmış buğday bitkisinin Flamura-85 çeşidine ait olgun embriyo eksplantlarından kurulan 28 günlük kültürler.



Şekil 4.13: Kontrol ve 0.25 M NaCl stresi uygulanmış buğday bitkisinin Flamura-85 çeşidine ait olgun embriyo eksplantlarından kurulan 28 günlük kültürler.



Şekil 4.14: Kontrol ve farklı konsantrasyonlarda NaCl stresi uygulanan buğday bitkisinin Flamura-85 çeşidinden kurulan 28 günlük kültürlerde ortalama bitki taze ağırlık yüzdeleri.

4.3.3. Tuz Stresinin Klorofil Miktarına Etkisi

Kontrol ve farklı konsantrasyonlarda tuz stresi uygulanarak kurulan Flamura-85 çeşidine ait kültürlerde rejenere olan bitkilerin yapraklarındaki klorofil miktarını saptamak amacı ile spektrofotometrik ölçümler yapıldı. 645 nm ve 663 nm dalga boylarında absorbans değerleri ölçülerek klorofil a, klorofil b ve total klorofil miktarları hesaplandı. Tablo 4.17 de görüldüğü gibi farklı konsantrasyonlarda tuz stresine maruz bırakılan kültürlerin yapraklarındaki total klorofil miktarlarındabir azalış saptandı.

Tablo 4.17: Kontrol ve farklı konsantrasyonlarda tuz stresi uygulanan 28 günlük buğday bitkisine ait Flamura-85 çeşidinden kurulan kültürlerin yapraklarındaki total klorofil ,klorofil a ve klorofil b miktarları.

Tuz Konsantrasyonu	Yapraklardaki Klorofil Miktarı (mg / g x taze ağırlık)		
	Total Klorofil	Klorofil a	Klorofil b
Kontrol	0.848 ± 0.123	0.500 ± 0.096	0.348 ± 0.027
0.05 M NaCl	0.683 ± 0.115	0.403 ± 0.016	0.280 ± 0.10
0.1 M NaCl	0.516 ± 0.013	0.263 ± 0.006	0.253 ± 0.008
0.15 M NaCl	0.444 ± 0.028	0.234 ± 0.016	0.210 ± 0.012
0.2 M NaCl	0.199 ± 0.005	0.107 ± 0.0008	0.092 ± 0.004
0.25 M NaCl	0.159 ± 0.015	0.098 ± 0.002	0.061 ± 0.016

± Standart Sapma

4.3.4. Tuz Stresinin Suda Çözünebilir Protein Miktarı Üzerine Etkisi

Kontrol ve farklı konsantrasyonlarda tuz stresi uygulanarak kurulan Flamura-85 çeşidine ait kültürlerde rejenere olan bitkilerin yapraklarındaki suda çözünebilir protein derişimi 595 nm dalga boyundaki spektrofotometrik absorbans değerleri kullanılarak standart grafik yardımı ile saptandı. Tablo 4.18 de görüldüğü gibi farklı konsantrasyonlarda tuz stresine maruz bırakılan kültürlerin yapraklarındaki suda

çözünebilir protein miktarı uygulanan tuzun konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak kontrol gruplarına göre tüm deney gruplarında artış göstermektedir.

Tablo 4.18: Buğday bitkisine ait Flamura-85 çeşidinde rejenere olan bitkilerdeki suda çözünebilir protein miktarları

Tuz Konsantrasyonları	Suda çözünebilir protein miktarları (mg / g × taze ağırlık)
Kontrol	0.88
0.05 M NaCl	1.42
0.1 M NaCl	1.55
0.15 M NaCl	1.61
0.2 M NaCl	1.64
0.25 M NaCl	1.68

4.3.5. Tuz Stresinin Süperoksit Dismutaz Aktivitesine Etkisi

Kontrol ve farklı konsantrasyonlarda tuz stresi uygulanarak kurulan Flamura-85 çeşidinde ait kültürlerde rejenere olan bitkilerin yapraklarındaki süperoksit dismutaz aktivitesini saptamak amacı ile 560 nm dalga boyunda spektrofotometrik absorbans değerleri ölçüldü. Tablo 4.19 da görüldüğü gibi farklı konsantrasyonlarda tuz stresini uygulanan kültürlerin yapraklarındaki süperoksit dismutaz aktivitesi tuz konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak kontrol gruplarına göre tüm gruplarda belirgin bir artış göstermekle birlikte en fazla süperoksit dismutaz aktivitesi 0.25 M tuz stresini uygulanan deney gruplarında saptandı.

Tablo 4.19: Buğday bitkisine ait Flamura-85 çeşidinde rejenere olan bitkilerdeki süperoksit dismutaz aktivitesi.

Tuz Konsantrasyonu	% İnhibisyon Değeri
Kontrol	6.85
0.05 M NaCl	11.35
0.1 M NaCl	14.18
0.15 M NaCl	12.53
0.2 M NaCl	17.49
0.25 M NaCl	19.62

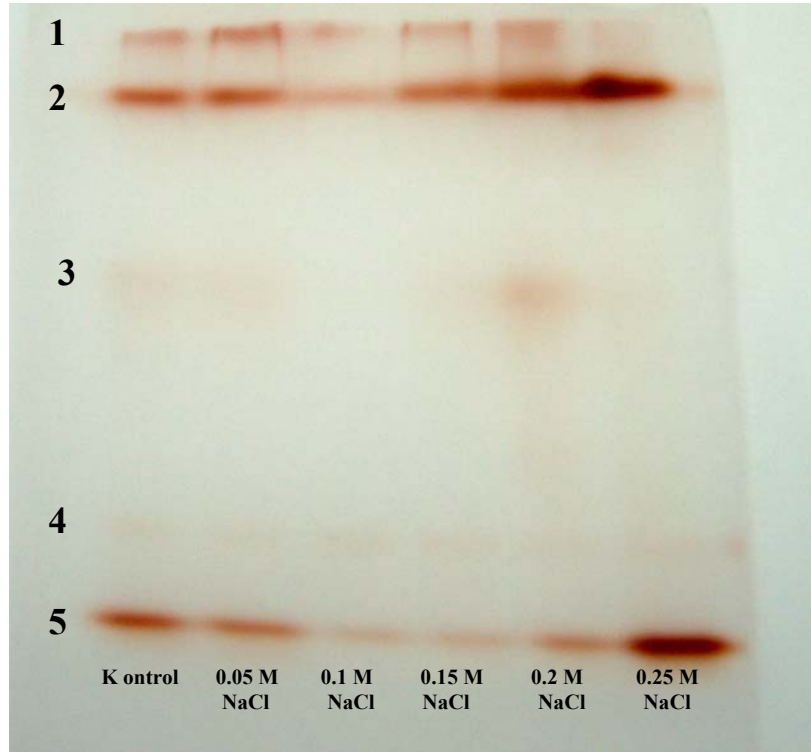
4.3.6. Tuz Stresinin Peroksidaz Enzim Aktivitesine Etkisi

Kontrol ve farklı konsantrasyonlarda tuz stresi uygulanarak kurulan Flamura-85 çeşidinde ait kültürlerde rejenere olan bitkilerin yapraklarındaki peroksidaz aktivitesini saptamak amacı ile yapılan spektrofotometrik ölçüm sonuçları Tablo 4.20 de verilmiştir. Uygulanan tuz stresine yanıtta peroksidaz enzim aktivitesinin kontrol grubuna göre artış gösterdiği saptanmıştır.

Tablo 4.20: Buğday bitkisine ait Flamura-85 çeşidinde rejenere olan bitkilerdeki peroksidaz enzim aktivitesi.

Tuz Konsantrasyonları	Peroksidaz enzim aktivitesi ($\Delta A / \text{dak.} \times \text{g} \times \text{taze ağırlık}$)
Kontrol	41.93
0.05 M NaCl	70.96
0.1 M NaCl	77.43
0.15 M NaCl	86.52
0.2 M NaCl	98.98
0.25 M NaCl	108.35

Flamura-85 çeşidinde peroksidaz varlığını moleküler düzeyde göstermek için nativ poliakrilamid jel elektroforezi kullanıldı. Elektroforez sonucunda jel üzerinde kontrol ve farklı konsantrasyonlarda NaCl stresi uygulanan deney gruplarında 5 izoenzim bandı görüldü. Kontrol gruplarında 1., 2. ve 5. izoenzim bantları belirgin; 3. ve 4. izoenzim bantları ise zayıf bantlar olarak gözlemlendi. NaCl uygulanan deney gruplarında ise 1. ve 2. izoenzim bantları belirgin bulunurken 3. izoenzim bandı 0.1 M ve 0.15 M ve 0.25 M NaCl uygulanan gruplarda gözlenmedi. 4. izoenzim bandı tüm gruplarda zayıf bant olarak görülürken 5. izoenzim bandı 0.05 M ve 0.25 M NaCl konsantrasyonlarında belirgin diğer deney gruplarında ise zayıf bant olarak belirlendi (Şekil 4.15).



Şekil 4.15: Buğday bitkisine ait Flamura-85 çeşidinde rejenere olan bitkilerdeki peroksidaz aktivitesinin nativ poliakrilamid jel görüntüsü.

4.3.7. Tuz Stresinin Katalaz Aktivitesine Etkisi

Kontrol ve farklı konsantrasyonlarda tuz stresi uygulanarak kurulan Flamura-85 çeşidine ait kültürlerde rejenere olan bitkilerin yapraklarındaki katalaz aktivitesini saptamak amacı ile spektrofotometrik ölçümler yapıldı. 240 nm dalga boyunda absorbans değeri ölçülerek $\Delta A / \text{dak} \times \text{g} \times \text{taze ağırlık}$ formülüne göre katalaz aktivitesi hesaplandı. Tablo 4.21 de görüldüğü gibi kontrol gruplarında 0,18 $\Delta A / \text{dak} \times \text{g} \times \text{taze ağırlık}$ olan katalaz aktivitesi uygulanan tuz konsantrasyonuna bağlı olarak artış göstererek 0.1 M NaCl uygulamasında 0.34 $\Delta A / \text{dak} \times \text{g} \times \text{taze ağırlık}$ 0.25 M NaCl uygulamasında ise 0.41 $\Delta A / \text{dak} \times \text{g} \times \text{taze ağırlık}$ yükselerek rejenere olan bitkilerin yapraklarında belirgin bir artış gösterdiği saptanmıştır .

Tablo 4.21: Buğday bitkisine ait Pehlivan çeşidinde rejenere olan bitkilerdeki katalaz enzim aktivitesi

Tuz Konsantrasyonları	Katalaz enzim aktivitesi ($\Delta A / \text{dak} \times \text{g} \times \text{taze ağırlık}$)
Kontrol	0.18
0.05 M NaCl	0.20
0.1 M NaCl	0.34
0.15 M NaCl	0.32
0.2 M NaCl	0.38
0.25 M NaCl	0.41

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada besin değeri yüksek tahıl ürünlerinden biri olan buğday (*T.aestivum. L*) bitkisinin Tekirdağ, Pehlivan ve Flamura-85 çeşitlerine ait olgun embriyo eksplantlarından kurulan kültürlere farklı konsantrasyonlarda NaCl stresi uygulanmış, 28. günde kültür ortamında kallus ve rejenerasyon yüzdeleri tespit edilmiş, kallus ve rejenera olan bitkilerin taze ağırlıkları saptanmıştır. Kültür ortamında rejenera olan bitkilerin yapraklarındaki klorofil ve suda çözünebilir protein miktarları, süperoksit dismutaz, peroksidaz, katalaz enzim aktiviteleri belirlenmiştir.

Çalışmamızda, tuz stresinin kallus oluşumu üzerine etkisini göstermek amacı ile kurduğumuz kültürlerde her 3 deney çeşidinin kontrol gruplarında tüm eksplantlardan kallus oluşumu gözlenmiştir. Pehlivan çeşidinde kallus oluşumu üzerine NaCl stresinin etkisi uygulanan en düşük tuz konsantrasyonundan itibaren gözlenirken Tekirdağ ve Flamura-85 çeşitlerinde 0.1 M NaCl konsantrasyonundan itibaren görülmüştür.

Çalışmamızda buğday bitkisinin Tekirdağ, Pehlivan ve Flamura-85 çeşitlerinden kurulan doku kültürlerinde kallus teşviki için MS besiyeri ve bitki büyüme düzenleyicisi olarak 2,4-D kullanılmıştır.

Bitki doku kültüründe yüksek oranda kallus ve rejenerasyon teşviki için besiyeri içeriğinin ve besiyerine ilave edilecek olan büyüme düzenleyicilerinin konsantrasyonları büyük önem taşımaktadır [9]. Çalışmamızda kullandığımız MS besiyeri ve 2,4-D bitki büyüme düzenleyicisi buğday doku kültüründe kallus ve rejenerasyon teşviki için yaygın olarak kullanılmaktadır [10, 11, 56-58].

Araştırmacılar, MS besiyerine ilave edilen 2.25 - 36 µmol/l konsantrasyonları arasındaki 2,4-D hormonunun, konsantrasyon artışına bağlı olarak kallus oluşumunu teşvik etmesine rağmen rejenerasyon yeteneğini azalttığını bildirmektedirler [20]. Olgun buğday embriyolarının eksplant olarak kullanıldığı bir başka çalışmada ise

MS besiyerine 4 mg/l 2,4-D ve 1 mg/l NAA (naftalen asetik asit) ilave ederek % 83.33 oranında kallus teşviki sağlanmıştır [58].

Çalışmamızda buğday embriyo eksplantlarından kurulan kültürlerde NaCl stresinin kallus taze ağırlığı üzerine etkisi tespit edilmiştir. 28 günlük Tekirdağ çeşidine ait kallus kültürlerinde NaCl stresi uygulanan kallusların, ortalama kallus taze ağırlıkları, kontrol grubuna göre % 51.7 - 96.8 lik azalma göstermektedir. Pehlivan çeşidinde % 80.7 - 95.9 değerinde olan azalış, Flamura-85 çeşidinde % 37 - 97.9 dir. Çalışmamızda uygulanan tuz stresi kallus taze ağırlıkları üzerinde etkili olmuştur.

Bitkilerde NaCl stresine bağlı olarak besiyerinde yükselen osmotik basınç kallus hücrelerinde su kaybına neden olmakta ve bunun sonucunda hücre biyoması azalarak kallus taze ağırlığında bir düşüş meydana gelmektedir [59]. Pamuk bitkisinde yapılan bir çalışmada 200 mM NaCl'ün tuza toleranslı varyetelerde % 52 oranında, duyarlı varyetelerde ise % 91 oranında kallus taze ağırlığında azalma meydana getirdiği tespit edilmiştir [59].

Soya bitkisinde, 100 mM NaCl stresine dirençli soya kalluslarında 28. günde kültür ortamında hücre proliferasyonunun ve kallus taze ağırlığının kontrol grubuna göre arttığı bildirilmektedir [60].

Buğday bitkisinin 28 farklı varyetesinden kurulan kallus kültürlerinde farklı konsantrasyonlarda NaCl uygulamasına cevap olarak kallus teşvikinin ve kallus taze ağırlığının azaldığı, bu azalmanın varyeteler arasında farklılık gösterdiği bildirilmektedir [13]. Tuz stresine bağlı olarak meydana gelen bu farklılıklar bizim çalışmamızda da her üç çeşitte de görülmüştür.

Araştırmamızda buğday bitkisinden kurulan kültürlerde NaCl stresi uyguladıktan sonra Tekirdağ çeşidinde rejenerasyon yüzdesi, uygulanan tüm NaCl konsantrasyonlarında kontrole göre bir azalış göstermiş ve kontrolde rejenere olan bitki yüzdesi % 86 iken, NaCl uygulamasıyla % 4 – 62, Pehlivan çeşidinde kontrolde rejenere olan bitki yüzdesi % 82 iken NaCl uygulaması ile % 4 – 56 ve Flamura-85 çeşidinde ise

kontrolde rejenere olan bitki yüzdesi % 100 iken uygulanan NaCl konsantrasyonlarına bağlı olarak % 6 - 84 oranları arasında düşüş göstermiştir.

3 durum buğdayı çeşidinin tohumları ve olgun embriyo eksplantları kullanılarak yapılan çalışmada, NaCl uygulaması sonucu su absorpsiyonunun azalması ile tohum ve olgun embriyolardaki α -amilaz ve β -amilaz enzim aktivitelerinin azaldığı ve bu enzimlerin aktivitelerinin azalmasına bağlı olarak tohumlardaki nişasta yıkımının yavaşladığı, bunların sonucu olarak da tohumların rejenerasyon kapasitelerinin düştüğü bildirilmektedir [21].

Zair ve diğ. 8 durum buğday çeşidine doku kültürü ortamında 0; 2.5; 5; 10; 15 g/l NaCl stresi uygulamışlar ve kontrolde % 55 - 75 arasında değişen rejenerasyon kapasitesinin artan NaCl konsantrasyonuna bağlı olarak azaldığını ve 15 g/l NaCl stresinde % 6 - 9 oranına düştüğünü söylemektedirler [56].

Çalışmamızda buğday embriyo eksplantlarından kurulan kültürlerde NaCl stresinin bitki taze ağırlığı üzerine etkisi tespit edilmiştir. 28 günlük Tekirdağ çeşidine ait rejenerasyon kültürlerinde NaCl stresine maruz bırakılan bitkilerin ortalama taze ağırlıklarında, kontrol grubunda bulunan bitkilerin ortalama taze ağırlıklarına göre % 47.6 - 98.9 luk düşüş saptanmıştır. Pehlivan çeşidinde kontrol grubuna göre % 51.35 - 99.7 lik bir düşüş ve Flamura-85 çeşidinde ise NaCl uygulamasına bağlı olarak kontrol gruplarına göre % 30.96 - 98.92 lik bir düşüş görülmektedir.

Farklı bitkilerle yapılan tuz stresi çalışmalarında, hücre içinde aşırı miktarda NaCl birikiminin, yaprak hücrelerindeki su potansiyelini düşürdüğü, bu düşüşe bağlı olarak stomaların kapandığı ve stomaların kapanması ile CO₂ emiliminin azaldığı bunun sonucu olarak da yapraklardaki fotosentez aktivitesinin düştüğü bildirilmektedir [61].

Di Baccio ve diğ. % 20 oranında deniz suyu içeren solüsyonlarla suladıkları ayçiçeği fidelerinin hem bitki taze ağırlıklarının hem de bitki kuru ağırlıklarının kontrol gruplarına göre tuzdan etkilenecek azalma gösterdiğini söylemektedirler [62]. Tuza duyarlı ve tuza toleranslı iki pirinç çeşidi ile yapılan *in vitro* çalışmada 250 mM NaCl

stresinin bitki taze ağırlıklarını kontrol gruplarına göre % 17 ve % 6 oranında azalttığı bildirilmektedir [63].

Sivritepe ve Eriş yaptıkları çalışmalarında, Çavuş, Müşküle ve Sultani Çekirdeksiz üzüm çeşitlerine *in vitro* koşullar altında % 0; 0.25; 0.50; 0.75 ve 1.00 (w/v) konsantrasyonlarında NaCl stresini 4 ile 8 hafta süre ile uygulamışlar ve artan NaCl konsantrasyonunun uygulama süresine bağlı olarak; hücre proliferasyon oranının, bitki büyüme oranının, bitki taze ağırlığının ve fide boyunun azaldığını saptamışlardır [64].

Stres çalışmalarında bitki gelişiminde önemli bir kriter olan fotosentetik aktivitenin belirlenmesi önemlidir. Fotosentetik pigmentlerin düzeyi gerek içsel gerekse çevresel çok sayıda faktör tarafından etkilenmektedir [65]. Bitkilerde çeşitli streslere toleranslı bireylerin belirlenmeye çalışıldığı araştırmalarda, klorofil miktarı gibi bitki gelişimini etkileyen parametreler incelenerek tuzluluğa karşı toleransları saptanabilmektedir.

Çalışmamızda olgun buğday embriyolarından kurulan kültürlerde farklı konsantrasyonlardaki NaCl stresinin klorofil pigmentleri üzerine olan etkisini ortaya koymak amacı ile rejenere olan bitkilerin klorofil miktarları belirlenmiştir. NaCl uygulamasının her üç buğday çeşidinde de total klorofil, klorofil a ve klorofil b miktarlarında düşüşe neden olduğu saptanmıştır. 0.2 M NaCl stresi uygulanan Tekirdağ çeşidinin yapraklarındaki total klorofil miktarı kontrole göre % 70.6, Pehlivan çeşidinde % 83.18 ve Flamura-85 çeşidinde de % 76.5 oranında göstermiştir.

Çalışmamızda rejenere olan bitkilerin klorofil miktarlarında meydana gelen düşüş, uygulanan tuz stresinin klorofil sentezinden sorumlu enzimlerin inhibe olmasına neden olduğu veya kloroplast yapı ve fonksiyonunda değişimler meydana getirdiğini düşündürmektedir.

Garg ve Singla, 4 nohut çeşidi ile yaptıkları çalışmada 15 günlük fidelere farklı konsantrasyonlarda NaCl, Na₂SO₄, CaCl₂ stresi uygulamışlar ve uygulamadan 40, 70 ve 100 gün sonra topladıkları örneklerin yapraklarındaki klorofil miktarlarının tüm varyetelerde artan tuz konsantrasyonlarına bağlı olarak azaldığını, duyarlı çeşitlerdeki

klorofil pigmentlerinin azalışının toleranslı çeşitlere göre daha fazla olduğunu gözlemişlerdir [66].

Buğday, pirinç, üzüm gibi çeşitli bitkiler ile yapılan çalışmalarda da uygulanan NaCl konsantrasyonunun artışına bağlı olarak yapraklardaki total klorofil miktarının azaldığı bildirilmektedir [64, 67, 68]

Çalışmamızda kullandığımız buğday bitkisinin Tekirdağ, Pehlivan ve Flamura-85 çeşitlerine ait tohumların olgun emriyolarından kurulan doku kültürlerinde farklı konsantrasyonlarda NaCl stresinin suda çözünebilir protein derişimi üzerine olan etkisi saptanmıştır. NaCl konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak kontrole göre Tekirdağ ve Pehlivan çeşitlerinde suda çözünebilir protein miktarlarında azalma gözlenmiştir. Protein miktarlarındaki bu azalış, Tekirdağ çeşidinde kontrol grubuna göre % 26.7-56.5 ve Pehlivan çeşitlerinde % 52.9 - 78.6 arasında değişen oranlardadır. Flamura-85 çeşidinde ise uygulanan NaCl konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak, kontrol grubuna göre % 61.4 - 90.9 arasında değişen oranlarda bir artış saptanmıştır. Tekirdağ ve Pehlivan çeşitlerinde protein içeriklerinde bir azalma gözlenirken, Flamura-85 çeşidinde protein miktarında NaCl konsantrasyonuna bağlı olarak artış görülmektedir.

Bitkilerde tuzluluğa bağlı olarak protein içeriklerinde değişmeler olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Arpa, ayçiçeği, pirinç ve buğday çeşitleri ile yapılan çalışmalarda tuz stresi altında tuza duyarlı çeşitlerin tuza toleranslı çeşitlere göre daha yüksek konsantrasyonlarda suda çözünebilir protein miktarına sahip oldukları tespit edilmiştir [44]. Bu proteinler NaCl stresine cevap olarak sentezlenebilmekte veya bitkiler NaCl stresine maruz kaldığında protein miktarında düşük konsantrasyonlarda artış meydana gelmektedir [69]. Lutts ve diğ. çalışmalarında, Flowers ve Dalmond'un magnezyum iyonunun, protein sentezinin regülasyonunda görev aldığını ve magnezyum iyonunun konsantrasyonundaki değişme ile klorofil ve protein miktarları arasında bir bağlantının olabileceğini söylediklerini bildirmekteler [68].

NaCl'nün konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak çözünebilir protein derişiminin azaldığını gösteren çalışmalarda vardır. Pirinç bitkisinde 0 - 50 mM arasında değişen konsantrasyonlarda NaCl stresi uygulaması sonucu tuza duyarlı çeşitlerin

yapraklarındaki çözünebilir protein miktarında düşüş olduğu bildirilmektedir [68]. Bizim çalışmamızda da Tekirdağ ve Pehlivan çeşitlerinde suda çözünebilir protein miktarlarında bir düşüş görülmüştür.

Garrat ve diğ. çalışmalarında, Corpas ve diğ.'nin tuza duyarlı bezelye bitkileri ile yaptıkları çalışmalarında, NaCl stresine bağlı olarak fotosolunumda rol alan ürat oksidaz, hidrokspiruvat reduktaz gibi enzimlerin miktarında azalma gözlediklerini bildirmektedirler [59].

Bu proteinlerin stres karşısında bitkileri korumada rol aldıkları düşünüldüğünde, protein değişiklikleri tuza toleranslı ve duyarlı bitkilerin seleksiyonu için önemli bir kriter olmaktadır. Her çeşidin kendine özgü biyokimyasal özelliklerinden yararlanılarak, genlerin ana ürünü olan proteinlerin değerlendirilmesi ile populasyonlarda mevcut olan varyasyonları saptamak mümkün olmaktadır [70].

Yapılan çalışmalarda, yüksek konsantrasyonlarda NaCl stresine maruz kalan bitki hücrelerinde reaktif oksijen türevlerinin üretiminde artış olduğu bildirilmektedir [41]. Bu artışın en önemli nedeninin uygulanan NaCl konsantrasyonuna bağlı olarak hücre içine su alımının azalması ve kloroplastlardaki elektron transfer zincirinin bu olaydan etkilenmesi gösterilmektedir. Ayrıca, klorofil moleküllerinin fotooksidasyona uğrayarak aşırı miktarda eksite olması hücre içi reaktif oksijen türevlerinin üretimini artıran diğer bir etken olarak bildirilmektedir [2, 37].

Çalışmamızda Tekirdağ, Pehlivan ve Flamura-85 çeşitlerine ait tohumların olgun emriyolarından kurulan kültürlerde farklı konsantrasyonlarda NaCl stresinin antioksidant enzim olan süperoksit dismutaz aktivitesi üzerine olan etkisi belirlenmiştir. Tüm varyetelerde NaCl stresine cevap olarak süperoksit dismutaz seviyesinin arttığı görülmektedir.

Canlı sistemler reaktif oksijen türevlerinin neden olduğu zararlanmaları önlemek için çeşitli antioksidant sistemler geliştirmişlerdir. Süperoksit dismutaz, katalaz, peroksidaz gibi enzimler bitki antioksidant savunma sisteminde yer alan en önemli serbest elektron yakalayıcılarındandır ve antioksidant savunma sisteminde yer alan süperoksit dismutaz,

NaCl stresine bağlı olarak hücre içinde üretimi artan süperoksit radikallerinin hidrojen peroksit'e dönüşümünü katalizleyen bir enzimdir [36-38].

Parida ve diğ. mangrov bitkisinde yaptıkları bir çalışmada 100, 200 ve 400 mM konsantrasyonlarındaki NaCl stresinin süperoksit dismutaz aktivitesini sırasıyla % 27, % 120 ve % 128 oranlarında arttırdığını saptamışlardır [71]. *İn vitro* şartlarda yapılan bir başka çalışmada, 175 mM NaCl konsantrasyonuna maruz bırakılan ayçiçeği kalluslarındaki süperoksit dismutaz aktivitesinin tuza duyarlı kallus hatlarında 14. günde kontrol gruplarına göre % 114 oranında artış gösterdiği bildirilmektedir [72].

Carrizo citrange bitkisinde 90 mM NaCl stresinin süperoksit dismutaz aktivitesini arttırdığı ve kontrolde 284.04 U (mg protein)⁻¹ olan süperoksit dismutaz miktarının NaCl stresi ile 477.7 U (mg protein)⁻¹'e yükseldiğı gösterilmiştir [73].

Çalışmamızda kullanılan her üç buğday çeşidinin süperoksit dismutaz aktivitelerinde kontrol gruplarına göre bir artış gözlenmekle beraber 0.15 M NaCl konsantrasyonunda 0.1 M NaCl konsantrasyonuna göre bir düşüş gözlenmiştir. Bunun yanısıra Tekirdağ ve Pehlivan buğday eşitlerinin 0.15 M NaCl konsantrasyonundaki suda çözünebilir protein miktarları, daha düşük konsantrasyonlardaki tuz uygulanan deney gruplarına göre bir artış göstermiştir. Tekirdağ ve Pehlivan eşitlerinde 0.15 M NaCl konsantrasyonunda süperoksit dismutaz aktivitesinde meydana gelen bu düşüş ve aynı konsantrasyonda protein miktarında meydana gelen artış, bu konsantrasyonda osmoprotektan olarak görev alan proteinelere [42] bağlı farklı tolerans mekanizmalarının ortaya çıktığını düşündürmektedir.

Çalışmamızda buğday bitkisinin olgun embriyolarından kurduğumuz kültürlerde antioksidant enzimlerden olan peroksidaz ile NaCl stresi arasındaki ilişki araştırılmıştır. Uygulanan tuzun konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak her üç varyetede kontrol grubuna göre peroksidaz aktivitesinde belirgin bir artış tespit edilmiştir. Tekirdağ eşidinin yapraklarındaki peroksidaz aktivitesi, 0.1 M NaCl uygulamasında kontrole göre % 56.5 oranında artarken 0.2 M NaCl stresi uygulanan gruplarda ise % 75.6 oranına yükselmiştir. Pehlivan eşidinde peroksidaz aktivitesinde Tekirdağ eşidindekine benzer bir artış gözlenerek 0.1 M NaCl konsantrasyonunda kontrole göre

% 86.1 oranında ve 0.2 M NaCl konsantrasyonunda da % 114.25 oranında yükselme kaydedilmiştir. Flamura-85 çeşidinin yapraklarındaki peroksidaz aktivitesi kontrol gruplarına göre 0.1 M NaCl konsantrasyonunda % 84.7 oranında, 0.2 M NaCl uygulamasında % 136.1 oranında ve 0.25 M NaCl stresi uygulamasında ise % 158.4 oranında artmıştır.

Hücre içi peroksidaz aktivitesindeki artış tuzluluk, yüksek sıcaklık, kuraklık gibi çevresel stres faktörlerinin artışına bağlı olarak bir indikatör görevi görmektedir. Tuza hassas pirinç ve şeker pancarı çeşitlerinde peroksidaz aktivitesinin tuzlu koşullarda arttığını gösteren çeşitli çalışmalar yapılmıştır [46, 74].

Zhu ve diğ. yaptıkları bir çalışmada, 50 mM NaCl stresi uygulamasının 5 ve 10 günlük salatalık (*Cucumis sativus* L.) yapraklarında H₂O₂ miktarını arttırdığını ve buna bağlı olarak peroksidaz aktivitesinin artış gösterdiğini bildirmektedirler [75]. Bitkilerde enzimatik savunmada görev yapan peroksidazlar H₂O₂'nin H₂O ve O₂'e dönüşümünü sağlayarak bitkileri oluşacak olan toksisiteye karşı korurlar [35]. Pirinç çeşitleri ile yapılan çalışmada da 0 - 300 mM konsantrasyonlardaki NaCl uygulamasının yapraklarındaki peroksidaz aktivitesinin kontrol gruplarına göre arttırdığı tespit edilmiştir [63].

Jbir ve diğ. buğday bitkisinde yaptıkları çalışmada NaCl stresi altında peroksidaz aktivitesine bağlı olarak ligninleşmenin arttığını göstermişlerdir [76].

Bitki savunma sisteminde bulunan peroksidazlar bitkide lignin biyosentezinde etkilidirler [77] ve hücre duvarı oluşumunda lignin monomerlerinin oksidatif polimerizasyonunu katalizlerler [78]. Çeşitli stres altında bulunan bitkilerde peroksidaz aktivitesindeki değişimler birçok bitkide ligninleşmeyi artırmaktadır [79-80].

Çalışmamızda peroksidaz aktivitesini moleküler düzeyde göstermek için yürüttüğümüz nativ poliakrilamid jel elektroforezi sonucunda jel üzerinde Tekirdağ ve Pehlivan çeşitlerine ait 2 izoenzim bandı ve Flamura-85 çeşidine ait 5 izoenzim bandı görülmüştür. Flamura-85 çeşidinde spektrofotometrik ölçümlere göre elde edilen

peroksidaz aktivitesinin diğerk iki çeşide göre yüksek değerde çıkması elektroforez sonucu ile uyumludur.

Peroksidaz aktivitesini moleküler düzeyde göstermek için yapılan çalışmada, Bahary Red, Giza-6 ve Giza-20 soğan çeşitlerine 2000 - 6000 ppm arasında değişen konsantrasyonlarda NaCl uygulanmış ve elektroforez sonucunda jel üzerinde peroksidaz izoenzimlerine ait tek bant tespit edilmiştir. Uygulanan NaCl konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak bandın yoğunluğunda artış gözlenmekle beraber bu yoğunluğun Giza-20 çeşidinde diğerk iki çeşide göre daha fazla olduğu bildirilmektedir [41].

Mittal ve Dubey, farklı konsantrasyonlarda NaCl stresine maruz bıraktıkları tuza duyarlı ve tuza toleranslı pirinç çeşitlerinin kök ve gövdelerinde elektroforez sonucunda farklı sayıda peroksidaz izoenzimi gözlemişlerdir. Toleranslı olan çeşitlerin köklerinde 3 izoenzim, gövdesinde ise 5 izoenzim bandı tespit edilirken duyarlı olan çeşitlerin kök ve gövdelerinde 6 izoenzim bandı saptamışlar ve bitkinin farklı kısımlarında görülen bu farklı izoenzim aktivitelerindeki artışın strese karşı tolerans mekanizması ile ilgili olduğunu bildirmişlerdir [53].

Mangrov bitkisi ile yapılan çalışmada 100, 200, 400 mmol/l konsantrasyonlarında NaCl uygulamasının yapraklardaki peroksidaz aktivitesini kontrol grubuna göre sırasıyla % 44, % 139, % 169 oranlarında arttığı bildirilmektedir. Ayrıca elektroforez sonucunda jel üzerinde peroksidaz izoenzimlerine ait 6 bant gözlenmiştir [71].

Çalışmamızda kullandığımız buğday bitkisinin; Tekirdağ, Pehlivan ve Flamura-85 çeşitlerine ait tohumların olgun emriyolarından kurulan doku kültürlerinde farklı konsantrasyonlarda NaCl stresinin bir diğerk antioksidant enzim olan katalaz aktivitesi üzerine etkisi incelenmiştir. Katalaz aktivitesinde uygulanan NaCl konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak kontrol gruplarına göre Tekirdağ çeşidinde % 12 – 192 Pehlivan çeşidinde % 12.5 - 53.12 ve Flamura-85 çeşidinde de % 11.11 - 127.8 arasında değişen oranlarda artış gözlenmiştir.

Tuz stresine bağlı olarak süperoksit dismutaz enziminin dismutasyon reaksiyonu ile meydana gelen hidrojen peroksit toksisitesini ortadan kaldırmakla görevli bir diğer enzim de katalazdır. Soğan, domates, pirinç, buğday, mısır, ayçiçeği gibi bitkilerde yapılan çalışmalar da tuz stresi altında katalaz aktivitesinin arttığı gösterilmiştir [41, 74, 81, 82, 83].

Davenport ve diğ. ayçiçeği kalluslarına 175 mM konsantrasyonunda NaCl uygulamışlar ve katalaz aktivitesinin, tuz stresine duyarlı olan 14 günlük kallus hatlarında kontrol gruplarına göre % 60 oranında artış gösterdiğini, tuz stresine toleranslı kallus hatlarında ise katalaz aktivitesinde kontrol gruplarına göre herhangi bir değişme olmadığını bildirmektedirler [72].

El-Baky ve diğ. tuz stresi uyguladıkları çalışmalarında üç soğan çeşidinin katalaz aktivitelerinde artış tespit etmişler ve en yüksek artışın Bahary Red çeşidinde kontrole göre 2000, 4000 ve 6000 ppm'lik NaCl konsantrasyonlarında sırasıyla % 137, % 154 ve % 167 oranlarında gerçekteştiğini bildirmektedirler [41]. Bu sonuçlar, bitki çeşitlerinde uygulanan tuz stresine karşı farklı yanıtların olduğunu göstermektedir.

Bu tez kapsamında yürütölen çalışmalar sonucunda;

Tuz stresinin, buğday (*T.aestivum*. L) bitkisinin Tekirdağ, Pehlivan ve Flamura-85 çeşitlerinin doku költürleri üzerinde etkili olduğu ve bu etkinin artan tuz konsantrasyonuna bağlı olarak değişiklik gösterdiği saptanmıştır.

Farklı konsantrasyonlarda tuz stresi uygulanan her üç buğday çeşidinin olgun embriyo eksplantlarından kurulan költürlerde, artan tuz konsantrasyonlarının, kallus ve bitki taze ağırlığı üzerine etkisi istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur.

Költürlere en yüksek tuz uygulaması olan 0.25 M NaCl konsantrasyonunda Flamura-85 çeşidinde bitki rejenerasyonu gözlenirken diğer iki çeşitte rejenerasyon gözlenmemiştir.

Tuz stresinin, her üç buğday çeşidinin doku kültürlerinde rejenere olan bitkilerin yapraklarındaki klorofil miktarlarını olumsuz olarak etkilediği saptanmıştır.

Tuz stresi, Tekirdağ ve Pehlivan çeşitlerinin suda çözünebilir protein miktarlarında kontrol gruplarına göre azalmaya, Flamura-85 çeşidinde ise artışa neden olmuştur.

Tuz stresine bağlı olarak her üç buğday çeşidinin doku kültürlerinde rejenere olan bitkilerin yapraklarındaki antioksidan enzimlerden olan süperoksit dismutaz, peroksidaz ve katalaz aktiviteleri kontrol gruplarına göre artış göstermiştir.

Ülkemiz tarımında oldukça önemli bir yere sahip olan buğday (*T.aestivum*. L) bitkisinin tuz toleransının *in vitro* teknikler kullanılarak farklı parametrelerde araştırılması, kısa sürede istenilen özelliklere sahip genotiplerin seleksiyonunun yapılmasına olanak sağlayacaktır. Bu tez çalışmasında elde edilen sonuçların, tuza dirençli bitkilerin saptanması için yapılacak çalışmalara katkıda bulunacağı düşünülmektedir. Böylelikle, hızla tuzlanmakta olan topraklarımızda daha fazla ürün elde edilmesi mümkün olacaktır.

KAYNAKLAR

1. GASPAR, T., FRANCK, T., BISBIS, B., KEVERS, C., JOUVE, L., HAUSMAN, J.F., DOMMES, J., 2002, Concept in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures, *Plant Growth Regulation*, 37, 263-285.
2. ZHU, J.-K., 2001, Plant salt tolerance, *TRENDS in Plant Science*, 6(2), 66-71.
3. MALECKA, A., JARMUSZKIEWICH, W., TOMASZEWSKA, B., 2001, Antioxidative defense to lead stress in subcellular compartments of pea root cells, *Acta Biochemica Polonica*, 48 (3), 687-698.
4. SEÇMEN, Ö.İ., GEMİCİ, Y., GÖRK. G., BEKAT, L., LEBLEBİCİ, E., 2000, *Tohumlu Bitki Sistematiği*, Ege Üniversitesi Basımevi, Bornova, İzmir, 975-483-028-2.
5. DAVIS, P., 1985, *Flora of Turkey and The East Aegean Islands*, Vol. 9, Edinburgh University Pres, Edinburgh.
6. TOPRAK MAHSULLERİ OFİSİ, 2004 Yılı Hububat Raporu <http://www.tmo.gov.tr/uploads/HUBUBATXRAPOR.pdf> [Ziyaret tarihi: 24 Mayıs 2005].
7. ALİKAMANOĞLU, S., 1999, *İn vitro tekniklerle haploid şeker pancarı (Beta vulgaris L.) bitkisinin eldesi ve somatik mutasyonların oluşturulmasında gama radyasyonunun kullanılması*, Doktora Tezi, İ. Ü. Fen Bilimleri Enst. İstanbul.
8. BABAĞLU, M., GÜREL, E., ÖZCAN, S., 2002, *Bitki Biyoteknolojisi I Doku Kültürü ve Uygulamaları*, Selçuk Üniversitesi Vakıf Yayınları, Konya. ISBN: 975-6652-04-7.
9. SHAH, I.M., JABEEN, M., ILAHI, I., 2003, *In vitro* callus induction, its proliferation and regeneration in seed explants of wheat (*Triticum aestivum* L.) var. LU-26S, *Pak. J. Bot.*, 35 (2), 209-217.
10. ÖZGEN, M., TÜRET, M., ALTINOK, S., SANCAK, C., 1998, Effects callus induction and plant regeneration from mature embryo culture of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes, *Plant Cell Reports*, 18, 331-335.
11. BIRSIN, M.A. ve ÖZGEN, M., 2004, A comparison of callus induction and plant regeneration from different embryo explants of titicale (*x Titicosecale Wittmack*), *Cellular & Molecular Biology Letters*, 9, 353-361.

12. KINTZIOS, S.E., BARBERAKI, M., AIVALAKIS, G., DROSSOPOULOS, J., HOLEVAS, C.D., 1997, *In vitro* morfogenetic responses of mature wheat embryos to different NaCl concentration and growth regulator treatments, *Plant Breeding*, 116, 113-118.
13. ARZANI, A. ve MIRODJAGH, S.-S., 1999, Response of durum wheat cultivars to immature embryo culture, callus induction and *in vitro* salt stress, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 58, 67-72.
14. VIKRANT, A. ve RASHID, A., 2001, Comparative study of somatic embryogenesis from immature and mature embryos and organogenesis from leaf-base of *Triticale*, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 64, 33-38.
15. CHUGH, A. ve KHURANA, P., 2003, Regeneration via somatic embryogenesis from leaf base segments and genetic transformation of bread and emmer wheat by particle, *Plant Cell, Tissue Organ Culture*, 74, 151-161.
16. CASWELL, L.K., LEUNG, L.N., CHIBBAR, N.R., 2000, An efficient method for *in vitro* regeneration from immature inflorescence explants of Canadian wheat cultivar, *Plant Cell, Tissue Organ Culture*, 60, 69-73.
17. KUMLEH, J., SCHIEDER, O., LÖRZ, H., 1997, *In vitro* development of wheat (*Triticum aestivum* L.) from zygote to plant via ovul culture, *Plant Cell Reporter*, 16, 663-667.
18. BARTÓK, T. ve SÁGI, F., 1990, A new, endosperm-supported callus induction method for wheat (*Triticum aestivum* L.), *Plant Cell, Tissue Organ Culture*, 22, 37-41.
19. DELPORTE, F., MOSTADE, O., JACQUEMIN, J.M., 2001, Plant regeneration through callus initiation from thin mature embryo fragment of wheat, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 67, 73-80.
20. WANG, C.-T. ve WEI, Z.-M., 2004, Embryogenesis and regeneration of green plantlets from wheat (*Triticum aestivum* L.) leaf base, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 77, 149-156.
21. ALMANSOURI, M., KINET, J.M., LUTTS, S., 2001, Effect of salt and osmotic stresses on germination in durum wheat (*Triticum durum* Desf.), *Plant and Soil*, 231, 243-254.
22. ALIZADEH, H., NAGHAVI, M.R., OMIDI, M., SAATIAN, B., 2004, Effect of plant growth regulators on direct shoot regeneration of wheat (*Triticum aestivum* L.), 4th International Crop Science Congress Brisbane, Australia, 26.9 – 1.10.2004, ISBN: 920842 20 9 www.cropscience.org.au [Ziyaret tarihi: 27 Mayıs 2005]
23. MILLS, D., 1989, Differential response of various tissues of *Asparagus officinalis* to sodium chloride, *J. Exp. Bot.*, 40, 485-491.

24. ÖZCAN, S., GÜREL, E., BABAOĞLU, M., 2001, *Bitki Biyoteknolojisi II. Genetik Mühendisliği ve Uygulamaları*, Selçuk Üniversitesi Vakıf Yayınları, Konya, ISBN: 975-6652-05-5.
25. LIU, T., STADEN, J., Cress, W.A., 2000, Salinity induced nuclear and DNA degradation in meristematic cells of soybean (*Glycine max. (L.)*) roots. *Plant Growth Regulation*, 30, 49-54.
26. KÖY HİZMETLERİ GENEL MÜDÜRLÜĞÜ, Türkiye Toprak Su Kaynakları ve Çölleşme <http://www.khgm.gov.tr/kutuphane/collesme/collesme.htm> [Ziyaret tarihi: 27 Mayıs 2005]
27. ASHRAF, M. ve AÇIKGÖZ, N., 1998, Arpa tuza dayanıklı genotiplerin seleksiyonu için uygun yöntem saptanması üzerine bir araştırma. Bitkilerde stres fizyolojisinin moleküler temelleri, E. Ü. Ziraat Fak .E. Ü. Bilim-Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi , 55-59.
28. KANBER, R., ÇULLU, M. A., KANDİRLİ, B., ANTEPLİ, S., YILMAZ, N., Sulama, Drenaj ve Tuzluluk www.zmo.org.tr/etkinlikler/6tk05/013rizakanber.pdf [Ziyaret tarihi: 27 Mayıs 2005]
29. SAIRAM, R.K. ve TYAGI, A., 2004, Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants, *Current Science*, 86 (3), 407-421.
30. TABAN, S., GÜNEŞ, A., ALPASLAN, M., ÖZCAN, H., 1999, Değişik mısır (*Zea mays L. Cvs*) Çeşitlerinin Tuz stresine dayanıklılıkları, *Turk J. Agric For.*, 3, 625-633.
31. SAIRAM, K.R., RAO, V.K., SRIVASTAVA, G.C., 2002, Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration, *Plant Science*, 163, 1037-1046.
32. AVCIOĞLU, R., KHALVATI, M.A., DEMİROĞLU, G., GEREN, H., 2003a, Osmotik Basıncın Bazı Kültür Bitkilerinin Erken Gelişme Dönemlerindeki Etkileri I. Çimlenme ve Büyüme Özellikleri, *Ege Üniv. Ziraat Fak. Der.*, 40(2), 1-8.
33. AVCIOĞLU, R., DEMİROĞLU, G., KHALVATI, M.A., GEREN, H., 2003b, Osmotik Basıncın Bazı Kültür Bitkilerinin Erken Gelişme Dönemlerindeki Etkileri II. Prolin, Klorofil Birikimi ve Zar Dayanıklılığı, *Ege Üniv. Ziraat Fak. Der.*, 40(2), 9-16.
34. NEUMANN, P., 1997, Salinity resistance and plant growth revisited, *Plant, Cell and Environment.*, 26, 1193-1196.
35. NETTO, L., 2001, Oxidative stress response in sugarcane, *Genetics and Molecular Biology*, 24 (1-4), 93-102.

36. BOWLER, C., MONTAGU, V.M., INZE, D., 1992, Superoxide dismutase and stress tolerance, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 43, 83-116.
37. ARORA, A., SAIRAM, R.K., SRIVASTAVA, G.C., 2002, Oxidative stress and antioxidative system in plant. *Current Science*, 82 (10), 1227-1238.
38. BLOKHINA, O., VIROLAINEN, E., FAGERSTEDT, K.V., 2003, Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review, *Anal Botany*, 91, 179-194.
39. KILIÇ, K. ve KILIÇ, A., 2002, Oksijen toksisitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri, *Hacettepe Tıp Dergisi*, 33(2), 110-118.
40. NETO, A.D.A., PRISCO, J.T., ENÉAS-FILHO, J., BRAGA De ABREU, C.E., GOMES-FILHO, E., 2005, Effect of salt stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of salt-tolerant and salt-sensitive maize genotypes, *Environmental and Experimental Botany*, Xxx. Xxx-xxx.
41. EL-BAKY, A., HANAA, H., AMAL, A.M., HUSSEİN, M.M., 2003, Influence of salinity on lipid peroxidation , antioxidant enzymes and electrophoretic patterns of protein and isoenzymes of some onion cultivars, *Asian Journal of Plant Sciencs*, 2 (17-24), 1220-1227.
42. SIGH, N.K., BRACKEN, P.M., HASEGAWA, A.K., HANDA, A. K., BUCKEL, S., HERMODSON, M.A., PFANKOCH, F., REGNIER, F.E., BRESSAN, R.A., 1987, Characterization of osmotin. A thaumin-like protein associated with osmotic adjustment in plant cell, *Plant Physiol.*, 85, 529-536.
43. ÇAKATAY, U., TELCİ, A., YILMAZ, İ. A., AKÇAY, T., SIVAS, A., 2000, Yaşlanmanın plazma oksidatif protein hasarına etkisi, *Cerrahpaşa Tıp Der.*, 31 (4), 220-223.
44. ASHRAF, M. ve HARRIS, C.J.P., 2004, Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants, *Plant Science*, 166, 3-16.
45. YOKOI, S., BRESSAN, A.R., HASEGAWA, M.P., 2002, Salt stress tolerance of plants, *JIRCAS Working Report*, 25-33.
46. BOR, M., ÖZDEMİR, F., TÜRKAN, I., 2003, The effect of salt stress on lipid peroxidation and antioxidants in leaves of sugar beet *Beta vulgaris* L. and wild beet *Beta maritima* L., *Plant Science*, 164, 77-84.
47. LEE, D.H., KIM, Y.S., LEE, C.B., 2001, The inductive responses of the antioxidant enzymes by salt stress in the rice (*Oriza sativa* L), *J. Plant Physiol.*, 158, 737-745.
48. ELLİALTIOĞLU, Ş. ve TIPIRDAMAZ, R., 1998, Doku kültürünün tuz stresine dayanıklılıkta kullanımı, Bitkilerde stres fizyolojisinin moleküler temelleri. E.Ü.

Ziraat Fak. E.Ü. Bilim –Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi
70-81.

49. ARNON, D.I., 1949, Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*, *Plant Physiology*, 24 (1), 1-15.
50. BRADFORD, M.M., 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, 72, 248-254.
51. YALIN ,S., YILDIZ, M.Ş., AKSOY, K., 2000, Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enzim eksikliği saptanan bir ailenin eritrosit zar yapısı ile antioksidant sistemi, *Çuk. Ünv. Tıp Fak. Dergisi*, 25(1), 6-10.
52. PANDA, S.K., SINGHA, L.B., KHAN, M.H., 2003, Does aluminium phytotoxicity induce oxidative stress in greengram (*Vigna radiate*)?, *Bulg. J. Plant Physiol.*, 29 (1-2), 77-86.
53. MITTAL, R. ve DUBEY, S.R., 1991, Behaviour of peroxidases in rice: changes in enzyme activity and isoforms in relation to salt tolerance., *Plant Physiol. Biochem.*, 29, 1, 31-40.
54. AEBI, H., 1984, Catalase *in vitro*, *Methods in Enzimology*, 105, 121-126.
55. ZAR, J.H., 1984, *Biostatistical Analysis*. Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey.
56. ZAIR, I., CHLYAH, A., SABOUNJI, K., TITTAHSEN, M., CHLYAH, H., 2003, Salt tolerance improvement in some wheat cultivars after application of *in vitro* selection pressure, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 73, 237-244.
57. PELLEGRINESCHI, A., BRITO, M.R., McLEAN, S., HOISINGTON, D., 2004, Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and NaCl on the establishment of callus and plant regeneration in durum and bread wheat, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 77, 245-250.
58. TURHAN, H. ve BASER, I., 2004, Callus induction from mature embryo of winter wheat (*Triticum aestivum* L.), *Asian Journal of Plant Sciences*, 3 (1), 17-19.
59. GARRATT, L.C., JANAGOUDA, B.S., LOWE, K.C., ANTHONY, P., POWER, B., DAVEY M.R., 2002, Salinity tolerance and antioxidant status in cotton cultures, *Free Radical Biology & Medicine*, 33 (4), 502-511.
60. LIU, T. ve STADEN, J., 2000, Selection and characterization of sodium chloride-tolerant callus of *Glycine max* (L.) Merr cv. Acme, *Plant Growth Regulation*, 31, 195-207.

61. SHEREEN, A. ve ANSARI, R., 2001, Salt tolerance in soybean (*Glycine max* L.): effect on growth and water relations, *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 4 (10), 1212-1214.
62. DI BACCIO, D., NAVARI-IZZO, F., IZZO, R., 2004, Seawater irrigation: antioxidant defence responses in leaves and roots of a sunflower (*Helianthus annuus* L.) ecotype, *Journal of Plant Physiology*, 161, 1359-1366.
63. VAIDYANATHAN, H., SIVAKUMAR, P., CHAKRABARTY, R., THOMAS, G., 2003, Scavenging of reactive oxygen species in NaCl-stressed rice (*Oryza sativa* L.) differential response in salt-tolerant and salt-sensitive varieties, *Plant Science*, 165, 1411-1418.
64. SİVRİTEPE, N. ve ERİŞ, A., 1999, Determination of salt tolerance in some grapevine cultivars (*Vitis vinifera* L.) under *in vitro* conditions, *Tr. J. of Biology*, 23, 473-485.
65. ÇANAKÇI, S., ve MUNZUROĞLU, Ö., 2002, Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L) yaprak disklerinde ağırlık değişimleri, pigment ve protein miktarları üzerine asetil salisilik asit ve tuz uygulamasının karşılıklı etkileri. *S. D. Ü. Fen Bil. Ens. Dergisi*, 6, 2, 87-97.
66. GARG, N. ve SINGLA, R., 2004, Growth, photosynthesis, nodule nitrogen and carbon fixation in the chickpea cultivars under salt stress, *Braz. J. Plant Physiol.*, 16, 3, 137-146.
67. SAIRAM, R.K. ve SRIVASTAVA G.C., 2002, Changes in antioxidant activity in subcellular fractions of tolerant and susceptible wheat genotypes in responses to long term salt stress, *Plant Science*, 162, 897-904.
68. LUTTS, S., KINET, J.M., BOUHARMONT, J., 1996, NaCl induced senescence in leaves of rice (*Oryza sativa* L.) cultivars differing in salinity resistance, *Annals of Botany*, 78, 389-398.
69. PAREEK, A., SINGLA, S.L., GROVER, A., 1997, *Salt responsive proteins/genes in crop plants*, in: P.K. Jaiwal, R.P. Singh, A. Gulati (Eds.), *Strategies for improving salt tolerance in higher plants*, Oxford and IBH Publication CO., New Delhi, 365-39.
70. İLBİ, H. ve ESER, B., 1995, *Brasica oleracea* türünde botanik varyete ve kültür varyetelerinin tohum proteinleri ile ayırt edilmeleri. 89-96. Wprkshop "Biyoteknoloji ve Bitki Islahı" Tarla Bitkileri Bilimi Derneği, E. Ü. Z. F. Tarla Bitkileri Bölümü, TÜBİTAK-MAM, İ.Ü. BİYOGEM ve TÜBİTAK. Gebze/Kocaeli, 1995.
71. PARIDA, A.K., DAS, A.B., MOHANTY, P., 2004, Defense potentials to NaCl in a mangrove, *Bruguiera parviflora*: Differential changes of isoforms of some antioxidative enzymes, *J. Plant Physiol.*, 161, 531-542.

72. DAVENPORT, B.S., GALLEG0, M.S., BENAVIDES, P.M., TOMARO, L.M., 2003, Behaviour of antioxidant defense system in the adaptive response to salt stress in *Heliantus annus* L. cells, *Plant Growth Regulation*, 40, 81-88.
73. ABRONA, V., FLORS, V., JACAS, J., GARCÍA-AGUSÍN, P., GÓMEZ-CADENAS, A., 2003, Enzymatic and non-enzymatic antioxidant responses of Carrizo Citrange, a salt-sensitive citrus rootstock, to different levels of salinity. *Plant Cell Physiol.*, 44, 4, 388-394.
74. DIONISIO-SESE, M. ve TOBITA, S., 1998, Antioxidant responses of rice seedlings to salinity stress, *Plant Science*, 135, 1-9.
75. ZHU, Z., WEI, G., LI, J., QIAN, Q., YU, J., 2004, Silicon alleviates salt stress and increases antioxidant enzymes activity in leaves of salt-stressed cucumber (*Cucumis sativus* L.), *Plant Science*, 167, 527-533.
76. JBIR N., CHAIBI, W., AMMAR, S., 2001, Root growth and lignification of the two wheat species differing in their sensitivity to NaCl, in response to salt stress, *C. R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la vie / Life Sciences*, 342, 863-868.
77. POLLE, A., OTTER, T., SEIFERT, F., 1994, Apoplastic peroxidases and lignification in needles of Norway spruce (*Picea abies* L.). *Plant Physiol.* 106, 53-60.
78. SATO, Y., SUGIYAMA, M., KOMAMINE, A., FUKUDA, H., 1993, Separation and characterization of the isoenzymes of wall-bound peroxidase from cultured *Zinnia* cells during tracheary element differentiation, *Planta*, 196, 141-147.
79. CATTESON, A.M., CZANINSKI, Y., MONTEIS, B., 1978, Caracteres histochemiques des peroxidases parietales dans les cellules en cours de lignification., *C. R. Acad. Sci. Paris* D286, 1787-1790.
80. BOYER, N., GASPAR, T., AND LAMOND, M., 1979, Modification des isoperoxidases et de l'allongement des entre-noeuds de bryone a la suite d'irritations mecaniques. *Z. Pflanzenphysiol.*, 93, 459-470.
81. SHALATA, A. ve TAL, M., 1998, The effect of salt stress on lipid peroxidation antioxidant in the leaf of the cultivated tomato and its wild salt tolerant relative (*Lycopersicon pennellii*), *Physiol. Plant.*, 104, 169-174.
82. KELEŞ, Y. ve ÖNCEL, I., 2002, Respons of antioxidative defence system to temperature and water stress combination in wheat seedlings, *Plant Science*, 163, 783-790.
83. RIOS-GONZALEZ, K., ERDEI, L., LIPS, H.S., 2002, The activity of antioxidant enzymes in maize and sunflower seedlings as affected by salinity and different nitrogen source, *Plant Science*, 162, 923-930.

ÖZGEÇMİŞ

09.11.1980 tarihinde Bulgaristan'ın Kırcaali şehrinde doğdum. İlk, orta ve lise eğitimimi İstanbul'da tamamladım. 1998 yılında İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nü kazandım. Haziran-2002 yılında İstanbul Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nden mezun olduktan sonra aynı yılın Eylül ayında İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı Genel Biyoloji Programında Yüksek Lisans eğitimime başladım.

25-29 Ağustos 2003 tarihleri arasında Biyoteknoloji Derneği ve Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi tarafından Çanakkale'de düzenlenen XIII. Biyoteknoloji Kongresi'ne dinleyici olarak katıldım.