

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**BAZI ARMUT ANAÇLARINDA *in Vitro* KOŞULLARDA TUZLULUK STRESİ
ALTINDA GEN İFADE ANALİZİ ÜZERİNDE ÇALIŞMALAR**

Javad JAVADİSABER

BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

**ANKARA
2014**

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Javad JAVADİSABER tarafından hazırlanan “**Bazı Armut Anaçlarında *in Vitro* Koşullarda Tuzluluk Stresi Altında Gen İfade Analizi Üzerinde Çalışmalar**” adlı tez çalışması .../.../2014 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı’nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. Hatice DUMANOĞLU
Ankara Üniversitesi Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

Jüri Üyeleri:

Başkan: Prof. Dr. Hatice DUMANOĞLU
Ankara Üniversitesi Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

Üye : Prof. Dr. Gökhan SÖYLEMEZOĞLU
Ankara Üniversitesi Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

Üye : Prof. Dr. Sümer ARAS
Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı

Üye : Doç. Dr. Bekir ŞAN
Süleyman Demirel Üniversitesi Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

Üye : Doç. Dr. Gölge SARIKAMIŞ
Ankara Üniversitesi Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr.İbrahim DEMİR
Enstitü Müdürü

ETİK

Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

09/06/2014

Javad JAVADİSABER

ÖZET

Doktora Tezi

BAZI ARMUT ANAÇLARINDA *in Vitro* KOŞULLARDA TUZLULUK STRESİ ALTINDA GEN İFADE ANALİZİ ÜZERİNDE ÇALIŞMALAR

Javad JAVADİSABER

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Hatice DUMANOĞLU

Bu çalışmada, bazı armut (Ankara armudu ve OH x F 333) (*Pyrus communis* L.), ahlat (Ahlat-1, Ahlat-2, Ahlat-3) (*P. elaeagrifolia* Pall.) ve ayva (*C. oblonga* Mill.) (Quince A) genotiplerinde farklı tuz stresi seviyelerinin *in vitro* koşullarda mikro sürgünlerin büyüme ve gelişmesi üzerine etkileri ve tuz stresi altında mikro sürgünlerde dehidrin gen ifadeleri araştırılmıştır. Tuzluluk stresi, besin ortamlarına 75, 150, 225 ve 300 mM NaCl ve 7.5, 15, 22.5 ve 30 mM CaCl₂.2H₂O ilave edilmesiyle oluşturulmuştur. Stres koşulları altında mikro sürgünler 4 hafta süreyle tutulmuştur. Bu sürenin sonunda kültürlerde sürgünlerin canlılık oranı, ortalama sürgün sayısı, uzunluğu ve kalınlık düzeyi, kallus çapı, sürgünlerde zararlanma düzeyi ve ortalama yaş ağırlık özellikleri morfolojik olarak incelenmiştir. Çalışmada gen ifade analizleri için 225 mM NaCl + 22.5 mM CaCl₂.2H₂O tuz konsantrasyonu kullanılmıştır. Tuz uygulamasından 24, 48, 96 ve 192 saat sonra mikro sürgünlerde dehidrin gen ifade profilleri belirlenmiştir.

Çalışmada, Ankara armudu, Quince A ve Ahlat-3 genotiplerinde tüm tuz seviyelerinde sürgünlerin canlılık oranı yüksek değerlerde (%80.5-100.0) bulunmuştur. Ortalama sürgün sayısı tüm genotiplerde kontrole (4.36-8.47 adet/eksplant) göre tuz uygulamalarında istatistiksel anlamda önemli düzeyde daha düşük (1.0-2.52 adet/eksplant) bulunmuştur. Genel olarak tuz konsantrasyonunun yükselmesi ile birlikte ortalama sürgün kalınlık düzeyi azalmış, sürgün uzunluğu ise genellikle kontrol ile benzer olmuştur. Tuz konsantrasyonunun yükselmesi ile birlikte kallus çapı ve toplam yaş ağırlık değerleri düşmüş, sürgünlerde zararlanma düzeyi artmıştır. Sürgünlerde en şiddetli zararlanma düzeyi 300 mM NaCl+30 mM CaCl₂.2H₂O tuz uygulamasında belirlenmiştir.

Dehidrin gen ifadesi bakımından Quince A, Ahlat-3, OHxF 333, Ahlat-2 (24 saat) ve Ankara armudu (48 saat) genotipleri tuzluluk stresine daha erken cevap vermiştir. Sonuç olarak, Ahlat-3, Quince A ve Ankara armudunun mikro sürgünlerinin özellikle yüksek tuz konsantrasyonlarında canlılıklarını yüksek oranlarda devam ettirmesi bu genotiplerin tuz stresine karşı toleranslı olabileceği kanaatini doğurmuştur. Bu genotiplerin dehidrin gen ifadesi daha erken olan (24-48 saat) genotipler içerisinde yer alması dikkat çekmiştir.

Haziran 2014, 98 sayfa

Anahtar Kelimeler: *Pyrus*, *Cydonia*, armut, anaç, abiotik stres, tuzluluk, *in vitro*, dehidrin, gen ifadesi

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

STUDIES ON ANALYSIS OF GENE EXPRESSION UNDER *in Vitro* SALINITY STRESS IN SOME PEAR ROOTSTOCKS

Javad JAVADİSABER

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Horticulture

Supervisor: Prof. Dr. Hatice DUMANOĞLU

In this study, the effects of different salt stress levels on growth and development of *in vitro* grown micro-shoots of some pear (Ankara pear and OH x F 333) (*Pyrus communis* L.), wild pear (Ahlat-1, Ahlat-2, Ahlat-3) (*P. elaeagrifolia* Pall.) and quince (*C. oblonga* Mill.) (Quince-A) genotypes as well as dehydrine gene expression of micro-shoots under salt stress were investigated. Salt stress levels were created by addition of 75, 150, 225 and 300 mM NaCl and 7.5, 15, 22.5 and 30 mM CaCl₂.2H₂O to the culture media. Micro-shoots were subjected to stress conditions for 4 weeks. The rate of viability, average shoot number, length and thickness of shoots, diameter of callus, damage level on micro-shoots and fresh weight were determined. For gene expression analysis, salt concentration of 225 mM NaCl + 22.5 mM CaCl₂.2H₂O was used. Dehydrine gene expression levels were determined on micro-shoots after 24, 48, 96 and 192 hours of salt applications.

The results showed that survival rate of shoots in Ankara pear, Quince-A and Ahlat-3 genotypes were high (80.5-100.0%) in all salt concentrations. In all genotypes, average shoot number were significantly lower (1.0 -2.52 number/explant) than the controls (4.36 - 8.47 number/explant). In general, increased salt concentrations resulted in decreased average shoot thickness, but shoot lengths were similar to that of the controls. The callus diameter and total fresh weight decreased but the level of damage on shoots were increased. The highest level of damage were observed on shoots treated with 300 mM NaCl+30 mM CaCl₂.2H₂O salt concentration.

For dehydrine gene expression, the genotypes of Quince-A, Ahlat-3, OHxF 333, Ahlat-2, and Ankara pear cultivar gave earlier response (24 - 48 hours, respectively) than other genotypes under salt stress. As a result, high viability rates of Ahlat-3, Quince-A and Ankara pear micro-shoots under high salt concentrations may indicate that these genotypes could be more tolerant to salt stress than the others. Also, these genotypes were found among the genotypes which showed earlier dehydrine gene expression (24 - 48 hours).

June 2014, 98 pages

Key Words: *Pyrus*, *Cydonia*, pear, rootstock, abiotic stress, salinity, *in vitro*, dehydrin, gene expression

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın her aşamasında yardımlarını esirgemeyen Danışman Hocam Sayın Prof. Dr. Hatice DUMANOĞLU'na (Ankara Üniversitesi Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı) tezimin gen ifade analizleri kısmında çalışmalarımı yönlendiren Eş Danışman Hocam Sayın Prof. Dr. Ali ERGÜL'e (Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü) tezim süresince denemelerime katkı sağlayan Tez İzleme Komitesi Hocalarım Sayın Prof. Dr. Gökhan SÖYLEMEZOĞLU (Ankara Üniversitesi Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı) ve Sayın Prof. Dr. Sümer ARAS'a (Ankara Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı) ve Doktora eğitimim boyunca daima desteğini gördüğüm eşime teşekkürlerimi sunarım.

10B4347003 numaralı “Armut Anacı Islahı Kapsamında Ahlat Genotiplerinin (*Pyrus elaeagrifolia* Pallas) Tuzluluk, Kuraklık ve Demir Noksanlığı Streslerine Karşı Performanslarının *in vitro* Koşullarda Belirlenmesi ve Stres Altında Mikro Sürgünlerde Bazı Mineral Madde ve Enzim Düzeyleri ile Dehidrin Geni İfadesinin Araştırılması” isimli proje kapsamında tezime destek sağlayan Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinasyon Birimi Koordinatörlüğü'ne teşekkür ederim.

Javad JAVADİSABER
Ankara, Haziran 2014

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI

ETİK	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ÖZETLERİ	4
2.1 Stres	4
2.2 Tuzluluk	4
2.2.1 Toprakların tuzluluk bakımından sınıflandırılması	6
2.2.2 Sulama suyunun tuzluluk bakımından sınıflandırılması	6
2.2.3 Bitkilerin tuza dayanıklılık bakımında sınıflandırılması	7
2.3 Tuz Stresi ve Bitkilerdeki Etki Mekanizması	8
2.3.1 Osmotik etki	8
2.3.2 Toksik etki	9
2.3.3 Beslenme etkisi	10
2.4 Tuz Stresine Toleransın Moleküler Mekanizması	11
2.4.1 İyon homeostazisinin SOS (salt overly sensitive-tuza aşırı duyarlılık) sinyali yolu	11
2.4.2 Tuza toleransın biyokimyasal belirleyicileri: enzimler, osmotik düzenleyiciler ve koruyucu faktörler.....	13
2.5 Stres Koşullarında Bitkilerde Dehidrin Geninin İfadesi	18
2.6 Meyve Türlerinde Tuz Stresine Tepkinin <i>in Vitro</i> Koşullarda Belirlenmesi	24
2.7 <i>Pyrus</i> Türlerinin Tuz Stresine Tepkisi.....	34
3. MATERYAL ve YÖNTEM	40
3.1 Materyal	40
3.2 Yöntem	42
3.2.1 Mikro çeliklerin elde edilmesi	42
3.2.2 Tuzluluk stresinin oluşturulması	44
3.2.3 Gen ifade analizleri	45

4. ARAŞTIRMA BULGULARI	57
4.1 Tuzluluk Stresine Karşı <i>Pyrus</i> spp. ve <i>Cydonia oblonga</i> Genotiplerinin <i>in Vitro</i> Koşullarda Sürgün Gelişim Performansları	57
4.1.1 Canlılık oranı	62
4.1.2 Ortalama sürgün sayısı	63
4.1.3 Ortalama sürgün uzunluğu	63
4.1.4 Ortalama sürgün kalınlık düzeyi	63
4.1.5 Kallus çapı	63
4.1.6 Sürgünlerde zararlanma düzeyi	64
4.1.7 Ortalama yaş ağırlık	64
4.2 Tuzluluk Stresi Altında <i>Pyrus</i> spp. ve <i>Cydonia oblonga</i> Genotiplerinde Mikro Sürgünlerde Dehidrin Geni İfadesi	65
4.2.1 İzole edilen RNA'nın miktar ve kalitesi, RNA'dan cDNA sentezlenmesi	65
4.2.2 cDNA sentezi, PCR ile çoğaltılması, klonlanması ve sekansının elde edilmesi	65
4.2.3 Real time PCR	69
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	79
KAYNAKLAR	85
ÖZGEÇMİŞ	98

SİMGELER DİZİSİ

°C	Santigrat
µM	Mikromolar
µmhos/cm	Mikromhos/Cm
A	Adenin
bç	Baz Çifti
C	Sitozin
CaCl ₂	Kalsiyum Klorür
cDNA	Komplementer DNA
Ct	Eşik döngü değeri
dS/m	Decisiemens/M
EtOH	Etil Alkol
G	Guanin
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
kDa	Kilo Dalton
LiCl	Lityum Klorür
MgCl ₂	Magnezyum Klorür
mM	Milimolar
mmhos/cm	milimhos/cm
NaCl	Sodyum Klorür
RNA	Ribonükleik Asit
Rpm	Dakikada Devir
T	Timin

Kısaltmalar

ABA	Absisik Asit
ACC	1-Amino-Cyclopropane-1-Carboxylic Acid
ACT	Aktin
ADC	Arginin Dekarboksilaz
AH-1	Ahlat-1
AH-2	Ahlat-2
AH-3	Ahlat-3
AIH	Agmatine İminohidrolaz
AN-19	Ankara Armudu Klon 19
BA	Benziladenin
BADH	Betain Aldehit Dehidrogenaz
CAT	Katalaz
CMO	Kolin Monoooksijenaz
COR	Soğuk ile Regüle Olan
CPA	N-Carbamoyl Putresin Amidohidrolaz
CTAB	Hekzadesil Trimetil Amonyum Bromür
DAO	Daimine Oksidase
dcSAM	Decarboylated S-Aden-Osylmethionine
DEPC	Diethylpyrocarbonate
dhn	Dehidrin
DKW	Driver ve Kuniyuki Walnut

DNase	Deoksiribonükleaz
dNTP	Deoksiribonükleotit
EC	Elektriksel İletkenlik
ERD	Su Kaybına Erken Cevap
GA ₃	Gibberellik Asit
GABA	Gamma Aminobutyric Acid
GR	Glutathion Reduktaz
KIN	Soğuk ile İndüklenen
LEA	Geç Embriyogenez Proteinleri
LT	Don Etkisi Olmayan Düşük Sıcaklık
M	East Malling elma anaçları serisi
MDA	Malondialdehit
MeJa	metil jasmonat
MM	Malling Merton elma anaçları serisi
MS	Murashige ve Skoog
NAD ⁺	Nikotinamid Adenin Dinükleotid
ODC	Ornitin Dekarboksilaz
OHxF	Old HomexFarmingdale
PAO	Polyamine Oxidase
PCR	Polimeraz Zincirleme Tepkimesi
POD	Peroksidaz
QA	Quince A
QAC	Dörtlü Amonyum Bileşikleri
RAB	ABA'ya Yanıt
RD	Su Kaybına Cevap
RGR	Nisbi Büyüme Oranındaki
RNase	Ribonükleaz
SA	Salisilik Asit
SAM	S-Adenosylmethionine
SAMDC	S-Adenosylmethionine Decarboxylase
SD	Kısa Gün Koşulları
SLS	Sample Loading Solusyonu
SOD	Superoksit Dismutaz
SOS	Tuza Aşırı Duyarlı
SPDS	Spermidine Sythase
SPMS	Spermine Synthase
SSTE	Sodium Dodecyl Sulfate-Tris-HCl-EDTA

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1	Tuz stresi koşullarında <i>Arabidopsis</i> 'te iyon homeostazisi için SOS sinyal yolu (Chinnusamy vd. 2005)	13
Şekil 2.2	Asilik polioller, sorbitol ve manitol, siklik polioller, myo-inositol, D-ononitol ve D-pinitolün sentez yolları (Lauchli ve Lutttge 2004)	16
Şekil 2.3	Bitkilerde poliaminlerin biyosentezi (Alcazar vd. 2006)	17
Şekil 2.4	Tuz stresi koşullarında <i>Arabidopsis</i> 'te iyon homeostazisi için SOS sinyal yolu (Chinnusamy vd. 2005)	19
Şekil 4.1	Armut (Ankara armudu, OHxF 333), ahlat (Ahlat-1, Ahlat-2, Ahlat-3) ve ayva (Quince A) genotiplerinde <i>in vitro</i> koşullarda tuz stresi altında mikro sürgünlerin görünümü	62
Şekil 4.2	Ahlat-3, Ankara Armudu (Klon 19) ve Quince A (soldan-sağa) genotiplerinde RNA bantlarının görünümü	65
Şekil 4.3	İzole edilen RNA'ların görünümü	69
Şekil 4.4	Real time PCR cihazından alınan aktin primerine ait standart eğri grafiği, etkinlik ve slope değerleri	73
Şekil 4.5	Real time PCR cihazından alınan dehidrin primerine ait standart eğri grafiği, etkinlik ve slope değerleri	74
Şekil 4.6	Dehidrin primerinde standart ve örneklere ait amplifikasyon eğrileri	75
Şekil 4.7	ACT primerinde standart ve örneklere ait amplifikasyon eğrileri analizleri	75
Şekil 4.8	Kontrole göre genotiplerde stres uygulamasından 24 saat sonra dehidrin geninin ifade seviyeleri	76
Şekil 4.9	Kontrole göre genotiplerde stres uygulamasından 48 saat sonra dehidrin geninin ifade seviyeleri	77
Şekil 4.10	Kontrole göre genotiplerde stres uygulamasından 96 saat sonra dehidrin geninin ifade seviyeleri	77
Şekil 4.11	Kontrole göre genotiplerde stres uygulamasından 192 saat sonra dehidrin geninin ifade seviyeleri	78

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1	Strese neden olan etmenler (Levitt 1974)	4
Çizelge 2.2	Dünyada tuzluluğun etkisinde olan alanların miktarı (Rengasamy 2006)	5
Çizelge 2.3	Elektriksel iletkenlik ve tuz içeriklerine göre sulama sularının sınıflandırılması (Bresler vd. 1982)	7
Çizelge 3.1	Modifiye edilmiş MS (Murashige ve Skoog) temel besin ortamının içeriği (Dodds ve Roberts 1993)	43
Çizelge 3.2	RNA ekstraksiyon buffer	46
Çizelge 3.3	SSTE buffer	47
Çizelge 3.4	Ligasyon koşulları	52
Çizelge 3.5	Dilute stop solüsyonu	55
Çizelge 4.1	<i>Pyrus</i> spp. ve <i>Cydonia oblonga</i> Mill. genotiplerinde <i>in vitro</i> koşullarda tuz stresi uygulamalarının mikro sürgünler üzerine etkisi	58
Çizelge 4.2	<i>Pyrus</i> spp. ve <i>Cydonia oblonga</i> Mill. genotiplerinde <i>in vitro</i> koşullarda farklı tuz stresi uygulamalarının mikro sürgünler üzerine ortalama etkisi	60
Çizelge 4.3	<i>Pyrus</i> spp. ve <i>Cydonia oblonga</i> Mill. genotiplerinde <i>in vitro</i> koşullarda tuz stresi uygulamalarının mikro sürgünler üzerine ortalama etkisi	61
Çizelge 4.4	Ahlat-3, Ankara Armudu (Klon 19) ve Quince A genotiplerinde RNA'nın spektrofotometrik değerleri	65
Çizelge 4.5	İzole edilen RNA'ların miktar ve kalite özellikleri	70
Çizelge 4.6	Dehidrin primer optimizasyon koşulları	72
Çizelge 4.7	ACT Primer optimizasyon koşulları	72
Çizelge 4.8	Real time PCR programı	72

1. GİRİŞ

Bitki verimliliği çevresel streslerden büyük ölçüde etkilenmektedir. Dünya çapında ürün kaybının temel nedeni abiyotik streslerdir ve birçok önemli üründe verimin %50'den fazlasının kaybına neden olmaktadır (Wang vd. 2003). Özellikle, tohum çimlenmesi, vejetatif gelişme, çiçeklenme ve meyve olgunlaşması gibi bitkinin tüm yaşamında etkili olabilen önemli abiyotik stres unsurlarından birisi olan tuzluluk (Sairam ve Tyagi 2004), tarımsal faaliyetlerin başladığı çağlardan beri insanoğlu için en büyük sorunlardan birisi olmuştur. Tarihte Sümerlerde olduğu gibi birçok uygarlık tuzluluk nedeni ile yok olmuştur (Hekmetshoar 1999). Tuzluluk özellikle kurak ve yarı kurak bölgelerde ortaya çıkmaktadır (Bernstein 1975, Tal 1984, Therios ve Misopolinos 1988, Zekri ve Parsons 1990). Bu bölgelerin özelliği, yağışların az olmasının yanı sıra buharlaşmanın yüksek olmasıdır ve bu durum toprağın yüzeyinde tuz birikimine neden olmaktadır. Öte yandan yanlış sulama uygulamaları da özellikle drenaj koşullarının kötü olduğu yerlerde tuzluluğa sebep olabilmektedir (Çavuşoğlu ve Kabar 2008). Bu soruna karşı uygun sulama ve drenaj programlarının oluşturulmasının yanında tuza toleranslı bitki genotiplerinin belirlenmesinin önemi büyüktür. Nitekim tuza toleranslılık bakımından bitki türleri arasında farklılıklar olduğu gibi aynı türe giren çeşitler arasında da ayrımlar bulunmaktadır (Turhan vd. 2005). Toprak tuzluluğu doğrudan bitkinin kök sistemini etkilediği için meyve yetiştiriciliğinde uygun anaçların kullanımı ile türlerin tuzlu koşullarda tarımı mümkün olabilmektedir. Genel olarak tuzluluğa dayanıklı olmadığı bilinen kültür armutlarında da (Matsumoto vd. 2006a) tuzlu koşullarda yetiştiricilik uygun anaçların kullanımı ile başarılabilmektedir (Matsumoto vd. 2006a, b, Musacchi vd. 2006, Matsumoto vd. 2008, Wu ve Zou 2009).

Armut, dünyada elmadan sonra en fazla yetiştirilen yumuşak çekirdekli meyve türüdür. Bu türün dünyada toplam üretimi 2012 yılı verilerine göre 23.6 milyon tondur. Bunun %1.9'unu karşılayan Türkiye, 439.7 bin tonluk üretim değeri ile Çin (16.3 milyon ton), Amerika Birleşik Devletleri (778.6 bin ton), Arjantin (700 bin ton), İtalya (645.5 bin ton), İspanya (400.6 bin ton), Güney Kore (394.6 bin ton), Hindistan (340 bin ton), Güney Afrika (338.6 bin ton) ve Japonya (299 bin ton) ile birlikte dünya armut üretiminde söz sahibi başlıca ülkeler arasında yer almaktadır (Anonymous 2014).

Bazı çeşitlerinin uzun süre depolanabilmesinin yanı sıra Kuzey ve Güney Yarımküre’de birçok ülkede, yazlık ve kışlık çok sayıda standart çeşitin üretimde yer alması ile pazarda tüm yıl boyunca taze olarak bulunabilen Avrupa (*Pyrus communis* L.) ve Doğu Asya (*P. serotina* Rehder) armutlarının yetiştiriciliği dünyada *Pyrus* ya da *Cydonia* türlerine dahil anaçlar üzerinde gerçekleştirilmektedir (Jackson 2005).

Diğer meyve türlerinde olduğu gibi armutlarda da stres unsurlarına karşı çeşitlerin tepkisi genellikle üzerine aşılı oldukları anaçlar tarafından belirlenmektedir (Palombi vd. 2007, Sharma ve Sharma 2008). Stres koşulları doğrudan bitkinin kök sistemini etkilediği için stres unsuruna toleranslı anaçların aşılı fidan üretiminde kullanımı olumsuz toprak koşullarına karşı mutlak bir çözüm niteliği taşımaktadır (Dolcet-Sanjuan vd. 1990, Ma vd. 2005, Matsumoto vd. 2006a, b, Musacchi vd. 2006, Matsumoto vd. 2008, Sharma ve Sharma 2008, Donnini vd. 2008, 2009, Wu ve Zou 2009). Gelecekte de tarımsal üretimde büyük sorunlar yaratacak olan stres unsurlarına karşı dayanıklı genotiplerin belirlenmesinin yanı sıra bu dayanıklılık mekanizmalarının açıklanması, dayanıklı bitkisel gen kaynaklarının korunması, moleküler genetikteki ileri tekniklerin kullanımı ile uygun genlerin tanımlanması 21. yüzyılın araştırma hedefleri arasında yer almaktadır (Kalefetoğlu ve Ekmekçi 2005).

Tarımda ekonomik etkileri büyük olan farklı stres koşullarının mekanizmasını aydınlatmak üzere son yıllarda araştırmacılar moleküler çalışmalara ağırlık vermişlerdir. Abiyotik stres koşullarında indüklenen genlerin belirlenmesi, bitkilerde strese karşı toleransın moleküler mekanizmalarının anlaşılması için genel bir yaklaşımdır. Bitkilerde stres koşullarında ortaya çıkan gen ürünleri düzenleyici (regülatör) ve tepki (response) proteinleridir. Düzenleyici proteinler tüm sinyal iletiminin veya doğrudan hücresel yanıtın bir parçası olup, kinaz, fosfataz, transkripsiyon faktörler, fosfolipaz C ve 14-3-3 proteinler grubunu içermektedir. Gerçek çevresel stres tepkisinin aquaporinler, osmolit biosentez için enzimler, şaperonlar, desaturaz, proteaz, detoksifikasyon enzimlerini ve geç embriyogenez proteinlerini kapsayan ikinci grup proteinler tarafından yaratıldığı düşünülmektedir. İkinci grup olan bu proteinlerin çoğu yüksek oranlarda hücresel dehidrasyona karşı hücre tarafından biriktirilmekte ve bu nedenle abiyotik stres toleransında rol oynamaktadır (Saavedra vd. 2006).

Dehidrinler, siyanobakterilerden yüksek bitkilere kadar tüm fotosentetik organizmalarda yüksek oranlarda bulunmaktadırlar (Yakubov vd. 2005). Dehidrin proteinlerin ifadesi, hücrelerde su kaybına neden olan çeşitli çevresel faktörlerle uyarılabilmektedir. Bu çevresel faktörler arasında, düşük sıcaklık, don, yüksek sıcaklık, kuraklık, tuzluluk ve aşırı buharlaşma en önemlileridir. Ayrıca, absisik asit (ABA) ve ağır metal içeriğindeki artışının dehidrinlerin ifadesini artırdığı bilinmektedir (Kosova vd. 2007, Xu vd. 2008a).

Bu tezin amacı, armuda anaç olarak kullanılan bazı armut (*Pyrus communis* L.), ahlat (*Pyrus elaeagrifolia* Pallas) ve ayva (*Cydonia oblonga* Mill.) genotiplerinde tuza toleranslığın, farklı konsantrasyonlarda sodyum klorür (NaCl) ve kalsiyum klorür ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ile oluşturulmuş tuzluluk stresi altında *in vitro* koşullarda belirlenmesi ve bu genotiplerde 225 mM NaCl+22.5 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ tuz stresi altında dehidrin geninin ifadesinin araştırılmasıdır.

2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Stres

Dünyada tarım alanlarının sadece %10'luk bölümünün her türlü stres faktörünün etkisinden uzak olduğu bildirilmektedir (Gorham vd. 1985). Stres, olumsuz etmenlerin ve koşulların etkisiyle ortaya çıkan ve bitkilerde yaşamsal işlevlerin zarar görmesine neden olan tepkilerdir. Strese neden olan faktörler abiyotik ve biyotik olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır (Çizelge 2.1) (Levitt 1972).

Çizelge 2.1 Strese neden olan etmenler (Levitt 1972)

Abiyotik etmenler		Biyotik etmenler
Fiziksel	Kimyasal	
Kuraklık	Hava kirliliği	Yabancı otlar
Sıcaklık	Ağır metaller	Böcekler
Radyasyon	Pestisitler	Mikroorganizmalar
Su baskını	Toksinler	Hayvanlar
Mekanik etmenler (rüzgar, (yağmur, kar vb.)	Tuzlar	Hastalıklar
Toprağın manyetik etkisi	Toprak pH'sı	

2.2 Tuzluluk

Nieman ve Shannon (1976) tuzluluğu, toprak suyunun yüksek oranda iyon içermesi olarak tanımlamaktadır (Hekmatshoar 1999).

Tuzluluk, özellikle kurak ve yarı kurak bölgelerde ortaya çıkmaktadır (Bernstein 1975, Tal 1984, Therios ve Misopolinos 1988, Zekri ve Parsons 1990). Bu bölgelerin özelliği, yağışların az olmasının yanı sıra buharlaşmanın yüksek olmasıdır ve bu durum toprağın yüzeyinde tuz birikimine neden olmaktadır. Nemli ve yağışlı iklim bölgelerinde ise fazla yağmur, tuzları yıkamakta ve bu nedenle tuzluluk düşük veya geçici bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır (Bernstein 1975).

Dünyada 955 milyon hektar alan tuzluluğun etkisinde bulunmaktadır (Çizelge 2.2) (Rengasamy 2006).

Çizelge 2.2 Dünyada tuzluluğun etkisinde olan alanların miktarı (Rengasamy 2006)

YER	ALAN (Bin hektar)	ORAN
AVRUPA	50.804	%5.3
ASYA	319.277	%33.4
Kuzey ve Orta Asya	211.686	
Güney Asya	87.608	
Güney Doğu Asya	19.983	
AMERİKA	146.883	%15.4
Kuzey Amerika	15.755	
Meksika ve Orta Amerika	1.965	
Güney Amerika	129.163	
AFRİKA	80.538	%8.4
AVUSTRALYA	357.330	%37.4
DÜNYA	954.832	%100.0

Tuzlu topraklarda tuzun fazlası bitkilere zarar vermektedir. Bu topraklar tuzun kaynağı, içeriği, dağılımı, toprak pH'sı ve organik madde kapsamı gibi fiziksel ve kimyasal özelliklere göre farklılık göstermektedir (Ponnamperuma 1984).

Tuzlu topraklar değişik konsantrasyon ve oranlarda Cl^- , SO_4^{-2} , HCO_3^- , Na^+ , Ca^{+2} , Mg^{+2} ve nadiren BO_3^{-3} ve K^+ iyonlarını içermektedir (Bernstein 1975). Toprakta bulunan tuzlar genellikle, klorürler (NaCl , MgCl_2 , CaCl_2), sülfatlar (Na_2SO_4 , MgSO_4 , K_2SO_4 , CaSO_4), nitratlar (Na_2NO_3 , KNO_3), karbonatlar ve bikarbonatlar (CaCO_3 , MgCO_3 , Na_2CO_3 , K_2CO_3) ve boratlardır. Ancak, doğada en fazla rastlanan tuz formu sodyum klorürdür (Tal 1984).

Toprak gibi suyun da tuz kompozisyonu çeşitlilik göstermektedir. Suların bir çoğunda genel katyonlar Ca^{+2} , Na^+ ve Mg^{+2} , anyonlar ise Cl^- , SO_4^{-2} ve HCO_3^- 'dir. Sularda tuzluluk ile $\text{Na} / \text{Na}+\text{Ca}$ arasında ilişki bulunmaktadır. Okyanus ve denizler gibi fazla tuzlu sularda bu oranın 1'e yakın olması sodyumun bu sularda etkili katyon olduğunu göstermektedir. Ancak, tuzu az veya orta düzeyde olan sularda, bu oran 0.1-0.7 arasındadır ve bu durumda etkin katyon Ca^{+2} 'dir (Grattan ve Grieve 1999).

2.2.1 Toprakların tuzluluk bakımından sınıflandırılması

Tüm topraklarda belirli miktarda eriyebilir tuz bileşikleri bulunmaktadır (Szaboles 1989). Bitki gelişmesini etkileyen tuzluluk düzeyi toprağın hem rutubet ve hem de eriyebilir tuz kapsamına bağlıdır. Ayrıca, belirli bir miktar tuzun kumlu topraktaki zararı, killi tınlı topraktakinden daha fazladır. Bunun nedeni, kumlu toprakların az su tutmasından dolayı daha tuzlu bir çözelti oluşturmasıdır. Toprak çözeltisi genellikle toprağı doyurmaya yeterli bir miktar suyun toprakla karıştırılmasından sonra oluşan macunun süzülmesi ile elde edilmektedir. Bu çözeltinin elektrik akımını taşıma kabiliyetinden yararlanılarak tuzluluk seviyesi kolaylıkla ölçülmektedir. Bu özelliğe elektriksel iletkenlik (EC) denilmekte ve milimhos/cm (mmhos/cm veya mS/cm) ya da dS/m (decisiemens/m) olarak ifade edilmektedir.

Topraklar, tuz düzeylerine bir başka ifadeyle elektriksel iletkenliğine ve bitkiye olan etkilerine göre 5 gruba ayrılmaktadır:

- 1- 0-1 mmhos/cm (çok az tuzlu): Tuzluluk etkisi çoğunlukla ihmal edilebilmektedir.
- 2- 2-4 mmhos/cm (az tuzlu): Çok duyarlı bitkilerin ürün verimi düşebilmektedir.
- 3- 4-8 mmhos/cm (tuzlu): Birçok bitkinin ürün verimi düşebilmektedir.
- 4- 8-16 mmhos/cm (çok tuzlu): Tuza dayanıklı bitkiler normal verim verebilmektedir.
- 5- > 16 mmhos/cm (aşırı tuzlu): Tuza dayanıklı birkaç tür verim verebilmektedir (Mahmoudi ve Hakimiyan 1995).

2.2.2 Sulama suyunun tuzluluk bakımından sınıflandırılması

Su kaynaklarının azalması nedeniyle kalitesi düşük olan suların tarımda kullanılması sonucunda bitkilerde ürün verimini azaltmaktadır (Ziska vd. 1990). Kalitesiz sulama suyu, yüksek düzeyde bileşikler içeren sulara denmektedir. Bu bileşiklerin en önemlisi ise tuzlardır (Plau 1997).

Sulama suları genel olarak 4 gruba ayrılmaktadır:

- 1- C1 sınıfı (tuzu az olan sular): Bu sular birçok bitkide sorunsuz olarak kullanılabilir.
- 2- C2 sınıfı (tuzu orta düzeyde olan sular): Drenajı olan topraklarda, orta düzeyde tuza dayanıklı bitkilerde kullanılmaktadır.
- 3- C3 sınıfı (tuzlu sular): Drenajı sınırlı olan topraklarda kullanılmamaktadır ve yetiştiricilikte tuzluluğa dayanıklı bitkiler seçilmektedir.
- 4- C4 sınıfı (tuzlu sular): Sulama suyu olarak çok istisnai durumlar dışında kullanılmamaktadır (Mahmoudi ve Hakimiyen 1995).

Sulama suları tuz içeriği ve elektriksel iletkenliklerine göre de 4 gruba ayrılmaktadır (Çizelge 2.3) (Bresler vd. 1982).

Çizelge 2.3 Elektriksel iletkenlik ve tuz içeriklerine göre sulama sularının sınıflandırılması (Bresler vd. 1982)

Suyun sınıfı	Elekterik iletkenlik (EC) (μ mhos/cm, 25°C)	Tuz içeriği (ppm)
Az tuzlu	0-400	0-25
Orta tuzlu	400-1200	350-750
Yüksek tuzlu	1200-2250	750-1450
Çok yüksek tuzlu	2250-5000	1450-3200

2.2.3 Bitkilerin tuza dayanıklılık bakımında sınıflandırılması

Bitkiler tuza dayanıklılık bakımından iki büyük gruba ayrılmaktadır:

1. Halofitler
2. Glikofitler

Halofitler, yüksek tuz konsantrasyonlarında yaşama yeteneği olan bitkilerdir (Flower vd. 1977) ve taksonomide 75 familya altında 220 cins ve 550 tür ile temsil edilmektedir (Tal 1984). Dayanıklılık durumunun geniş olması nedeniyle halofitler, gerçek halofitler ve oligohalofitler olarak ikiye ayrılmaktadırlar (Levitt 1972). Gerçek halofitler, yüksek tuz miktarına toleranslıyken, oligohalofitler orta tuz miktarına dayanıklıdır (Hekmetshoar 1999). Glikofitlerde ise tuzun en az miktarı büyümeyi

engellemektedir. Birçok bahçe bitkisi glikofitler grubunda yer almaktadırlar (Shannon 1984, Grattan ve Grieve 1999).

2.3 Tuz Stresi ve Bitkilerdeki Etki Mekanizması

Yüksek tuz konsantrasyonu koşulları, bitki büyümesini osmotik stres (su stresi), iyon toksisitesi ve beslenme (iyon dengesizliği) ile etkilemektedir (Leopard ve Willing 1984, Tal 1984, Therios ve Misopolinos 1988, Zerki ve Parsons 1990, Lioyd vd. 1990, Banuls vd. 1991).

2.3.1 Osmotik etki

Tuzun, hücrenin su potansiyelini çevresinden daha fazla düşürmesi sonucunda, hücrede su noksanlığı meydana gelmekte ve hücre sekonder strese maruz kalmaktadır. Bu stres osmotik bir tepki olduğundan osmotik stres veya fizyolojik kuraklık olarak tanımlanmaktadır (Levitt 1972). Düşük ve orta seviyelerdeki tuzun ilk etkisi osmotik etkilerdir. Tuzun osmotik etkisi genel olarak bitkilerde büyüme, yaprak rengi değişimi, kök/sürgün oranı ve olgunluk düzeyi gibi özelliklerde geriliğe neden olmaktadır (Shannon ve Grieve 1999). Michell vd.'ne (1995) göre Bartlett (Williams) armut çeşidinde dalların tuz stresi altında büyümesinin azalması, su eksikliğinden dolayıdır ve tuza olan bu tepki bir osmotik stres etkisidir (Myers vd. 1995).

Su potansiyeli düşük koşullarda, hücreler turgor basıncını düşük moleküler ağırlıklı çözünebilir maddelerle koruyabilmektedirler. Bu işleme osmotik düzenleme adı verilmektedir (Wyn ve Storey 1978). Osmotik düzenleme mekanizmaları bitki türlerine göre farklılık göstermektedir (Bernstein 1975). Bazı halofitler tuzları tüm yaşamları boyunca ölümlerine kadar biriktirmektedir (Hellebust 1976). Bu bitkilerde osmotik düzenleyici genellikle Na^+ ve bazen de K^+ 'dur. Halofitlerin sitoplazma enzimleri glikofitlerinki gibi yüksek tuz konsantrasyonuna duyarlı olmaktadır. Bu nedenle halofit bitkilerde tuzlar sitoplazmada vakuollere taşınmaktadır (Wyn ve Storey 1978).

Myers vd. (1995), glikofitlerde potasyum ve organik bileşiklerin, genel osmotik düzenleyici maddeler olduğunu bildirmektedir. Bu organik bileşikler:

- 1- Organik asitler: Glikofitlerde hücre vakuollerinde yüksek oranda organik asitler bulunmaktadır (Hellebust 1976).
- 2- Çözünabilir karbonhidratlar: Tuz stresine karşı çözünabilir şeker birikimi gösterilmektedir (Chauhan 1980). Bazı çam türlerinde, osmotik potansiyelin %30-50'sini şekerler oluşturmaktadır. Bu kapsamda zeytin manitol sentezleyen bir türdür (Tattini 1995).
- 3- Azot bileşikleri: Bitkilerde amino asitler sadece tuz stresinin sonucunda değil, su stresi koşullarında da biriktirilmektedir (Flower vd. 1977). *Citrus*'lar amonyum bileşikleri ve prolin betaine biriktirmektedir (Storey 1999). Ispanakta tuza tepki olarak glisin betain konsantrasyonunda yükselme görülmektedir (Lloyd vd. 1990). Stewart ve Lee'ye (1974) göre tuz konsantrasyonunun artışına bağlı olarak prolin miktarında artış meydana gelmektedir (Hellebust 1976).

2.3.2 Toksik etki

Suda eriyebilir tuzlar toprak çözeltisinde birikerek bitkilerde osmotik strese sebep olabildiği gibi Cl^- ve Na^+ gibi özel iyonların bitki gelişimi üzerine olumsuz toksik etkileri de meydana gelebilmektedir. Bu etki “spesifik iyon etkisi” olarak da tanımlanmaktadır (Bernstein 1975). Tuz stresi altındaki bazı ağaçlarda iyon birikimi ve spesifik iyon etkisinden dolayı yaprak nekrozları görülmezken, gelişmede gerileme ve verimlilikte düşüşler meydana gelmektedir.

Munns ve Termaat'a (1986) göre tuzlu koşullarda sodyumun yanı sıra en yüksek miktarda bulunan iyon olan klor tüm bitkiler için yaşamsal öneme sahip bir element olduğu halde, sodyum iyonu sadece halofit bitkilerde ve bazı C_4 bitkileri için önemli bir element olarak değer taşımaktadır (Koç 2005).

Tek yıllık bitkiler, çok yıllık bitkilere göre sodyuma daha dayanıklıdır. Aşılı bitkilerde ise iyonların etkisi, anaçların bu iyonları bitkinin taç kısmına taşıma durumlarına göre değişmektedir (Creda vd. 1990).

Sodyum toksisitesi bu elementin potasyuma göre daha yüksek oranda alınması ile ilişkilidir. Bu durum suyun yapısında bozulma ve proteinlerde hidrofilik ve hidrostatik güçlerin azalmasına neden olmaktadır. Ayrıca, Na⁺, enzimlerin aktivitesini patates (Ghosh 2001), domates (Cramer 1995) ve kasava bitkilerinde azaltmaktadır (Rai ve Takabe 2006).

Sodyum normal olarak köklerden alınmaktadır. Ancak, sodyumun zararlı etkisini önlemek için ksileme sodyum ile potasyumun yer değiştirme reaksiyonunun gerçekleşmesi ve böylece sodyumun bitkinin taç kısmına taşınması engellenmelidir (Awang ve Atherton 1994, Garcia-Agustin ve Primo-Millo 1995). Asma, avokado, kivi, elma (Chartzoulakis vd. 1995), turunçgiller (Banuls vd. 1991, Awang ve Atherton 1994, Schmutz ve Ludders 1993), nar (Schmutz ve Ludders 1993) ve antepfıstığı (Picchoni vd. 1990) sodyumun köklerde birikimi ve ksilem yoluyla taşınımının önlenmesinin mekanizması (Chartzoulakis vd. 1995) ispatlanmıştır.

Tuz stresinde sodyum iyonu yanında klor iyonu da bitkinin gereksiniminden daha fazla alınmaktadır. Klor, sodyuma göre yapraklara daha hızlı taşınabilmektedir (Boland vd. 1997). Klora tolerans bakımından meyve türleri arasında önemli farklılıklar olduğu gibi, çeşitler arasında da farklılıklar bulunmaktadır. Klora dayanıklı bitkiler bu elementi yavaşça absorbe etmektedir (Bernstein 1975).

2.3.3 Beslenme etkisi

Tuz stresi ile karşı karşıya kalan bitkilerde meydana gelen büyüme geriliği, osmotik stresle ilgili olduğu kadar mineral madde eksikliği ile de ilgilidir (Levitt 1972).

Birçok bahçe bitkisi glikofit olduğundan dolayı sadece düşük tuz koşullarında gelişebilmektedir. Bu bitkilerin beslenme amacıyla mineral madde absorpsiyonu, taşınması ve tüketim mekanizmaları tuzlu ortamlarda etkili olamamaktadır. Tuzlu ortamlarda Na⁺ ve Cl⁻ konsantrasyonları, bitki beslenmesinde çok tüketilen mineral maddelerin yani makro elementlerin (azot, fosfor, potasyum gibi) genellikle 2-3 katıdır. Bu orantı mikro elementler için çok daha yüksektir. Dolayısıyla Na⁺ ve Cl⁻ iyonlarının

yüksek konsantrasyonları toprakta makro ve mikro elementlerin aktif iyonlarını azaltarak beslenme bozukluklarına neden olmaktadır (Grattan ve Grieve 1999).

2.4 Tuz Stresine Toleransın Moleküler Mekanizması

Birçok bahçe bitkisi glikofit olduğu için toprağın EC değeri 4 dS.m^{-1} 'nin üzerinde ($4 \text{ dS/m} \approx 40 \text{ mM NaCl}$) olduğu hallerde tuza çok duyarlıdır. Bu bitkilerin tuzdan etkilenme değerleri ve etkilenme seyirlerindeki farklılıklar bitkilerde tuza karşı çeşitli tolerans mekanizmalarının bulunduğunu göstermektedir. Tuzlu ortamlarda iyon toksisitesi, osmotik stres ve besin eksikliğinden ortaya çıkan metabolik dengesizlik oksitatif strese neden olmaktadır (Zhu 2002). Moleküler temellerin anlaşılması, tuz stresine toleranslılık ıslahında yeni seleksiyon yöntemlerinin geliştirilmesine yardımcı olmaktadır. Tuzluluk toleransına bağlı moleküler markörlerin belirlenmesi, bitki ıslahçılarında çeşit seleksiyonunda yeni olanaklar sağlamıştır (Sairam ve Tyagi 2004).

Hasegawa vd. (2000) tuz stresine toleranslılığın belirleyicileri, tuzlu koşullarda bitkilerin uyum reaksiyonları ve mekanizmalarına olanak sağlayan efektör molekülleri ve bu yolları kontrol eden regülatör molekülleridir. Regülatör moleküller hücre sel sinyal komponentleri ve uzak mesafelere tepki koordinasyonunun ileticileri (hormonlar, mediatörler, transkripsiyon faktörleri ve regülatör genleri), efektörler, iyon homeostazi (iyon taşınımını ile ilgili membran proteinleri), osmotik düzenleyici ve su rejimi regülasyonu (osmolitler) ve toksik radikal toplama işlemi (esas olarak enzimler) ile ilgili metabolitler ve proteinlerdir.

2.4.1 İyon homeostazisinin SOS (salt overly sensitive-tuza aşırı duyarlılık) sinyal yolu

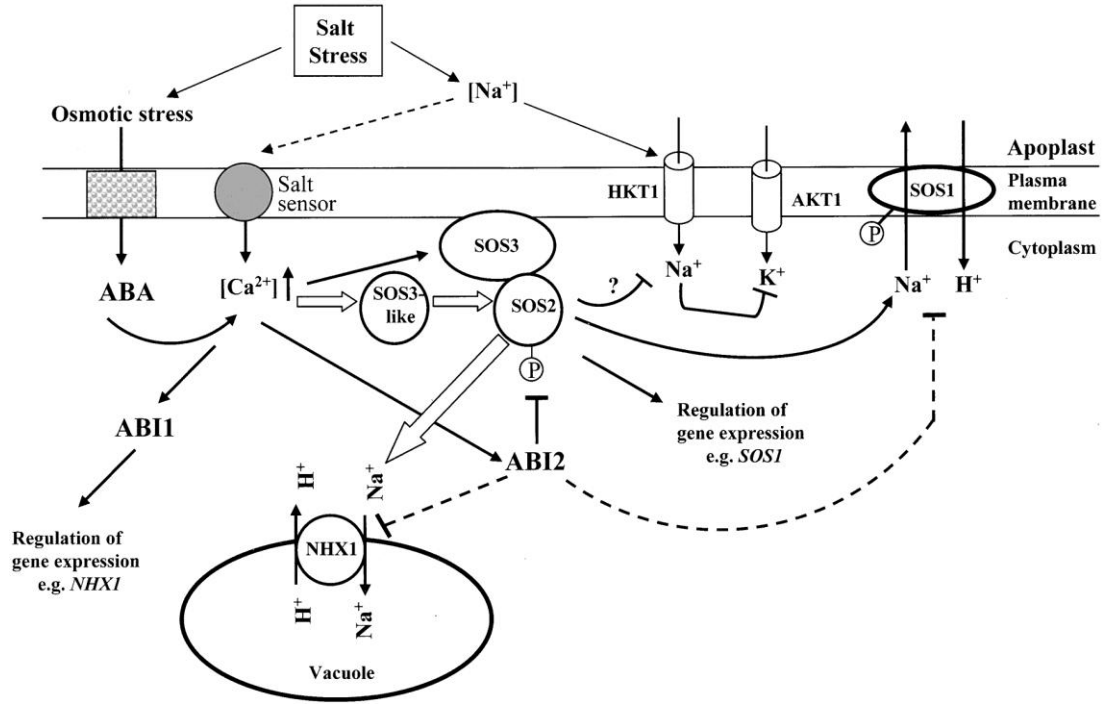
Sitozolun yüksek K^+/Na^+ oranı, bitkide normal hücre sel işlevler için gereklidir. Tuzlu koşullarda Na^+ , Na^+-K^+ taşıyıcıları ile alınan K^+ ile rekabete girmekte ve aynı zamanda kök hücrelerinin K^+ 'a özel taşıyıcıları da bloke olabilmektedir. Bu durum, enzimatik reaksiyonlar ve osmotik ayarlama için yetersiz K^+ konsantrasyonlarına ve sodyumun toksik seviyelere ulaşmasına neden olmaktadır (Zhu 2003).

Tuzluluk koşullarında hücrel iyon homeostazisi (dengesi), 1) plazma membranına bağılı Na^+/H^+ antiporterları (iki yönlü iyon taşıyıcı protein) yoluyla hücrelerden Na^+ 'un atılması veya Na^+ girişinin sınırlandırılması, 2) tonoplast (vakuol zarı) Na^+/H^+ antiporterları ile vakuol içerisine Na^+ 'un ayrılması yoluyla osmotik ayarlama için Na^+ 'un kullanımı ve 3) sodyum salgısı stratejileri ile başarılmaktadır. Böylece, iyon taşıma sistemlerinin regülasyonu, bitki tuz toleransının temelidir (Zhu 2002).

Arabidopsis'in tuza aşırı duyarlı (*sos*) mutantlarının genetik analizi, tuza tolerans ve hücrel iyon homeostazisini regüle eden SOS yolunun tanımlamasına öncülük etmiştir (Zhu 2002).

Zhu'a (2001) göre, bitki Na^+ toleransı için SOS yolu:

- a) Yüksek tuz stresi altında sitozolde serbest Ca^{2+} konsantrasyonunda artışın sağlanması,
- b) Protein kinaz SOS2'yi aktive etmek üzere SOS3'un, Ca^{2+} 'a bağlanması,
- c) Aktive olmuş SOS3-SOS2 kinaz kompleksinin, tuz stresi koşullarında *SOS1* ve muhtemelen başka taşıyıcı genlerin ekspresyonunu artırması,
- d) Bu gen ekspresyonu (aynı zamanda post-translasyon düzeyinde belirgindir) ve taşıyıcı aktivitesinin regülasyonunun iyon homeostazisini sağlanması ve böylece bitkilerde tuza toleransın artmasıdır (Şekil 2.1).



Şekil 2.1 Tuz stresi koşullarında *Arabidopsis*'te iyon homeostazisi için SOS sinyal yolu (Chinnusamy vd. 2005)

Tuz stresi sonucu ortaya çıkan Ca^{2+} sinyalleri, SOS3 tarafından algılanmakta ve protein kinaz SOS2'yi aktive etmektedir. Aktive edilmiş SOS2, bir plasma membranı Na^+/H^+ antiporterleri (iki yönlü iyon taşıyıcı protein) olan SOS1'e fosfor ilave etmekte ve daha sonra Na^+ 'u sitozol dışına taşımaktadır. SOS1'in transkript düzeyi SOS3-SOS2 kinaz kompleksi tarafından regüle edilmektedir. Ayrıca, SOS2 Na^+ 'u vakuol içerisine taşıyan tonoplast Na^+/H^+ antiporterlerini de aktive etmektedir. Na^+ transporterleri HKT1'den Na^+ 'un sitozole girişi SOS2 tarafından engellenmektedir. ABI2, SOS2 ile etkileşmekte ve SOS2 hedeflerinin aktiviteleri ve SOS2 kinaz aktivitesini engelleme yoluyla iyon hemeostazisini negatif yönde regüle etmekteyken ABI1, NHX1'in gen ekspresyonunu regüle etmektedir (Chinnusamy vd. 2005).

2.4.2 Tuza toleransın biyokimyasal belirleyicileri: enzimler, osmotik düzenleyiciler ve koruyucu faktörler

Tuzların enzim reaksiyonlarına etkisi çok yönlü ve komplekstir. Bu etki sitozolde pH değişimi ile ilgilidir. Enzim aktivitesi düşük iyon konsantrasyonlarında artış göstermektedir. Ancak, NaCl'ün 100 mM'den fazla olması durumunda bu aktivite

engellenmektedir. Örneğin, yonca ve mercimekte DNase ve RNase enzimlerinin aktivitesi 100 mM NaCl konsantrasyonunda engellenmektedir (Yupsains vd. 2001).

Halofitlerin enzimleri genel olarak glikofitlerinki kadar yüksek tuza duyarlıdır (Flower vd. 1977). Yüksek bitkilerin hücre duvarındaki enzimler, sitoplazmik enzimlere göre tuza daha tolerant olabilmektedir (Thiyagarajah vd. 1996).

Yüksek tuz konsantrasyonlarında protein sentezi ve enzimlerin duyarlılığına bakılmaksızın bitkilerin tuza toleransı, vakuoller içerisine tuzların hapsedilmesi ile önemli düzeyde ilişkilidir. Bu durum, sitoplazmada metabolik olayların normal olarak seyretmesini olası kılmaktadır. Tuz stresine karşı osmotik düzenleyicilerin birikimi, esas olarak sitozol ve vakuol arasındaki osmotik dengeyi ve osmotik ayarlamayı sağlayan bir metabolik adaptasyondur. Osmotik düzenleyiciler, basit şekerler (fruktoz ve glikoz), şeker alkolleri (gliserol ve metilleşmiş inositoller), kompleks şekerler (trehaloz, rafinoz ve fruktantlar), polioller, kuaterner amonyum bileşikler (prolin, glisin betain, a-alanin betain, prolin betain) ve tersiyer sülfonyum bileşikler gibi geniş bir değişim aralığındaki organik bileşikler kapsamaktadır (Rhodes ve Hanson 1993).

Osmotik düzenleyiciler, hidrofilik özelliğinden dolayı, proteinlerin, protein komplekslerin ya da membranların yüzeyinde suyun yerini almakta ve böylece düşük moleküler ağırlıklı şaperonlar gibi enzimatik olmayan ve osmoprotektantlar gibi rol oynamaktadır (Hasegawa vd. 2000).

Glisin betain (N,N,N-trimethylglycine-betaine): Tüm canlılarda bulunan protein stabilize eden bir osmolittir (Rhodes ve Hanson 1993). Glisin betain, suda eriyebilen ve pH'nın geniş bir değişim aralığında elektriksel olarak nötral olan ve böylece makromoleküllerin hidrofilik ve hidrofobik bölgelerinin her ikisi ile etkileşebilen amfoterik bir bileşiktir (Sakamoto ve Murata 2002).

Glisin betaininin, makromolekülleri stabilize ederek ve bitki hücresi ve çevresi arasında su dengesini sağlayarak bitkiyi koruduğu düşünülmektedir (Bartels ve Sunker 2005). Bu organik bileşik birçok halofit türde, örneğin *Suaeda maritima*, *Atriplex nummularia*,

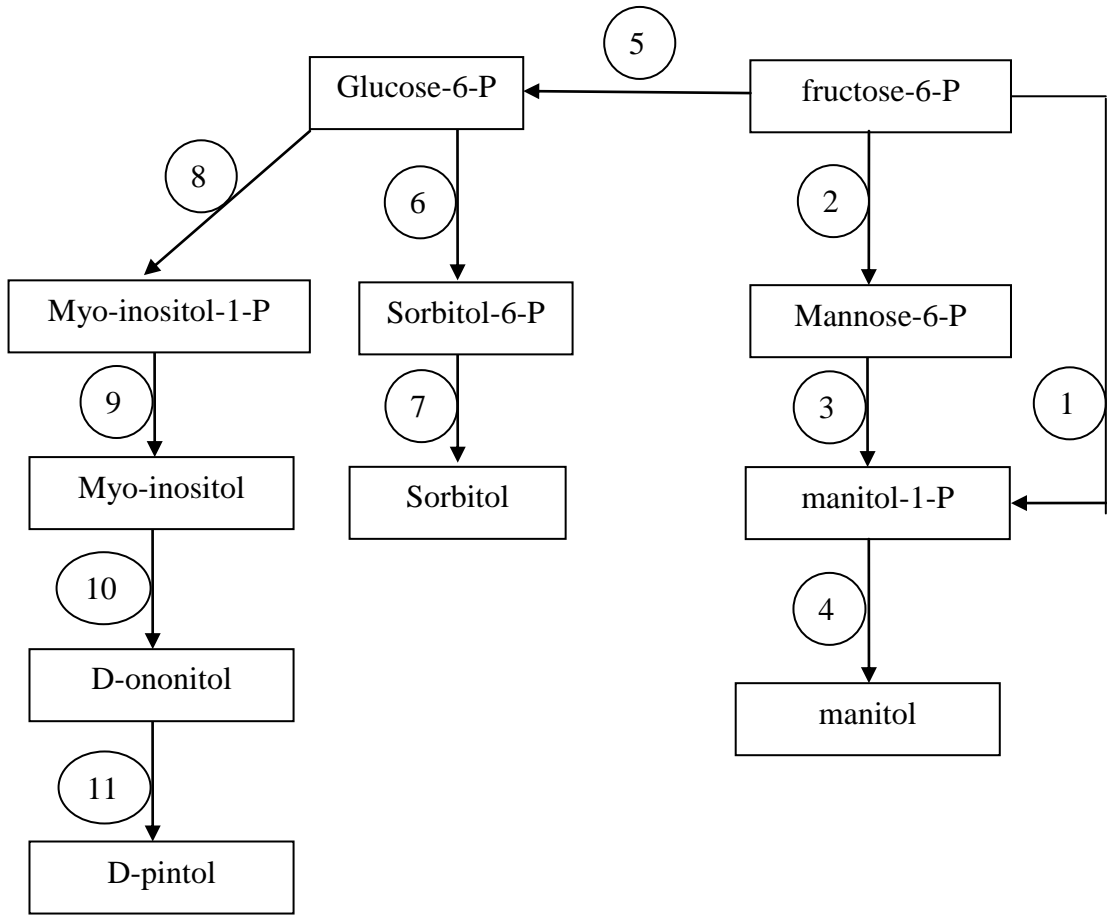
Spergularia marina, *Salicornia europea*, *Salsola sola*'de vakuol ve sitoplazma arasında osmotik dengeyi sağlamak üzere sitoplazmada birikmektedir (Flowers vd. 1977). Halofitlerde glisin betain birikimi, tuz stresi sonucunda gerçekleşmekte ve tuzluluğun artması ile birlikte miktarı yükselmektedir.

Yüksek bitkiler glisin betaini kolinin iki aşamalı oksidasyonu yoluyla sentezlemektedir: Kolin \longrightarrow betain aldehit (toksik) \longrightarrow glisin betain. İlk reaksiyon, bir ferredoksin bağlı kolin monooksijenaz (CMO) tarafından ve ikinci aşama bir NAD⁺ bağlı betain aldehit dehidrogenaz (BADH) tarafından katalize etmektedir (Yeo 1998, Sairam ve Tyagi 2004, Bartels ve Sunker 2005, Mahajan ve Tuteja 2005).

Prolin: Sadece bitkilerde değil, diğer organizmalarda da bulunan muhtemelen en yaygın osmolittir (Bartels ve Ramanjulu 2005). Bakterilerden yüksek bitkilere kadar hücre prolin düzeyi ile kuraklık ve tuz stresi arasında güçlü ilişkiler bulunmaktadır (Sairam ve Tyagi 2004). Prolin, osmotik stres koşullarında osmotik ayarlama görevinin yanında, plazma membranlarının korunması, enerji kaynağı, karbon ve nitrojen kaynağı ve hidroksil radikal toplayıcı olarak da görev yapmaktadır (Bartels ve Sunker 2005).

Bitkilerde prolin, ornitin ve glutamat yoluyla sentezlenmektedir (Sairam ve Tyagi 2004). Glutamat yolu ile prolinin sentezi, özellikle stres koşullarında baskın olandır. L-prolin, P5C (Δ^1 -pyrroline-5 carboxylate) yoluyla L-glutamik asitten sentezlenmektedir. Bu reaksiyonlar iki enzimle, P5C synthetase (P5CS) ve P5C reductase (P5CR) ile katalize edilmektedir (Lauchli ve Luttge 2004, Bartels ve Sunker 2005).

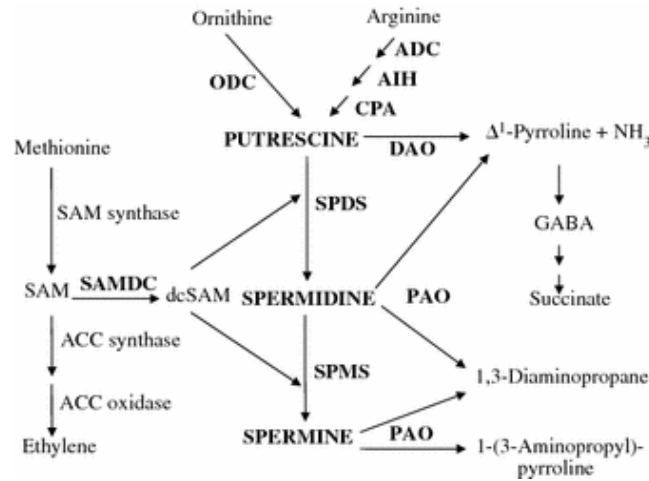
Polioller: Bazı halofit bitkilerde polioller (gliserol, manitol, sorbitol ve sakaroz gibi) osmoprotektantlardır. Osmotik düzenleyiciler olarak azotlu maddelerin (prolin veya glisin betain gibi) sentezi sınırlı olduğunda polihidrik alkoller (polioller) bu kapsamda önemli maddelerdir. Asiklik polioller, sorbitol ve manitol ve siklik polioller, myo-inositol, D-ononitol ve D-pinitolün sentez yolları şekil 2.2'de sunulmuştur. Sorbitol ve manitol direkt glikoz-6-fosfat ve fruktoz-6-fosfatdan sentezlenmektedir ve bu yüzden sorbitol üretimi myo-inositol ve ardından D-ononitol ve D-pinitol sentezi ile rekabet etmektedir (Lauchli ve Luttge 2004).



Şekil 2.2 Asilic polioller, sorbitol ve manitol, siklik polioller, myo-inositol, D-ononitol ve D-pintolün sentez yolları (Lauchli ve Luttge 2004)

1. Manitol-1-phosphate dehydrojenase
2. Mannose-6-phosphate isomerase
3. Mannose-6-phosphate reductase
4. Manitol-1-phosphate phosphatase
5. Hexose-phosphate isomerase
6. Sorbitol-6-phosphate dehydrojenase (aldose-6-phosphate reductase (NADPH))
7. Sorbitol-6-phosphate phosphatase
8. Glucose-6-phosphate cycloaldolase (myo-inositol-1-phosphate synthase)
9. Myo-inositol-1-phosphate phosphatase (inositol monophosphatase)
10. Myo-inositol-O-methyltransferase
11. Ononitol epimerase

Poliaminler: Putresin, spermidin ve spermin gibi poliaminler, hafif moleküler ağırlıklı organik katyonlardır ve bakterilerden, bitki ve hayvanlara kadar bir çok organizmada bulunmaktadır (Alcazar vd. 2006, Groppa ve Benavides 2008). Bir kaç stres faktörü, örneğin potasyum eksikliği, osmotik stres, düşük pH, besin eksikliği veya ışık, bitkilerde poliaminlerin birikimini uyarmaktadır (Sairam ve Tyagi 2004). Bitkilerde poliamin biyosentezinin ilk aşaması, ornitine veya argininin dekarboksilasyonudur ve bu ornitin dekarboksilaz (ODC) veya arginin dekarboksilaz (ADC) tarafından katalize edilmektedir. Putresin sentezi ile sonuçlanan ADC yolu, üç enzimatik aşamayı içermektedir. Bunlar; ADC, agmatine iminohidrolaze (AIH) ve N-carbamoyl putresin amidohidrolazdır (CPA). Spermidin ve spermin, ilk olarak putresin ve daha sonra spermin aminopropil gruplarının, spermidin synthase ve spermin synthase enzimleri yardımıyla eklenmesi ile oluşturulmaktadır. Aminopropil grupları, SAM-decarboxylase enzimi vasıtasıyla S-adenosylmethionine'den (SAM) meydana getirilmektedir. SAM aynı zamanda bir etilen öncül maddesidir. Etilen, ACC synthase ve ACC oxidase enzimleri yardımıyla 1-amino-cyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) yoluyla SAM'dan üretilmektedir (Şekil 2.3) (Alcazar vd. 2006).



Şekil 2.3 Bitkilerde poliaminlerin biyosentezi (Alcazar vd. 2006)

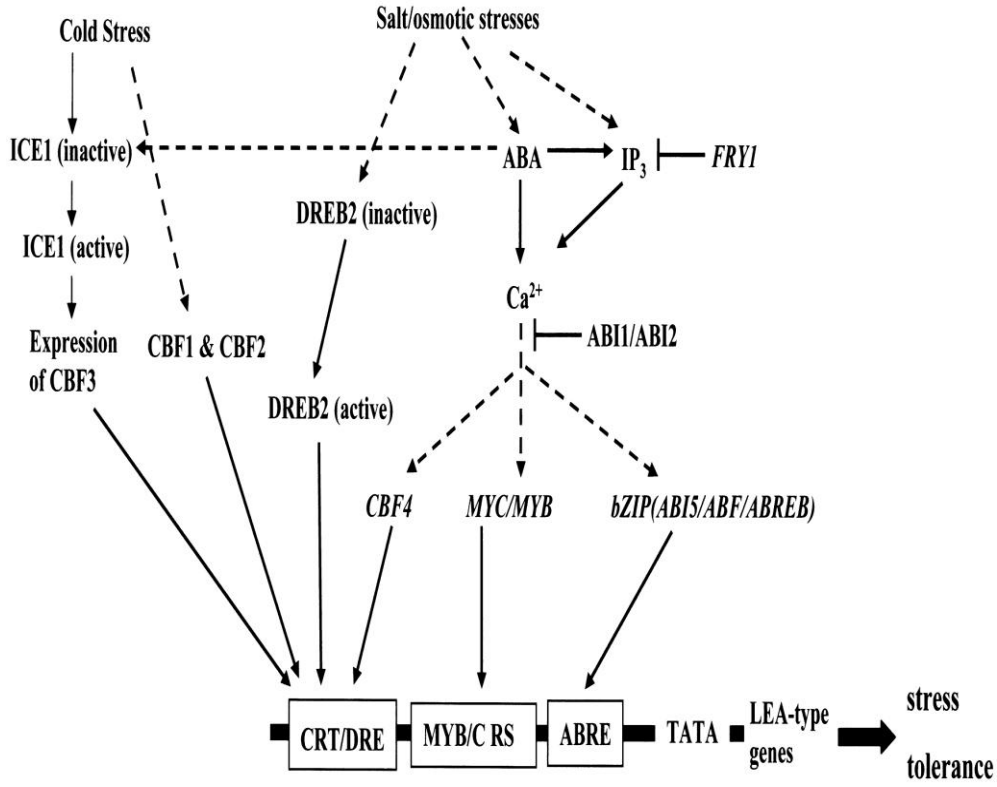
ACC: 1-amino-cyclopropane-1-carboxylic-acid, ADC: arginine decarboxylase, AIH: agmatine iminohidrolaze, CPA: N-carbamoylputrescine amidohidrolaze, DAO: daimine oxidase, dcSAM: decarboxylated S-adenosylmethionine, GABA: γ -aminobutyric acid, ODC: ornithine decarboxylase, PAO: polyamine oxidase, SAM: S-adenosylmethionine, SAMDC: S-adenosylmethionine decarboxylase, SPDS: spermidine synthase, SPMS: spermine synthase

Geç Embriyogenez Proteinleri (LEA) ve Dehidrinler: Halofit ve glikofit bitkilerin sitoplazmaları tuzların osmotik ve iyonik etkilerine duyarlıdır. Tuzların hücre metabolizmasında olumsuz etkileri osmotik düzenleyicilerin ve koruyucu makromoleküllerin (özellikle LEA proteinleri ve şaperonlar) sentez ve birikimi ile azalmaktadır. Geç embriyogenez proteinleri tuzluluk, kuraklık ya da soğğun neden olduğu osmotik strese karşı tüm bitki türlerinin vegetatif dokularında birikmektedir. LEA proteinlerinin büyük bir kısmı oldukça hidrofilitir ve belli amino asitler bakımından (örneğin alanin, glisin, glutamik asit ve treonin) zengin ve belli amino asitler bakımından (örneğin triptofan ve sistein) ise yoksuldurlar (Kalefetoğlu ve Ekmekçi 2005). LEA'lar aynı şaperonlar gibi yüksek tuz konsantrasyonları ve su kaybı durumlarında protein yapılarını stabilize etmektedirler. Bu koruyucu proteinler sadece osmotik şoktan sonra ortaya çıkmaktadırlar (Munns 2005). LEA proteinleri, RD (su kaybına cevap), ERD (su kaybına erken cevap), KIN (soğuk ile indüklenen), COR (soğuk ile regüle olan) ve RAB (ABA'ya yanıt) genleri tarafından farklı bitki türlerinde kodlanmaktadır (Chinnusamy vd. 2005). Osmotik stres koşullarında LEA tip genlerin ekspresyonu ABA-bağımlı ve ABA-bağımsız sinyal iletim yolları tarafından düzenlenmektedir (Şekil 2.4).

Dehidrinler, siyanobakterilerden yüksek bitkilere kadar tüm fotosentetik organizmalarda yüksek miktarda bulunmaktadır (Yakubov vd. 2005). Dehidrinler, LEA D-11 veya LEA II proteinler olarak bilinen, hücrelerin su kaybına neden olan çeşitli çevresel faktörler ile ifadesi indüklenen proteinlerdir. Bu faktörler arasında, soğuk, don, sıcaklık, kuraklık, tuzluluk ve aşırı buharlaşma en önemlileridir (Porcel vd. 2005, Savitri vd. 2013).

2.5 Stres Koşullarında Bitkilerde Dehidrin Geninin İfadesi

Artlip vd. (1997), yaprağını döken ve herdem yeşil şeftali genotiplerinde 472 amino asidi kodlayan *ppdhn1* dehidrin genini belirlemişlerdir. Bu genotipler soğğa alışma, mevsimsel dehidrin gen ifadesi ve protein içeriği bakımından farklılıklar göstermiştir. Her iki genotipde de en yüksek transkript birikimi kış mevsiminde belirlenmiştir. Mayıs-Temmuz aylarında ise birikim ölçülemeyecek düzeyde olmuştur. Herdem yeşil genotipte (soğğa toleransı daha düşük) transkript birikimi yaprağını döken genotipten geride kalmış ve daha erken azalmıştır. Protein ifadesi de transkript ifadesi ile benzer



Şekil 2.4 Tuz stresi koşullarında *Arabidopsis*'te iyon homeostasisi için SOS sinyal yolu (Chinnusamy vd. 2005)

Tuz stresi sonucu ortaya çıkan Ca^{2+} sinyalleri, SOS3 tarafından algılanmakta ve protein kinaz SOS2'yi aktive etmektedir. Aktive edilmiş SOS2, bir plasma membranı Na^+/H^+ antiporterleri (iki yönlü iyon taşıyıcı protein) olan SOS1'e fosfor ilave etmekte ve daha sonra Na^+ 'yu sitozol dışına taşımaktadır. SOS1'in transkript düzeyi SOS3-SOS2 kinaz kompleksi tarafından regüle edilmektedir. Ayrıca, SOS2 Na^+ 'u vakuol içerisine taşıyan tonoplast Na^+/H^+ antiporterlerini de aktive etmektedir. Na^+ transporterleri HKT1'den Na^+ 'un sitozole girişi SOS2 tarafından engellenmektedir. ABI2, SOS2 ile etkileşmekte ve SOS2 hedeflerinin aktiviteleri ve SOS2 kinaz aktivitesini engelleme yoluyla iyon hemeostasisini negatif yönde regüle etmekteyken ABI1, NHX1'in gen ekspresyonunu regüle etmektedir.

olmuştur. Bununla birlikte sonbaharda herdem yeşil genotipte protein ifadesi transkript birikiminin bir hayli gerisinde kalmıştır. Bu sonuç, soğuğa alışma sürecinde dehidrin proteinlerinin birkaç seviyede düzenlenebileceğine işaret etmektedir.

Olumsuz çevre koşullarında indüklenen genlerin belirlenmesi bitkilerin strese karşı toleranslarının moleküler mekanizmalarının anlaşılması için genel bir yaklaşımdır. Dehidrinlerle ilgili araştırmalar çoğunlukla otsu türlere yönelik olmuştur, ancak odunsu türlerde yapılan çalışmalar oldukça azdır (Yakubov vd. 2005).

Bhatarai ve Fettig (2005) yabancı nohutlardan (*Cicer pinnatifidum*) izole ettikleri dehidrin geninin ifadesini tohumların olgunlaşması, kuraklık ve soğuk streslerinde araştırmışlardır. Yabancı nohut tohumlarında olgunlaşma sırasında taze ağırlığın su içereği %79'dan %58'e azalırken, *cpdhn 1* transkriptinin birikimi görülmüştür. Ayrıca kuraklık stresinde *cpdhn1* ifadesi, sulama 16 gün durdurularak izlenmiş ve kontrol örneklerinde çok az *cpdhn1* transkripti gözlenmiştir. Kuraklık stresinden 4 gün sonra transkriptlerin açığa çıktığı ve stres süresince arttığı rapor edilmiştir. Yabancı nohut bitkileri 4°C soğukta tutulup *cpdhn1* ekspresyonu 72 saat süreyle izlendiğinde, soğukta tutulmayan kontrol bitkilerinde hiç sinyal olmazken, 6 saat soğukta tutulan örneklerde büyük miktarda *cpdhn1* transkripti meydana gelmiş ancak, sinyal hızlıca azalmış ve yaklaşık 24 saat sonra yok olmuştur. *Cpdhn1* transkript miktarının ikinci yükselişi 48 saatte görülmüştür. Tuzluk stresi ise 200 mM NaCl solusyonu ile bitkilerin sulamasıyla uygulanmıştır. *Cpdhn1* transkript birikimi tuz uygulamasından 12 saat sonra başlamış ve 72 saatlik periyotta miktarı artmıştır. Ayrıca bu çalışmada ABA (absizik asit) ve MeJa (metil jasmonat) uygulamalarının *cpdhn1* ekspresyonu üzerine etkileri de araştırılmıştır. *Cpdhn1* transkriptleri, hormon uygulamasından 6 saat sonra görülmeye başlanmıştır. ABA uygulamasından 12, 24 ve 48 saat sonra toplanan örneklerde transkript miktarı artmış, daha sonra azalmıştır. MeJa uygulamasından 6 saat sonra başlayan transkript, 12, 24 ve 48 saat sonra çok düşük miktarlarda azalmıştır ancak, 72 saat sonra *cpdhn1* transkriptinde küçük bir artış meydana gelmiştir.

Wisniewski vd. (2006), şeftalilerde kuraklık, kısa gün koşulları (SD) ve don etkisi olmayan düşük sıcaklık (LT) streslerinde *ppdhn2* dehidrin genini, daha önce Artlip ve

Wisniewski (1997) tarafından yine şeftalilerde belirlenmiş olan *ppdhn1* geni ile birlikte incelemişlerdir. *Ppdhn2* geni kuraklıkta indüklenirken kısa gün ve düşük sıcaklık streslerinde indüklenmemiştir. Buna karşılık, *ppdhn1* geni kuraklık ve düşük sıcaklıkta indüklenirken, kısa gün koşullarında indüklenmemiştir. Bassett vd. (2009) şeftalide düşük sıcaklıkta indüklenen üçüncü dehidrin genini (*ppdhn3*), sürgünlerin kabuk dokusunda belirlemiştir.

Saaverdra vd. (2006), *Physcomitrella patens*'den (yosun) dehidrin *ppdhnA* genini, dejenere primer kullanarak izole etmişlerdir. Çalışmada ABA, NaCl ve manitol uygulamalarından sonra *ppdhnA* geninin ifadesi artış göstermiştir.

Daha önce ABA ve tuz uygulamaları yoluyla buğdayda *dhn-5* proteininin uyarıldığının gösterildiğini ifade eden Brini vd. (2007), bitkiler aleminin strese toleransında bu genin katkısını araştırmak için buğday *dhn-5* proteininin transgenik *Arabidopsis* bitkilerinde ifadesini sağlamışlardır. *Dhn-5* genini taşıyan transgenik *Arabidopsis* bitkileri yüksek tuz konsantrasyonlarında kuvvetli bir büyüme sergilemiştir. Tuz stresi altında yabancı bitkilerin yaprak alanı ve tohum çimlenme oranı değerleri transgenik olanların gerisinde kalmıştır. Bulgular, *dhn-5* geninin prolin birikimini sağlayarak osmotik dengeleme yoluyla tuz ve kuraklık streslerine karşı toleransı geliştirdiği ileri sürülmüştür.

Absizik asit (ABA) içeriğinin artışı birçok dehidrin geninin ifadesini indüklenmektedir (Kosova vd. 2007). Dehidrin gen transkripti, ağır metaller ile de indüklenmektedir ve bazı dehidrinler metallere bağlanma yeteneğine sahip olmaktadır. Ancak, dehidrinler ile ağır metal stresi arasındaki ilişkiler henüz bilinmemektedir (Xu vd. 2008a).

Bitkilerin ağır metal stresine toleransında dehidrinlerin önemini belirlemek için Xu vd. (2008a) *Brassica juncea* (Hint hardalı) bitkisinde iki dehidrin genini (*bjdhn2/bjdhn3*) klonlamışlardır. *Bjdhn2/bjdhn3* yaprak, sap ve köklerde düşük bir seviyede ifade edilmektedir ve ağır metallerle ifadesi artmaktadır. Ağır metallere maruz kalan *B. juncea* bitkilerinde *Bjdhn3* geninin susturulması, kontrol bitkilere göre yüksek elektrik iletkenlik ve malondialdehid üretimine neden olurken toplam metaller birikimini düşülmektedir.

Xu vd. (2008b) *B. juncea* bitkilerinden klonladıkları *bjdhn2/bjdhn3* genlerini mayalara aktarmışlar ve transgenik mayaların tuzluluk ve don streslerine karşı daha toleranslı olduklarını göstermişlerdir. *Bjdhn2* ve *bjdhn3* gen ifadeleri, düşük sıcaklık, kuraklık, tuz stresi ve ABA uygulaması sonucunda artmıştır. Transgenik tütün bitkilerinde *bjdhn2* ve *bjdhn3* genleri düşük sıcaklık ve kuraklık stresinde toleransı yükseltmiştir. Bu sonuçlar, *bjdhn2* ve *bjdhn3* genlerinin membranlarda koruyucu olarak abiyotik streslerde rol aldığını göstermiştir.

Wisniewskia vd. (2008), Royal Gala elma çeşidinde soğuk (24 saat süreyle 5°C) ve kuraklık (2 hafta su noksanlığı) stresi koşullarında iki dehidrin genini (*mddhn1* ve *mddhn3*) belirlemişlerdir. *Mddhn3* geninin ifadesi soğuk stresinde yaprak ve kabukta, su noksanlığı stresinde kök, kabuk ve yaprakta, *mddh1* geninin ifadesi soğuk stresinde yaprak, kabuk ve ksilemde olmuştur.

Garcia-Banuelos vd. (2009) elma ağaçlarında kış dinlenmesi ve soğuğa alışma prosesleri ile ilişkili proteinleri daha iyi anlamak üzere bu proteinlerden önemli birini kodlayan bir dehidrin geni olan *mddhn* genini araştırmışlardır. *Mddhn* geninin ifadesi kış ortası ve erken ilkbaharda sürgün kabuklarında ve tomurcuklarda farklı olmuştur. Kış mevsiminde (dormant dönem) bitkilerin dona karşı toleranslı oldukları zaman soğuk stresi süresince transkriptler birikirken ilkbaharda soğuğa toleranslığın kaybolmasıyla biriktirmemektedir. Araştırmacılar bu ifade modelinin, *mddhn* geninin elmada dona toleranslığın gelişimini izlemek için bir moleküler markör olabileceğini gösterdiğini, ayrıca, elmada tomurcuk ve sürgünler gibi dokularda kışın dehidrin gen ailesinin en az bir üyesinin ifade edildiğini belirtmişlerdir. Dehidrin genleri dona toleranslığın gelişmesi süresince odunsu bitkilerin tomurcuk ve gövdelerinde benzer mevsimsel ifadeler göstermektedir. En yüksek ifade kış ortasında olurken, ilkbaharda tespit edilemez seviyelere düşmektedir (Puhakainen vd. 2004). Tomurcuk ve sürgünlerde *mddhn* geninin ifade şekli diğer yaprağını döken meyve türlerindeki bulgular ile de uyumludur (Artlip vd. 1997, Levi vd. 1999).

Dehidrin genleri bitkilerin kuraklık, tuzluluk ve soğuk gibi abiyotik stres unsurlarına karşı korunmasında önemli rolleri vardır. Liang vd. (2009) elmada 12 dehidrin genini

(*mddhns*) ve bunların farklı kromozomlardaki yerlerini belirlemişlerdir. Bu genlerden 9'unu klonlayıp ifade profillerini araştırmışlardır. Elmada dehidrin gen ailesine ait olan bu 9 dehidrin geni, benzer sayılarda *Arabidopsis* (10 tane), arpa (13 tane) ve prinçte (8 gen) de bulunmuştur. Ayrıca, normal büyüme şartları altında *mddhns* ifadeleri çiçek, tohum, yaprak, meyve ve kök dokularında araştırılmıştır. *Mddhn2*, *mddhn4*, *mddhn5*, *mddhn6* ve *mddhn9* nispeten yüksek ve benzer ifade seviyelerinde tüm dokularda bulunmuştur. *Mddhn1* ve *mddhn8* tüm dokularda köklerden daha yüksek ifade yoğunluğu göstermiştir. *Mddhn7* ve *mddhn3* sadece yaprak, meyve ve köklerde nispeten düşük seviyelerde ifade edilmiştir. Dokuz *mddhn* geninde transkripsiyon kuraklık stres koşullarında zamanla yukarı seviyelere yönelmiş ve ifadeleri su eksikliğinin 6. gününde en yüksek olmuştur. Bu genlerden *mddhn1*, *mddhn2*, *mddhn4*, *mddhn5*, *mddhn6*'nin ifadeleri diğerlerine göre 100 kat daha fazla artmıştır. Genç bitkiler 4 °C'ye maruz bırakıldığında, yapraklardaki *mddhn2*, *mddhn4* ve *mddhn6* transkriptleri 24 saat soğuk stresinden sonra 200-1200 kat artmıştır. Soğuk stresi altında *mddhn8* geninin transkript birikimi 18 kat artarken, *mddhn1*, *mddhn3*, *mddhn5*, *mddhn7* ve *mddhn9* genlerinin transkript seviyeleri nisbeten sabit kalmıştır.

Kumari vd. (2009), tuza toleransı birbirine benzemeyen 2 dut genotipinde (S1 ve ATP) (*Morus alba* L.) 4 tuz konsantrasyonunda (%0.0, 1.0, 1.5 ve 2.0) LEA proteinlerinin (grup 1, 2, 3 ve 4) ifadesini, protein modelini, hücre zarı dayanıklılığı ve nisbi su kapsamını araştırmışlardır. NaCl konsantrasyonunun artması ile birlikte nisbi su kapsamı ve hücre zarı dayanıklılığı ATP genotipinde S1 genotipine göre daha fazla azalmıştır. NaCl uygulamalarından sonra dut yapraklarının protein profili, 35, 41, 45 ve 70 kDa proteinleri bakımından önemli bir artış, 14.3, 18, 23, 28, 30, 42, 47 ve 65 kDa proteinleri bakımından önemli bir azalış göstermiştir. S1 genotipinde NaCl'e maruz kalan bitkilerde LEA proteinlerinin birikimi ATP genotipinden daha yüksek olmuştur. Tuza toleranslıkla ilişkili olarak en yüksek LEA (grup 3 ve 4) kapsamı %2.0 NaCl uygulamasında S1 genotipinde belirlenmiştir.

Yang vd. (2012), *Vitis vinifera* ve *V. yeshanensis* türlerinde 4 *dhn* geni belirlemişlerdir. Normal büyüme koşulları altında *dhn1* geni ifade edilmemiştir ancak, kuraklık, soğuk, sıcak, embriyogenesiz, ABA, salisilik asit (SA) ve MeJa uygulamaları ile bu gen

indüklenmiştir. *Dhn1* geni kuraklık koşulları altında *V. yeshanensis*'de, *V. vinifera*'dan daha erken ifade edilmiştir. *Dhn1*'e benzer şekilde *dhn2* geni de soğuk, sıcak, embriyogenesiz ve ABA tarafından uyarılırken, kuraklık, *Erysiphe necator* (külleme) enfeksiyonu, SA ve MeJa uygulamasına yanıt vermemiştir. *Dhn2* normal büyüme koşulları altında vejetatif dokularda da ifade edilirken *dhn3* sadece tohum gelişimi sırasında çok düşük seviyelerde ifade edilmiştir. *Dhn4* geç embriyogenesiz sırasında spesifik olarak ifade edilmiştir. *dhn3* ve *dhn4* soğuk, sıcak, kuraklık, SA ve MeJa uygulamalarına yanıt vermemişlerdir.

Mayor vd. (2012), osmotik stres (NaCl ve manitol) ve ABA uygulaması ile indüklenen *tas14* dehidrin geninin domates bitkisinde kuraklık ve tuzluluk toleransında önemini araştırmışlardır. *Tas14* dehidrin geni normal koşullarda büyümeyi etkilemeden bitkinin uzun süreli kuraklık ve tuzluluk toleransını geliştirmiştir. Kuraklık koşullarında *tas14* geninin ifadesi ile çözünebilir maddelerin birikimi ve osmotik potansiyelin azaltması, bitkinin osmotik strese toleransını sağlamaktadır. Ayrıca, *tas14* geni genç yapraklarda K^+ ve şekerlerin birikimine neden olurken, yaşlı yapraklarda Na^+ birikimini artırmaktadır. *Tas14* geni uzun süreli stres koşulları altında genç ve yaşlı yapraklarda Na^+ birikimini sağlamaktadır.

2.6 Meyve Türlerinde Tuz Stresine Tepkinin *in Vitro* Koşullarda Belirlenmesi

Shibli vd. (2000), *in vitro* koşullarda farklı tuz konsantrasyonlarında (0, 50 ve 100 mM NaCl) bazı elma (*Malus domestica* Borkh) çeşit ve anaçlarının (Galla, MM 111, MM 106, M 26 ve M6 York) gelişimi ve sürgünlerde mikro element miktarlarını araştırmışlardır. Çalışmada M 26 ve M6 York dışındaki tüm genotiplerde tuz seviyesinin yükselmesi ile birlikte mikro sürgünlerin kuru ağırlığında artış meydana gelmiştir. Kontrol uygulaması ile karşılaştırıldığında M 26 genotipinde 50 ve 100 mM NaCl dozlarında sürgün proliferasyonu önemli düzeyde azalırken, Galla genotipinde 100 mM NaCl dozunda azalma meydana gelmiştir. MM 111 dışındaki tüm genotiplerde tuz seviyesinin artışı ile birlikte sürgünlerde çinko miktarı önemli düzeyde azalmıştır. M6 York ve MM 111 genotiplerinde 50 mM NaCl dozunda bakır miktarı azalmış, 100 mM NaCl'de artmıştır. NaCl konsantrasyonunun artışı ile birlikte Galla ve M 26

genotiplerinde bakır miktarı önemli düzeyde azalmıştır. Galla, MM 106 ve M26'da 50 mM NaCl'de mangan miktarı artış göstermiş, ancak 100 mM tuzluluk seviyesinde azalmıştır. MM111 ve M6 York'da demir miktarı 50 mM NaCl'de önemli düzeyde azalmış, 100 mM NaCl düzeyinde ise bir artış ortaya çıkmıştır. Tuzluluk seviyesinin yükselmesi ile birlikte Galla ve M26 genotiplerinde demir miktarı azalırken, MM 106'da artış meydana gelmiştir.

Gonzalez-Rosas vd. (2003), Mexican ve West Indian avokado genotiplerinin olgun embriyolarının *in vitro* koşullarda çimlenmesi ve fidelerin canlılığı üzerine MS (Murashige ve Skoog) besin ortamına %0.1'den %1.0'a kadar %0.1 artış ile 10 farklı konsantrasyonda 1:1 oranında NaCl+CaCl₂.2H₂O karışımının etkisini araştırmışlardır. West Indian genotipinde çimlenme ve canlılık oranları (sırasıyla %24 ve %11), Mexican genotipine (sırasıyla %21 ve %6) göre daha yüksek bulunmuştur. Genel olarak tuz konsantrasyonunun artışı ile birlikte turgor potansiyel artarken osmotik potansiyel gibi su potansiyeli de azalmıştır.

Vijayan vd. (2003), 63 dut genotipinin (*Morus* spp.) tuza toleransını *in vitro* koşullarda test etmişlerdir. Sürgün gelişmesini izlemek üzere aksillar tomurcuklar %0.0, 0.25, 0.5, 0.75 ve 1.0 NaCl ilave edilmiş MS besin ortamında kültüre alınmıştır. Ayrıca 4 farklı NaCl konsantrasyonunda (%0.0, 0.1, 0.2 ve 0.3) köklenme durumu da belirlenmiştir. NaCl, *in vitro* koşullarda dut genotiplerinde sürgün gelişimi ve köklenmesini engellemiştir. Aksillar tomurcukların yaşama oranı kontrolde %83.7 olurken %1.0 NaCl uygulamasında %6.1 olarak kaydedilmiştir. Ortalama kök sayısı kontrolde 11.9, %0.3 NaCl uygulamasında 0.2'dir. Test edilen 63 genotipten sadece 7'si %0.3 NaCl uygulamasında kök geliştirebilmiştir. Ayrıca kök gelişimi de kontrolden (1.8 cm), %0.3 NaCl uygulamasına (0.1 cm) doğru belirgin şekilde azalmıştır. Dut genotipleri arasından *in vitro* çalışmalarda belirlenmiş olan 5 tolerant ve 2 duyarlı genotip ayrıca *ex vitro* koşullarda teste tabi tutulmuştur. Araştırmacılara göre sonuçların birbiri ile benzer bulunması *in vitro* testlerin, sınırlı bir alanda ve zamanda genotiplerin değerlendirilmesinde başarıyla uygulanabileceğini göstermiştir.

Sotiropoulos ve Dimassi (2004), kivide sürgün proliferasyonu ve kimyasal kompozisyonu üzerine NaCl ve borun etkilerini *in vitro* koşullarda araştırmışlardır.

Sürgün kültürleri 2 bor konsantrasyonu (0.1 ve 2 mM) ile kombine edilmiş 5 NaCl konsantrasyonunu (0, 10, 20, 40 ve 80 mM) içeren MS besin ortamı üzerinde 12 hafta süreyle inkübe edilmiştir. En uzun sürgünler, NaCl konsantrasyonu 0-20 mM aralığında olduğunda 2 mM bor uygulaması ile elde edilmiştir. Tüm NaCl dozlarında 2 mM B uygulaması ile sürgün sayısı artış göstermiş ise de bu B konsantrasyonunun 10-20 mM NaCl ile oluşturduğu kombinasyonda daha fazla sürgün üretimi sağlanmıştır. Eksplantlar 40 mM NaCl uygulamasında orta düzeyde klorotik görünüm sergilemişler, 80 mM uygulamasında ise ölmüşlerdir. NaCl konsantrasyonunun 10 mM'den 80 mM'a çıkmasıyla birlikte her iki B konsantrasyonunda eksplantların Na ve Cl düzeyleri artmış, K ve Ca düzeyleri azalmıştır. NaCl seviyesinin 80 mM seviyesine ulaşması ile birlikte tüm B düzeylerinde eksplantların fosfor miktarı en yüksek seviyesine ulaşmıştır.

Shiyab vd. (2003), *in vitro* koşullarda turunçlarda gelişme ve besin maddesi bileşimi üzerine NaCl'ün etkilerini araştırmışlardır. Mikro sürgünler, 8.9 µM benzil adenin ve 0.5 µM naftalen asetik asit içeren MS besin ortamına transfer edilmiştir. Tuzluluk için besin ortamına NaCl 0.0 (kontrol), 50, 100, 150, 200 ve 300 mM dozlarında ilave edilmiştir. Mikro sürgünlerde gelişme (sürgün uzunluğu, sayısı, yaprak sayısı ve kuru ağırlık) 0.0 mM NaCl uygulamasından 150 mM uygulamasına doğru hafif olarak azalmıştır. Bununla birlikte 200 ve 300 mM NaCl uygulamalarında gelişme parametreleri çok fazla etkilenmiş ve mikro sürgünler ölmüştür.

Dziadczyk vd. (2003), tuz stresine tolerant çilek (*Fragaria x ananassa* Duch.) klonlarını *in vitro* koşullarda belirlemişlerdir. Pau/27 klonu, Paula çilek çeşidinden serbest tozlanma sonucunda elde edilen populasyondan 200 mM NaCl içeren ortam üzerinde selekte edilmiştir. Daha sonra kendilenen Pau/27 bitkilerinden elde edilen 18 tuza tolerant klon aynı ortam üzerinde belirlenmiştir. Selekte edilen klonlar ile Paula ve Senga Sengana çeşitlerinin vejetatif gelişmesi üzerine orta düzeyde tuz stresinin (75 mM NaCl) etkisi incelenmiştir. Tuza toleranslık bakımından genotiplerin 4 gruba ayrıldığı çalışmada Paula çeşidi, Pau/27 ve 3 adet 2. generasyon klonu (Pau/27/11, Pau/27/24 ve Pau/27/30) hassas genotipler grubunda yer almıştır. İkinci grupta yer alan genotipler (Senge Sengana çeşidi ve 12 adet 2. generasyon klon) tolerant, 3. grup

kapsamındaki tek genotip Pau/27/08 yüksek düzeyde tolerant ve 4. gruptaki 2 klon (Pau/27/01 ve Pau/27/03) yüksek düzeyde hassas olarak ifade edilmiştir.

Shibli vd. (2003), acı bademde (*Amygdalus communis* L.) *in vitro* koşullarda NaCl konsantrasyonunun 0.0 mM'den (kontrol) 50, 75 ve 100 mM seviyelerine doğru yükselmesi ile birlikte sürgün gelişimi (sürgün boyu, kuru ağırlığı) ve köklenmenin (köklenme oranı, kök sayısı, uzunluğu) azaldığını bildirmişlerdir. Büyüme parametrelerindeki azalma, yaprak hücre özsuyunun osmolaritesinin -4.0'den (kontrolde), -11.1'e (100 mM NaCl uygulamasında) azalması ile ortaya çıkmıştır. Ortamda NaCl dozunun artması ile birlikte azot, fosfor, potasyum, kalsiyum ve magnezyum alımı azalmıştır. Diğer taraftan sodyumun yanı sıra çinko, bakır ve mangan gibi mikro elementlerin miktarı artmıştır. Demir ise negatif olarak etkilenmiş ve bu elementin alımının azalmasının bir sonucu olarak kloroz oranı artmıştır. Bununla birlikte yüksek tuz seviyelerinde gelişmenin durmaması acı bademin tuza yüksek dayanım gösteren bir tür olduğuna dikkat çekmiştir.

Molassiotis vd. (2006), NaCl, KCl, manitol ve sorbitol ile oluşturulmuş tuzluluk ve osmotik stres koşulları altında MM 106 elma anacının sürgün ucu kültürlerinde antioksidant ve anatomik yapıda meydana gelen değişimleri incelemişlerdir. Bütün bileşikler eksplantta mineral kompozisyonu önemli düzeyde etkilemiş ve yaprakların su kapsamını düşürmüştür. Mineral madde bakımından her iki tuzlu ortamda da sürgünlerde Cl⁻ miktarı yükselmiştir. Ayrıca, NaCl ve KCl sırasıyla Na⁺ ve K⁺ içeriğini artırmıştır. NaCl, K, Ca, Mg, Mn ve Fe içeriğini azaltırken, KCl, Ca, Mg, Mn ve Fe içeriğini azaltmıştır. Manitol, NaCl ve KCl uygulamaları yapraklarda klorofil içeriğini azaltmış ve prolin kapsamını arttırmıştır. Bu maddeler yapraklarda ve gövdede superoksit dismutaz (SOD), peroksidaz (POD) ve enzimatik olmayan antioksidant aktivitelerini ve H₂O₂ (hidrojen peroksit) kapsamını artırmıştır. Ayrıca, NaCl ve KCl uygulanmış gövde ve yapraklarda spesifik POD izoformu belirlenirken, NaCl uygulanmış eksplantların yapraklarında Mn-SOD izoformu ortaya çıkarmıştır. Bununla birlikte tuz uygulanmış yapraklarda katalaz aktivitesi azalmıştır. NaCl, yapraklarda epidermal ve mezofil hücrelerinin boyutunu çok fazla arttığı için yaprak ayasında aşırı kalınlaşma ortaya çıkmıştır. NaCl'ün etkisiyle hücrelerarası boşlukların hacminde artış

gözlenmiştir. Bulgular, Na birikiminin antioksidan ve anatomik tepkilere neden olan etmenler arasında ilk sırada yer aldığını ortaya koymuştur (Molassiotis vd. 2006).

Erturk vd. (2007), Gisela 5 kiraz anacının (*Prunus cerasus* × *P. canescens*) NaCl'e (0, 50, 100 and 150 mM) karşı tepkisini *in vitro* koşullarda araştırmışlardır. Çalışmada tuz uygulamaları sürgünlerde büyümeyi ve klorofil içeriğini azaltmış, ancak su içeriğini etkilememiştir. Malondialdehit miktarındaki artış, sürgünlerde görülebilir tuz zararı belirtileri ile birlikte tuzluluğun indüklediği oksidatif strese işaret etmiştir. Bulgular superoksit dismutaz, askorbat peroksidaz, peroksidaz, katalaz ve glutasyon reduktaz gibi antioksidan enzimlerin içeriğinin de önemli düzeyde yükseldiğini ortaya koymuştur. Her ne kadar Cl konsantrasyonunda bir değişim gözlenmemiş ise de sürgünlerde Na konsantrasyonu önemli derecede artmıştır. NaCl uygulamaları K, Ca ve Mg besin maddelerini azaltmış ve K/Na ve Na/Ca oranlarında dengesizliği uyarmıştır.

Sotiropoulos (2007), M4 elma anacında mineral madde, klorofil, prolin ve şeker kapsamı üzerine NaCl ve CaCl₂'ün etkilerini *in vitro* koşullarda araştırmıştır. Sürgünler, CaCl₂ (5 ve 10 mM) + NaCl'ün (35, 100 and 200 mM) farklı kombinasyonlarını içeren besin ortamları üzerinde 4 hafta boyunca geliştirilmiştir. Ortamda 35 mM NaCl'ün bulunduğu durumda 10 mM CaCl₂, 5mM CaCl₂'e göre sürgün sayısını ve yaş ağırlık miktarını önemli düzeyde artırmıştır. CaCl₂ konsantrasyonlarından bağımsız olarak 100 mM ve 200 mM NaCl sürgün sayısını, sürgün uzunluğunu ve yaş ağırlık düzeyini çok azaltmıştır. Kontrol ile karşılaştırıldığında NaCl ve CaCl₂ konsantrasyonlarının yükselmesi ile bitkiciklerin N, Na, Cl, prolin ve çözünebilir şeker kapsamı yükselmiş, K, Mg, B, Zn ve klorofil içerikleri azalmıştır.

Al Mansoori vd. (2007), tuza tolerant bir bitki türü olan hurmada farklı çeşitlerin tuz stresine olan tepkilerini *in vitro* koşullarda test etmişlerdir. Dört yerel hurma çeşidinin olgunlaşmamış embriolarından elde ettikleri kalluslar üzerine NaCl konsantrasyonlarının (%0.0, 0.5, 1.0, 1.5 ve 2.0) etkilerini araştırmışlardır. Tuz konsantrasyonunun artması ile birlikte kallus gelişimi engellenmiş, dokuda su kaybı

belirtileri ortaya çıkmış, kallusta kuru ağırlık oranı artmıştır. Na⁺ miktarı artarken K⁺ miktarı azalmıştır.

Troncoso vd. (2008), tuza tolerant zeytin genotiplerinin *in vitro* koşullarda seleksiyonu kapsamında Cordoba (İspanya)'da bulunan Dünya Zeytin Bitki Koleksiyonu'ndaki bitkilerden aldıkları olgun zigotik embriyoları 0, 4, 6 ve 8 g/L (0, 68.4, 102.6 ve 136.9 mM) NaCl ilave edilmiş 1/3 kuvvetindeki MS ortamı üzerinde incelemiştir. Kontrol ortamında kültüre alınan embriyoların %100'e yakını iyi gelişen normal bitki oluştururken, NaCl ilavesi ile gelişme azalmıştır. Tuza karşı genotiplerin tepkisi farklılık göstermiştir. Genel olarak tuzlu alanlarda gelişen bitkilerden alınan embriyolar tuzlu ortamda daha iyi çimlenmiştir.

Hamrouni vd. (2008), asma genotiplerinin tuz stresine toleranslarını araştırılmak üzere *in vitro* koşullarda MS ortamında bazı anaç ve çeşitlere 7 farklı tuz konsantrasyonu (0, 20, 50, 80, 100, 150 ve 200 mM NaCl) uygulamışlardır. Canlı kalma süresi, sürgün uzunluğu, göz oluşumu ve köklenme kapasitesinin ölçüldüğü çalışmada *in vitro* koşullarda uygulanan NaCl konsantrasyonu arttıkça kültürlerde çoğalma, büyüme, köklenme ve sürgünlerin canlılığı azalmıştır. Stresin ilk belirtilerinin yapraklardaki nekrozlar olduğu, bu nekrozların 80 mM NaCl uygulamasından 10 gün sonra görülmeye başladığı ve sonuçta bitkilerin kurummasına neden olduğu gözlenmiştir. Tuzluluktan dolayı bitkideki zararlanma miktarı, genotip ve NaCl konsantrasyonuna bağlı olarak değişmiştir. Tuz uygulamalarına en dayanıklı asma çeşitlerinin Sejnene ve Aslı, orta hassasiyette olanların Saouadi ve Sakasly olduğu ve bu genotipleri ise hassas olan Razegui, 1103P, 41B, SO4 genotiplerinin takip ettiği belirtilmiştir.

Bracci vd. (2008), Frantoio ve Moraiolo zeytin çeşitlerinin serbest tozlanma sonucu oluşmuş tohum hatlarından elde ettikleri köklü ya da köksüz mikro sürgünleri *in vitro* koşullarda tuzluluk stresine (0, 50, 100, 200 mM) tabi tutmuşlardır. Hem köklü ve hem de köksüz eksplantlarda sürgünlerde gelişme NaCl dozunun artması ile birlikte azalmış ancak canlılık etkilenmemiştir. Köklenme kapasitesi NaCl'ün yüksek konsantrasyonlarında azalmıştır. Bulgular zeytin genotiplerinin *in vitro* kültürlerde tuza toleranslarının belirlenmesinde köklenme parametrelerinin uygun olacağını göstermiştir.

Chatzissavvidis vd. (2008), CAB-6P (*Prunus cerasus* L.) anacının yaprak ve gövdesinin enzimatik olan ve olmayan antioksidant aktivitesi, sürgün proliferasyonu ve besin maddesi birikimi üzerine NaCl ve CaCl₂ konsantrasyonlarının (0, 30 ve 60 mM) etkilerini *in vitro* koşullarda araştırmışlardır. Bu tuzlardan sadece CaCl₂ uygulamalarında büyüme parametreleri önemli düzeyde azalmıştır. CaCl₂ ya da 60 mM NaCl uygulanan CAB-6P eksplantlarında yaprak klorofil konsantrasyonunun azalması, su kapsamının düşmesi ve gelişmenin gerilemesi muhtemelen klorür toksitesinin bir sonucudur. CaCl₂ (30 ve 60 mM) ya da NaCl (60 mM) uygulanan CAB-6P eksplantlarının yapraklarında peroksidaz (POD) aktivitesindeki artış, ekstra isoformun (POD4) açığa çıkması ve enzimatik olmayan antioksidant aktivitesinin artışı, birleşik bir antioksidant mekanizmasının varlığını desteklemiştir.

Perez-Tornero vd. (2009), tuzluluğun etkisiyle *Citrus macrophylla* eksplantlarının fizyolojik ve büyüme değişimlerini, proliferasyon ve köklendirme ortamlarında araştırmışlardır. Proliferasyon ortamı için 8.9 µM benzil adenin, 4.3 µM giberellik asit, 0.49 µM indol bütirik asit ilave edilmiş DKW (Driver ve Kuniyuki Walnut) besin ortamına 0, 30, 60, 90, 120 ve 150 mM dozlarında, köklendirme ortamı için 4.9 µM indol bütirik asit ve 5.7 µM indol asetik asit ilave edilmiş DKW ortamına 0, 20, 40, 60, 80 ve 100 mM dozlarında NaCl katılmıştır. Büyüme parametreleri NaCl uygulamalarında azalmakla birlikte tuz zararının görülebilir belirtileri proliferasyon aşamasında 60 mM NaCl, köklenme aşamasında 40 mM NaCl uygulamasında ortaya çıkmıştır. Tuzluluğun artışı ile birlikte proliferasyon olan sürgünlerde membran zararının bir işareti olarak malondialdehit (MDA) artmıştır. Toplam klorofil konsantrasyonu NaCl varlığında önemli düzeyde azalmış ve bu etki köklenmiş bitkilerde daha fazla olarak bildirilmiştir. Eksplantlarda Na⁺ ve Cl⁻ konsantrasyonları tuzluluğun artışı ile birlikte önemli düzeyde yükselmiştir. Cl⁻ seviyesi proliferasyon olan eksplantlarda, köklenen eksplantlardan daha yüksek olmuştur. Proliferasyonda, eksplantların sodyum ve klorür konsantrasyonları ile ilişkili olarak prolin ve QAC (dörtlü amonyum bileşikleri) daha yüksek bulunmuştur.

Koç vd. (2009), dört turunç (*Citrus aurantium* L.) hattından tuza tolerant yeni somaklonal varyantlar elde etmek üzere kallus kültürleri oluşturmuşlardır. Tuzluluk için

MT (Murashige ve Tucker) besin ortamına 100, 200 ve 300 mM NaCl ilave edilmiştir. Kallus materyalinin morfolojik görünümünün değerlendirilmesi ile çok sayıda tuza tolerant hücre hattı seçilmiş, 100 mM NaCl kapsayan ortamdan bu seçilmiş kallus kümelerinin embriyoidlerinden toplam olarak 67 bitkicik elde edilmiştir.

Montoliu vd. (2009), üç turunçgil anacında (Carrizo citrange (*Poncirus trifoliata* L. Raf. x *Citrus sinensis* L. Osb., CC), citrumelo CPB4475 (*C. paradisi* L. Macf. x *P. trifoliata* L. Raf., Cit) ve Cleopatra mandarin (*C. reshni* Hort. Ex Tan., CM)) *in vitro* koşullarda tuzluluk testleri için belirledikleri 60 mM NaCl konsantrasyonunda köksüz kültürlerde sürgünlerde klorür birikimi ve yaprak zararlanmasının benzer olduğunu bildirmişlerdir. Oksitatif stresin bir ölçümü olan malondialdehit seviyesi çalışmadaki hiçbir genotipte artmamıştır.

Chelli-Chaabouni vd. (2010), *Pistacia vera* L. ve *P. atlantica* Desf. tohumlarının *in vitro* koşullarda çimlendirilmiş bitkilerini NaCl'ün düşük dozlarını (0 ve 80 mM) içeren büyümeyi düzenleyici madde katılmamış DKW besin ortamı üzerinde 45 gün süreyle; *P. vera* için 0, 131 ve 158.5 mM ve *P. atlantica* için 0, 131, and 240 mM olmak üzere daha yüksek NaCl dozlarını içeren besin ortamı üzerinde 25 gün süreyle kültüre almışlardır. Düşük NaCl konsantrasyonlarında her iki türde de ölümler meydana gelmemiştir. Bununla birlikte yüksek tuz konsantrasyonlarında *P. atlantica*'da 240 mM NaCl uygulamasında %22.86 ve *P. vera*'da 158.5 mM NaCl uygulamasında %25.8 ölüm ortaya çıkmıştır. NaCl'ün 60 ve 80 mM seviyelerinde *P. vera* türünde gövde uzunluğu ve yaprak sayısı önemli düzeyde azalmıştır. Bununla birlikte 40 ve 80 mM NaCl'de her iki türde de kök sayısı azalmıştır. *P. vera* ve *P. atlantica*'nın taze ağırlık değerleri sırasıyla 40 ve 80 mM NaCl uygulamasında 45 gün sonra ve 158.5 ve 240 mM NaCl uygulamasında 25 gün sonra önemli düzeyde azalmıştır. Bitki organlarında sodyum ve klorür alımının *P. atlantica* türünde *P. vera*'ya göre daha etkili kontrol edildiği görülmüştür. Her iki türde de K⁺ içeriği tuz konsantrasyonunun artışı ile birlikte önemli düzeyde azalmıştır. Düşük NaCl konsantrasyonlarında K⁺/Na⁺ oranı 2'nin üstünde tutulmuştur, ancak tuz konsantrasyonlarının yükselmesi ile beraber K-Na seçici mekanizmasının başarısızlığı ile ilgili olarak bu oran çarpıcı biçimde düşmüştür. Ca²⁺/Na⁺ oranı *P. vera* türünde 60 ve 80 mM NaCl ve *P. atlantica* türünde 60 mM

NaCl konsantrasyonunda önemli ölçüde azalmıştır. Her iki türde de yüksek NaCl uygulamaları (131-240 mM NaCl) prolin içeriğinde önemli bir artışa neden olmuştur.

Ghaleb vd. (2010), tuz stresine karşı turunç (*C. aurantium* L.) ve Volkamer limon (*C. volkameriana* Ten. & Pasq.) genotiplerinin mikro sürgünlerinin tepkisini araştırdıkları çalışmalarında iki tuz tipini (NaCl ve CaCl₂) 0, 50, 100, 150, 200 ve 300 mM dozlarında kullanmışlardır. Gelişme ortamında NaCl'ün konsantrasyonu arttıkça dokularda Na ve Cl birikiminin arttığı, Ca miktarının azaldığı belirlenmiştir. CaCl₂ dozunun artışı ile birlikte bu kez dokularda Ca birikiminin arttığı, Na miktarının azaldığı her iki tuz uygulamasında da potasyum miktarının azaldığı saptanmıştır. NaCl, CaCl₂ ya da bunların kombinasyonlarının bulunduğu kültür ortamlarında 2 ay sonra bitki gelişiminin (yaprak sayısı, bitki uzunluğu, taze ve kuru ağırlık) azaldığı, bitkilerde yaprak zararının arttığı saptanmıştır.

Aziz vd. (2011), N36, Morris ve Sarawak ananas çeşitlerinin, 0, 34, 68, 103, 137, 171, 205 ve 240 mM NaCl konsantrasyonlarını içeren MS besin ortamı üzerinde 4 hafta süreyle inkübe edilen kültürlerinde tuzluluk stresinin *in vitro* bitkilerin K, Ca, P, Mg ve Na, klorofil a, b ve karotenoid kapsamları üzerine etkilerini incelemişlerdir. Genel olarak, klorofil ve karotenoid miktarları 68 mM NaCl seviyesine kadar NaCl'ün artması ile birlikte yükselmiş ancak, daha yüksek tuz konsantrasyonlarında azalmıştır. Klorofil ve karotenoidlerin miktarı N36 çeşidinde diğer çeşitlere göre çok daha yüksek bulunmuştur.

Andreu vd. (2011), *Prunus* anaçlarının tuz stresine toleranslarının kök kültürü ile erken teşhisi konusunda çalışmışlardır. Araştırmada genotip olarak tolerantlık düzeyi yüksek erik anaçları Adesoto 101 (*P. insititia* L.) ve Marianna 2624 (*P. cerasifera* Ehrh. x *P. munsoniana* Wight & Hedr.), daha az tolerant vişne anaçları Mastro de Montanana ve CAB 6P (*P. cerasus* L.), orta düzeyde toleranslık gösteren badem x şeftali hibriti GF 677 (*P. dulcis* (Miller) D.A. Webb x *P. persica*) kullanılmıştır. Kökler, 5 µM indol bütirik asit içeren makro element düzeyi ½ olan MS ortamında köklendirilen mikro sürgünlerden alınmıştır. Kültürler, 10 mm uzunluğundaki köklerin 0, 20, 60 ve 180 mM dozlarında NaCl ilave edilmiş sıvı besin ortamına alınması ile oluşturulmuştur. Kök

kültürleri 24 °C’de, karanlıkta ve 90 rpm hızda çalışan çalkalayıcı üzerinde 3 hafta inkübe edilmiştir. Tuz ortamlarının EC değerleri 6.0, 8.2, 12.5 ve 23.6 dS.m⁻¹ olarak ölçülmüştür. Kök kültürlerinde hem gelişme ve hem de nişasta kapsamı tuz konsantrasyonlarından etkilenmiştir. Genotiplerin tuza tepkisi farklı olmuştur. 60 mM NaCl konsantrasyonunda erik genotipleri kontrol ile benzer kök uzunluğu meydana getirirken, vişne ve badem x şeftali hibrit genotiplerinde bu NaCl dozunda kök uzunluğu kontrolün %40’ı düzeyinde kalmıştır.

Bahmani vd. (2012), MM106 elma anacında *in vitro* sürgün proliferasyonu ve köklenme üzerine MS besin ortamında farklı NaCl konsantrasyonlarının (0, 20, 40, 80, 100 ve 120 mM) etkisini araştırmışlardır. Tuz konsantrasyonunun 0 ve 20 mM’den 40-120 mM’e yükselmesi ile birlikte sürgün gelişimi (sürgün sayısı, uzunluğu ve taze ağırlığı) ve köklenme (köklenme oranı, kök sayısı ve uzunluğu) azalmıştır. Kontrol ile karşılaştırıldığında 20 mM NaCl konsantrasyonu sürgün uzunluğu, taze ağırlığı ve kök uzunluğunu önemli düzeyde artırmıştır. Sürgün uzunluğu 120 mM NaCl uygulamasında 20 mM NaCl’de elde edilenin yarısı kadar olurken sürgün sayısındaki düşüş çok az olmuştur.

Wang vd. (2013), kallus ve bitkicik aşamalarında iki *Malus* türünde (anaç genotipi *M. robusta* (Rehd) ve çeşit genotipi *M. domestica* Borkh. cv. Fuji) gelişim ve antioksidant tepki üzerine 150 mM NaCl tuz stresinin etkisini *in vitro* koşullarda MS ortamı üzerinde araştırmışlardır. Tuz stresi, Fuji çeşidinde katalaz (CAT) aktivitesini azaltırken iki *Malus* türünde de superoksit dismutaz (SOD), peroksidaz (POD) ve glutathion reduktaz (GR) aktivitelerinde artış meydana getirmiştir. Tuz stresi ayrıca her iki türde nisbi büyüme oranındaki (RGR) azalışın bir sonucu olarak malondialdehit (MDA) birikimini, hidrojen peroksit ve superoksit radikallerin (O₂⁻) kapsamını artırmıştır. Bitkicik aşamasında SOD, POD, CAT ve GR aktiviteleri kallus aşamasındakinden daha yüksek, H₂O₂, O₂⁻ ve MDA kapsamaları ise daha düşüktür. Farklı aşamalarda iki *Malus* türü H₂O₂ ve O₂⁻ birikimi ve bunların ortadan kalkma kapasitesi için farklı modeller gösterirken, bu türlerde MDA ve RGR benzer birikim göstermiştir. Sonuçlar, her iki türün de tuz stresine karşı kallus aşamasında bitkicik aşamasından daha duyarlı olduğunu göstermiştir. Belirli bir aşamada her iki türün tuz stresine tepkisi ise benzer

olmuştur. Kallus aşaması, nispeten hızlı ve hassas tepki, kısa generasyon süresi ve kontrol edilebilen koşullar nedeniyle tuz stresine karşı bitkinin tepkisini değerlendirmek için daha uygun bulunmuştur.

Habibi ve Amiri (2013), iki turunçgil anacında (turunç ve üç yapraklı) gelişim, mineral madde alımı ve fizyolojik tepki üzerine tuzluluğun etkisini araştırmışlardır. Bu iki anaca ait tohumları önce *in vitro* koşullarda MS ortamı üzerinde çimlendirmiş ve vejetatif embriyodan gelişen yaklaşık 20 cm uzunluğundaki uniform bitkicikleri eksplant olarak kullanmışlardır. Eksplantlar, 8.9 µM benzil adenin ve 0.5 µM naftalen asetik asit içeren 0.0, 50, 100, 150 ve 200 mM NaCl ilave edilmiş MS besin ortamında alt kültüre alınmıştır. Her iki türde de tuzluluğun artması ile birlikte peroksidaz enzim aktivitesi artarken gelişme oranı, yaprak klorofil kapsamı, toplam protein, fotosentez oranı, stomal iletkenlik ve mineral madde alımı önemli düzeyde azalmıştır. 200 mM NaCl uygulamasında üç yapraklı anacının gelişimi 5. haftada engellenmiş ve daha sonra eksplantlar ölmüştür. Turunç anacı tuzluluk stresine daha dayanıklı bulunmuştur. Bu anaçta tuz koşullarında mineral madde alımı mümkün olmuştur. Ayrıca turunç anacında dokularda Na ve Cl konsantrasyonu üç yapraklı anacından daha düşük bulunmuştur.

2.7 *Pyrus* Türlerinin Tuz Stresine Tepkisi

Okubo ve Sakuratani (2000), iki Asya çöğür armut anacının canlılık, yaprak yanıklığı ve mineral madde alımı üzerine sodyum klorürün etkilerini araştırdıkları çalışmada *Pyrus betulifolia* Bunge (BET) ve *P. pyrifolia* (Burm f.) Nakai (PYR)'nın saksıda yetişen 2 yaşlı bitkileri kullanılmıştır. Bitkiler 0, 25, 50, 150 ya da 200 mM (sadece *P. betulifolia*) NaCl içeren su ile sulanmışlardır. *P. betulifolia* 100 mM NaCl uygulamasında yüksek canlılık oranı ve hafif yaprak hasarı göstermiştir. *P. pyrifolia*'da ise 25 mM NaCl uygulamasında yapraklarda şiddetli zararlanma ve test bitkilerinde ölümler meydana gelmiştir. *P. betulifolia*'nın 100 mM NaCl uygulamasında yapraklardaki Na konsantrasyonu, *P. pyrifolia*'da 25 mM NaCl uygulaması ile benzer olmuştur. Sonuç olarak, *P. betulifolia*'nın, toprak tuzluluğu yüksek alanlarda armut yetiştiriciliği için anaç olarak kullanım potansiyeli bulunduğu belirlenmiştir.

Okubo vd. (2000), 3 yaşındaki *P. betulifolia* Bunge ve *P. pyrifolia* (Burm f.) Nakai çöğürleri üzerine aşıladıkları Çin, Japon ve Avrupa armut çeşitlerinde (Yari, Kosui ve La France) genç bitkilerin tuzlu koşullarda büyümelerini incelemişlerdir. Bitkiler kum ile doldurulmuş saksılarda yetiştirilmiş ve 0, 25 ya da 50 mM NaCl ilave edilmiş %20'lik Hogland's solüsyonu ile sulanmıştır. *P. betulifolia* üzerine aşılı tüm çeşitler 50 mM NaCl ile sulamada dahi iyi gelişirken *P. pyrifolia* üzerine aşılı olanlar NaCl uygulamalarında şiddetli zarar görmüştür. Çiçek tomurcuğu oluşumu tüm kalem/anaç kombinasyonlarında NaCl uygulamaları tarafından uyarılmıştır. Mineral madde analizleri, *P. betulifolia*'nın tuza toleransını, yapraklara Na ve Cl iyonlarının taşınımını kısıtlama yeteneğinden dolayı olduğu ileri sürülmüştür.

Musacchi vd. (2006), Abb'e Fetel armut çeşidinin kendi kökleri üzerinde ya da farklı ayva ve armut anaçları üzerine aşılanmış 1 yaşlı bitkilerinin 5.0 dS.m^{-1} ve 1.7 dS.m^{-1} tuzlu suya tepkisini araştırmışlardır. 5.0 dS.m^{-1} sulama suyu anaç olarak kullanılan genotipe bağlı olarak sadece vegetatif gelişmeyi hafif olarak azaltmıştır. Ayva ve armut anaç genotipleri, klorür ve sodyum alımı üzerine zıt bir etkiye sahiptir ve yapraklardan bu iyonları uzak tutma kabiliyetlerine göre farklıdır. Ayvalar tuzlu suyla sulandığında sodyum ve klorür alımı önemli düzeyde artmaktadır. Oysa, armut kökleri Na^+ ve Cl^- birikimini önlemek için tuzu dışlayan bir denetim mekanizması geliştirmiştir. Ayva üzerine aşılı ağaçlar, yapraklarında önemli miktarda Cl^- biriktirmiştir. Ancak, absorbe edilen Na^+ 'un çoğu köklerde depolanmıştır. Bu mekanizma ksileme yükleme ve yapraklara taşınımını önleyen bir mekanizmadır. Tuzluluğun potasyum (K^+), kalsiyum (Ca^{2+}) ve magnezyumun (Mg^{2+}) alımı üzerine herhangi bir etkisi kaydedilmemiştir. Bununla birlikte, yaprak potasyum konsantrasyonu, ayva üzerinde armuda göre önemli ölçüde düşmüştür. Armut genotiplerinin K^+ alma yeteneği kontrol ağaçlarında ortaya çıkmış ve tuz uygulaması ile etkilenmemiştir. Bu durum, yüksek K^+/Na^+ seçiciliğinden dolayı Na^+ 'u dışta tutma yönünde armutlar tarafından geliştirilen strateji ile ilişkili olabilmektedir.

Sotiropoulos vd. (2006), BA 29 ve QA (Quince A) ayva anaçlarının tuzluluk ve bora tepkilerini araştırdıkları çalışmalarında 1:1 kum:perlit karışımında yetiştirdikleri bitkileri 2 tuzluluk seviyesi (0.75 ve 4 dS.m^{-1}) ile kombine ettikleri 2 bor (0.025 ve 0.2

mM) konsantrasyonunu içeren 250 ml Hogland besin solüsyonu ile her 2 günde bir sulamışlardır. Tuzluluk seviyeleri bir KCl (4 M) stok solüsyonu ile ayarlanmıştır. Tuzluluk seviyesi arttıkça her iki anaçta da yaprakların potasyum konsantrasyonu artmıştır. Her iki B seviyesinde de yüksek tuzluluk düzeyinde sürgün boyu, ortalama sürgün taze ağırlığı, yeni oluşan yaprak sayısı önemli düzeyde azalmıştır. Bu azalış yüksek B konsantrasyonunda daha belirgin olmuştur.

Sotiropoulos vd. (2006), OH x F 333 (Old Home x Farmingdale 333) armut klon anacının (*P. communis* L.) gelişimi ve mineral madde kompozisyonu üzerine bor (B) ve NaCl ile uyarılmış tuzluluğun etkilerini *in vitro* sürgün ucu kültürleri ile araştırmışlardır. Sürgünler NaCl (0, 10, 20, 40 ve 80 mM) ile birlikte B'un (0.1 ve 2 mM) farklı konsantrasyonlarını içeren MS (Murashige ve Skoog) besin ortamları üzerinde *in vitro* koşullarda 7 hafta süreyle kültüre alınmıştır. Çalışmada en uzun sürgünler B'un 0.1 mM ve NaCl'ün 80 mM konsantrasyonunda, en yüksek sürgün sayısı B'un 0.1 mM ve NaCl'ün 0-20 mM dozunda elde edilmiştir. Kültür ortamında 20 ve 40 mM NaCl'ün bulunması, test edilen tüm B konsantrasyonlarında 0 mM NaCl uygulaması ile karşılaştırıldığında kültürlerin yaş ağırlığını artmıştır. Bitkilerin P, K, Ca, Mg, Na, Fe, Mn ve Zn konsantrasyonları ortamdaki B ve NaCl tarafından farklı biçimde etkilenmiştir.

Matsumoto vd. (2006a), Asya yabani armut türleri *P. betulaefolia* Bunge, *P. pyrifolia* Nakai ve *P. xerophila* Yu, Akdeniz yabani armut türleri *P. amygdaliformis* Vill. ve *P. elaeagrifolia* Pall.'ı 30 gün boyunca 75 mM ve 150 mM NaCl solüsyonu ile sulamışlardır. Bu uygulamalar sonrasında Akdeniz türlerinde yaprak zararlanması gözlenmezken, Asya türlerinde yapraklarda zararlanmalar meydana gelmiştir. Her iki NaCl konsantrasyonunda da Akdeniz türlerinde yaprakların Na ve Cl içeriği Asya türlerinininkinden belirgin biçimde daha az olmuştur. Bu nedenle, Akdeniz türleri *P. amygdaliformis* ve *P. elaeagrifolia*'nın yapraklara Na ve Cl taşınımını sınırlayan, gövdede tuzu dışlayan mekanizmalara sahip olduğu düşünülmektedir. Akdeniz ve Asya armut türlerinde gövde su potansiyeli ve yaprak iç dış CO₂ oranları NaCl uygulamasıyla azalmıştır. Böylece, bu türlerde gözlenen fotosentetik düşüşe bitkideki su potansiyelindeki azalmayla uyarılan stoma kapanması neden olmuştur. Ancak, NaCl

stresi koşullarında Akdeniz türlerinde fotosentetik oran, Asya türlerinden daha yüksektir. Bu nedenle, Akdeniz türlerinin yapraklarında Na ve Cl'un düşük konsantrasyonları, NaCl stresi altında fotosentetik oranların önemli düzeyde düşüşlerini engellemiştir. Bulgular, yabani Akdeniz türleri *P. amygdaliformis* ve *P. elaeagrifolia*'nın, yabani Asya türleri *P. betulaefolia*, *P. pyrifolia* ve *P. xerophila*'dan daha yüksek bir tuz toleransına sahip olduğunu göstermektedir. Çalışmada, yabani Akdeniz armut türlerinin Japon armudu için tuza tolerant anaç olarak yararlı genetik kaynaklar olduğu bildirilmiştir.

Matsumoto vd. (2006b) beş Asya *Pyrus* anaç türünün *P. betulaefolia* Bunge (*P. betulaefolia* C ve *P. betulaefolia* N) *P. calleryana* Dcne. (*P. calleryana* 8), *P. pyrifolia* Nakai, *P. fauriei* Schneid ve *P. dimorphophylla* Makino (*P. dimorphophylla* 6) tuza toleransını araştırmışlardır. Dört aylık çöğürlere 50 mM, 100 mM, 150 mM, 200 mM NaCl solüsyonu uygulanmış ve yaprak hasarı, sürgün büyümesi, yaprak su potansiyeli ve mineral madde alımı değerlendirilmiştir. *P. betulaefolia* C, 200 mM NaCl uygulamasında dahi görünür bir simptome sahip olmayarak tuza en yüksek tolerans gösteren genotip olmuştur. Bunun aksine, *P. calleryana* 8, *P. fauriei* ve *P. pyrifolia* döküm ve ölüm şeklinde şiddetli yaprak zararı ile daha düşük tuz toleransı sergilemiştir. Bütün türlerde NaCl uygulaması ile yaprak su potansiyeli azalmış ve bu bakımdan türler arasında farklılık olmamıştır. Her ne kadar türler ve NaCl uygulaması arasındaki farklılıklar küçük olsa da NaCl uygulamasından sonra bütün türlerin köklerinde sodyum ve Cl kapsamı artmıştır. Öte yandan, yapraklarda Na ve Cl içeriği türler arasında farklılık göstermiştir. Altı hafta boyunca 150 mM NaCl uygulaması sonrasında tuza toleran *P. betulaefolia* C ile karşılaştırıldığında tuza duyarlı *P. calleryana* 8 ve *P. pyrifolia* türlerinde yapraklarda daha yüksek konsantrasyonlarda Na ve Cl birikimi belirlenmiştir. Sonuçlar, *P. betulaefolia* C'nin, Na ve Cl'un bitkinin üst kısımlarına taşınmasını kısıtlama, sürgün ve kök arasında taşınımı sınırlama ve/veya depolamayı engelleme gibi NaCl'e daha yüksek bir toleranslık sağlayan anahtar bir mekanizmaya sahip olabileceğini göstermiştir.

Matsumoto vd. (2007), 0, 25 ve 100 mM NaCl'ün *P. betulaefolia*, *P. calleryana* ve *P. pyrifolia* anaçları üzerinde Japon armut çeşidi "Akibae"nin iyon alımı ve gaz değişimi

üzerine etkilerini incelemişlerdir. *P. betulaefolia* anacı için fotosentetik orandaki düşüş, yapraktaki Na ve Cl konsantrasyonları, diğer anaçlardakinden daha az olmuştur. *P. betulaefolia* üzerinde gelişen Akibae, *P. pyrifolia* ve *P. calleryana* üzerinde yetiştirilene göre tuza karşı daha yüksek bir toleranslık sergilemiştir. Sonuçlar, *P. betulaefolia*'nın kökte tuzu dışlama mekanizmasına sahip olduğunu ve bu özelliğin aşılana çeşitte de korunduğunu açığa çıkarmıştır. Bu nedenle, *P. betulaefolia*'nın tuzlu koşullarda Japon armut yetiştiriciliğinde uygun bir anaç olduğu belirtilmiştir.

Wu ve Zou (2009) fotosentez, iyon birikimi ve reaktif oksijen türlerinin enzimatik olmayan ve enzimatik temizlenmesi üzerine tuzluluk stresinin etkisini araştırmak için bir yaşındaki *P. betulaefolia* Bunge çöğürlerini 27 gün süreyle 0, 50, 100, 150 ve 200 mmol NaCl solüsyonu ile sulamışlardır. Deneme sera koşullarında ve saksılı bitkiler üzerinde yürütülmüştür. Tuzluluk stresi armut çöğürlerinin yapraklarında su kullanım etkinliğini, stomal iletkenliği ve fotosentez oranlarını azaltmıştır. Ancak, transpirasyon oranları ve yaprak sıcaklığı artmıştır. NaCl konsantrasyonlarının artmasıyla birlikte hidrojen peroksit ve süperoksit anyon radikal içeriği artmıştır. Olay, armut yapraklarının oksitatif zarardan mağdur olduğunu gösteren malondialdehit için de gözlenmiştir. Armut çöğürleri tuzluluk stresine maruz kaldığında süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) aktiviteleri artış şeklinde hızla tepki vermiştir. Çöğürlerin yapraklarındaki toplam protein kapsamı tuzluluk stresi ile sınırlanırken, askorbat içeriği yükselmiştir. NaCl'ün düşük seviyelerine (50 ya da 100 mmol) maruz kalan çöğürlerde tuzluluk stresi glutathion içeriğini azaltırken, tuz stresinin yüksek seviyelerinde (150 veya 200 mmol NaCl) glutathion birikimini uyarmıştır. Tuzluluk stresi çöğürlerde Na⁺, Cl⁻, K⁺ ve Mg²⁺ birikimini artırmış, ancak 50 mmol NaCl koşulları altında K⁺/Na⁺ dışında Na⁺'a diğer iyonların oranlarını ve Ca²⁺ düzeyini azaltmıştır. Bu durum *P. betulaefolia* çöğürlerinin yapraklarının sadece 50 mmol NaCl koşulları altında tuzu dışlama kapasitesine sahip olduğunu ve Ca²⁺'un tuzluluk stresi koşulları altında ikinci bir haberci olarak temel bir rol oynamadığını göstermiştir.

Aruani vd. (2011) Arjantin'de Yukarı Rio Negro Vadisi'nde tuzlu toprakların fiziksel ve fiziko-kimyasal özelliklerini ve Williams armudunun verim ve kalitesi üzerine etkilerini araştırmışlardır. Birinci parselin toprağı tuzlu (10-15 dS.m⁻¹) ve yüzeyi

sodyum yönünden hafif zengin (değişebilir Na oranı %20), ancak yüzeyin altı bu bakımdan çok kuvvetli, organik maddesi %3.63 olarak belirlenmiştir. Bu parselde birim gövde kesit alanına düşen verim 0.028 kg olarak kaydedilmiştir. Tuz kapsamı 1. parselde benzeyen 2. parselin değişebilir sodyum oranı %30'dan az ve daha yüksek organik madde (%4.32) içerdiği saptanmıştır. Bu parselde verim 0.035 kg'dır. İkinci parseldeki ağaçlar 1. parseldekine göre daha fazla orta irilikte ve küçük meyveler meydana getirmiştir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

Bu çalışma Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Biyoteknoloji II Laboratuvarı ve Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarı'nda 2009-2014 yılları arasında yürütülmüştür.

3.1 Materyal

Araştırmada bitkisel materyal olarak armuda anaç olarak kullanılan *Pyrus communis* L. (Avrupa armudu), *Pyrus elaeagrifolia* Pall. (ahlat) ve *Cydonia oblonga* Mill. (ayva) türlerine dahil farklı genotiplerin mikro çelikleri kullanılmıştır.

P. communis L., dünyada armuda anaç olarak en fazla kullanılan *Pyrus* türleri arasında yer almaktadır. Bu tür özellikle çöğür ve klon anaç olarak Avrupa armutları için kullanılan çok sayıda genotipi kapsamaktadır. Armut çeşitleri ile aşı uyumsuzluğu sorunu olmayan bu anaçlar, üzerlerine aşılana çeşitleri farklı kuvvetlerde geliştirmekte, soğuğa, killi topraklara ve kireçten kaynaklanan kloroza karşı genel olarak toleranslı olarak bilinmektedir. Bu çalışmada *P. communis* türünde tuzluluk stresi denemeleri, bir standart armut çeşidi (Ankara armudu) ve bir klon armut anacında (Old Home x Farmingdale 333) yürütülmüştür.

Ankara armudu, Türkiye'nin önemli standart kışlık kaliteli armut çeşitlerinden birisidir. Bununla birlikte farklı klonları üzerinde yürütülen *in vitro* çalışmalarda Ankara armudunun sürgün ucu kültürü ile klonal çoğaltım performansının yüksek olduğu belirlenmiştir (Aygün vd. 2007). Bu bulgu, Ankara armudunun kendi kökleri üzerinde çeşit ya da bir klon anaç olarak kullanılmak üzere *in vitro* koşullarda çoğaltım potansiyelinin bulunduğunu göstermektedir.

Old Home x Farmingdale 333 anacı, Old Home x Farmingdale serisinde yer alan bir klon armut anacıdır. Ateş yanıklığı ve armut göçüren (pear decline) hastalıklarına karşı yüksek düzeyde dayanıklıdır. Bu anaç, çelik ve doku kültürü yöntemleri ile vegetatif olarak çoğaltılabilmektedir. Üzerine aşılana çeşitleri standardın yaklaşık %70'i kadar

geliştiren, yarı kuvvetli, verimli, erkenci ve toprağa tutunması iyi olan bir anaçtır (Lombard ve Westwood 1987).

Çalışmada yer alan diğer bir *Pyrus* türü *P. elaeagrifolia* Pall.(ahlat), yaygın bulunduğu Orta Anadolu ve geçit bölgelerinde özellikle kurak ve kıraç alanlarda çok eski zamanlardan bu yana farklı armut çeşitleri ile aşılana ve böylece farklı yaşlardaki tohumdan gelişmiş bitkileri anaç olarak değerlendirilen bir türdür (Köksal vd. 2002). Ahlat çöğürü üzerine aşılı armut ağaçları standart armut anaçları düzeyinde kuvvetli (%100) gelişmekte ve armut çeşitleriyle aşı uyumsuzluğu sorunu ortaya çıkmamaktadır (Lombard ve Westwood 1987). Bu çalışmada *P. elaeagrifolia* Pall. türünde tuzluluk stresi denemelerinde, tarafımızdan Ahlat-1, Ahlat-2 ve Ahlat-3 olarak tanımlanmış üç farklı ahlat bitkisinin (tipinin) mikro çoğaltım yöntemi ile oluşturulmuş klonları kullanılmıştır.

Araştırmanın diğer türü *C. oblonga* Mill. (ayva), Avrupa başta olmak üzere dünyanın bir çok yerinde armuda bodur klon anaç olarak en fazla kullanılan türdür. Bazı armut çeşitleri (Williams, Winter Nelis, Clapps Favorite, Farmingdale, Coscia, Dr.Jules Guyot, Starkrimson) ile arasında aşı uyumsuzluğu bulunmakla birlikte birçok çeşit (Anjou, Comice, Beurre Hardy, Old Home, Abbe Fetel, Passe Crassane, Conference, Santa Maria) ile aşıda uyumsuzluk sorunuyla karşılaşmamaktadır. Kış soğuklarına karşı hassas olan bu tür, kireçten kaynaklanan kloroza duyarlıdır. Ağır killi topraklara ise toleranslıdır. Üzerine aşılana çeşidi erken meyveye yatırmaktadır. Toprağa tutunma kuvveti zayıf olan bu tür, ateş yanıklığı hastalığına karşı oldukça hassastır ve kök sürgünü verme eğilimi nedeniyle bu sürgünlerden ateş yanıklığına yakalanma riski yüksektir. Tepe daldırması, kök sürgünü, çelik ve doku kültürleri ile klonal olarak çoğaltılabilmektedir. Bu çalışmada, *C. oblonga* Mill. türünde tuzluluk stresi denemelerinde EM Quince A anacı kullanılmıştır. Bu anaç İngiltere’de East Malling Araştırma İstasyonu’nda selekte edilmiştir. Üzerine aşılana çeşitleri standart anaçların (armut çöğürü) yaklaşık %50’si büyüklükte geliştiren bu anaç Avrupa armutları için dünyada en yaygın kullanılan bodur klon ayva anacıdır. Armut göçürene (pear decline), küllemeye, kök boğazı çürüklüğüne, kök kanserine ve pamuklu bite dayanıklı olan bu anaç diğer birçok ayva anacı gibi ateş yanıklığına ve kloroza çok hassas, toprağa

tutunması zayıftır ve bazı armut çeşitleriyle aşı uyumsuzluğu sorunu bulunmaktadır (Lombard ve Westwood 1987).

3.2 Yöntem

3.2.1 Mikro çeliklerin elde edilmesi

Ankara armudu, OH x F 333 (*P. communis* L.), Ahlat-1, Ahlat-2, Ahlat-3 (*P. elaeagrifolia* Pall.) ve Quince A (*C. oblonga* Mill.) genotiplerinin aktif durumdaki taze sürgünlerinden yaklaşık 3 cm uzunlukta toplanan sürgün uçları önce çeşme suyu altında 30 dakika süreyle yıkanmış ve ardından sterilizasyon için %15 klor içeren ticari sodyum hipokloritin %20'lik solusyonunda 15-20 dakika süreyle çalkalanmıştır. Sodyum hipokloritin dokulardan uzaklaşması için sürgün uçları steril saf su içerisinde 5'er dakika süreyle 3 kez yıkanmıştır. Steril sürgün uçları laminar hava akışlı kabin içerisinde aseptik koşullarda meristem ve 2-3 yaprak taslağını içerecek şekilde bisturi yardımı ile yaklaşık 10 mm uzunlukta kesilerek dikime hazırlanmıştır. Dikim, içerisinde 10 ml besin ortamı bulunan 120 mm x 25 mm boyutlarındaki cam tüplere yapılmış ve tüplerin ağız kısımları dış ortamdan bulaşmaları önlemek için streç film ile sarılmıştır. Kültürler $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ sıcaklık ve 16 saat aydınlık ($35 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), 8 saat karanlık koşullara sahip iklim odasında 4 hafta süreyle gelişmeye bırakılmıştır.

İlk dikim (başlangıç) aşamasının sonunda gelişen sağlıklı sürgünlerin tamamı 4'er hafta ara ile alt kültüre alınmıştır. Alt kültürler için yaklaşık 2 cm uzunluğunda hazırlanmış mikro sürgünler, içerisinde 50 ml ortam bulunan 250 ml'lik cam erlenmayerlere dikilmiştir. Dikim sonrasında erlenmayerlerin ağız kısımları alüminyum folyo ile kapatılmış ve folyonun kenarları streç film ile sarılmıştır. Alt kültürler de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ sıcaklık ve 16 saat aydınlık koşullara sahip iklim odasında 4 hafta gelişmeye bırakılmıştır.

Başlangıç ve çoğaltım aşamalarının her ikisinde de besin ortamı olarak 1.0 mg/l BA (benziladenin) ve 0.5 mg/l GA₃ (gibberellik asit) içeren, pH'sı 5.7'ye ayarlanmış, %3 sakaroz ve %0.7 agar katılmış modifiye edilmiş MS temel besin ortamı kullanılmıştır

(Çizelge 3.1) (Dodds ve Roberts 1993). Armut ve ahlat genotipleri için MS temel besin ortamının amonyum nitrat içeriği 1/3 düzeyinde alınmıştır. Ortamların sterilizasyonu otoklav ile 121°C ve 1 atmosfer basınç altında 20 dakika süreyle yapılmıştır.

Çizelge 3.1 Modifiye edilmiş MS (Murashige ve Skoog) temel besin ortamının içeriği (Dodds ve Roberts 1993)

(A) MAKRO ELEMENTLER	g/mol	MS
		Ortamı mg/l
Amonyum nitrat (NH ₄ NO ₃)	80.04	1650
Amonyum sülfat (NH ₄ SO ₄)	132.14	-
Potasyum nitrat (KNO ₃)	101.11	1900
Kalsiyum klorür dihidrat (CaCl ₂ .2H ₂ O)	147.02	440
Potasyum dihidrojen fosfat (KH ₂ PO ₄)	136.09	170
Magnezyum sülfat heptahidrat (MgSO ₄ .7 H ₂ O)	246.48	370
(B) DEMİR		
Soydum-demir EDTA (C ₁₀ H ₁₂ N ₂ FeNa)	367.1	36.7
Sodyum EDTA (Na ₂ ETDA)	372.24	-
Demir sülfat heptahidrat (FeSO ₄ 7 H ₂ O)	278.02	-
(C) MİKRO ELEMENTLER		
Mangan sülfat monohidrat (MnSO ₄ . H ₂ O)	169.02	16
Çinko sülfat heptahidrat (ZnSO ₄ .7H ₂ O)	287.54	8.6
Borik asit (H ₃ BO ₃)	61.83	6.2
Potasyum iyodür (KI)	166.01	0.83
Sodyum molibdat dihidrat (Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O)	241.95	0.25
Bakır sülfat pentahidrat (CuSO ₄ .5H ₂ O)	249.68	0.025
Kobalt klorür heksahidrat (CoCl ₂ . 6H ₂ O)	237.9	0.025
(D)VİTAMİNLER		
Myo-Inositol (C ₆ H ₁₂ O ₆)	180.16	100
I- inositol	180.16	-
Glisin (C ₂ H ₅ NO ₂)	75.07	2
Thiamin klorid hidroklorid (C ₁₂ H ₈ C ₁₂ N ₄ O ₈ xH ₂ O)	337.27	0.1
Nikotinik asid (C ₆ H ₅ NO ₂)	123.11	0.5
Pridoksol hidroklorid (C ₈ H ₁₂ ClNO ₃)	205.64	0.5

3.2.2 Tuzluluk stresinin oluşturulması

Çalışmada tuzluluk stresi, NaCl (molekül ağırlığı M=58.44) ve CaCl₂.2H₂O (M=147.01) tuzlarının kombinasyonu ile oluşturulmuştur. *In vitro* koşullarda tuzluluk stresi,

- 1) 0 mM NaCl + 0 mM CaCl₂.2H₂O (kontrol),
- 2) 75 mM NaCl + 7.5 mM CaCl₂.2H₂O,
- 3) 150 mM NaCl + 15 mM CaCl₂.2H₂O
- 4) 225 mM NaCl + 22.5 mM CaCl₂.2H₂O ve
- 5) 300 mM NaCl + 30 mM CaCl₂.2H₂O

şeklinde düzenlenmiş bir plan kapsamında NaCl + CaCl₂.2H₂O'nun katılımı ile 1.0 mg/l BA ve 0.5 mg/l GA₃ içeren, pH'sı 5.7'ye ayarlanmış, %3 sakkaroz ve %0.7 agar ilave edilmiş MS temel besin ortamında oluşturulmuştur. Besin ortamları 50'şer ml olarak 250 ml'lik cam erlenmayerlere dağıtılmış ve 121°C ve 1 atmosfer basınç altındaki otoklavda 20 dakika süreyle sterilize edilmiştir.

Sürgün ucu kültürü ile aseptik koşullarda çoğaltılmış sürgünlerden tepe tomurcuğunu içerecek şekilde hazırlanmış yaklaşık 25 mm uzunluğundaki mikro çelikler eksplant olarak besin ortamlarına dikilmiştir. Kültürler 25±1°C sıcaklık ve 16 saat aydınlık koşullara sahip iklim odasında 4 hafta süreyle gelişmeye bırakılmıştır. Sürenin sonunda kültürlerde sürgünlerin canlılık oranı (%), ortalama sürgün sayısı (çoğalma durumu) (adet/eksplant), ortalama sürgün uzunluğu (mm) ve ortalama sürgün kalınlık düzeyi (1-3) (1=ince, 2=orta ve 3=kalın), kallus çapı (mm), sürgünlerde zararlanma düzeyi (0-4) (0= zararlanma yok, 1= az, 2=orta, 3=çok, 4=şiddetli) ve ortalama yaş ağırlık (g/eksplant) özellikleri morfolojik olarak incelenmiştir.

In vitro tuzluluk stresi denemeleri "Tesadüf Parselleri Deneme Deseni"ne göre kurulmuştur. Beş farklı uygulamanın 6 farklı genotip üzerine yaptığı etkinin araştırıldığı denemeler 5 tekerrürlü olarak kurulmuştur. Denemelerde her birine 6'şar mikro çeliğin (eksplant) dikildiği erlenmayerler bir tekerrür olarak değerlendirilmiştir. Böylece her bir genotip için tuzluluk stresi denemelerinde 30'ar adet mikro çelik (eksplant) kullanılmıştır. Bu denemede veriler, varyans analizi yöntemi ile SPSS Paket Programı ile *F* testine ($P \leq 0.001, 0.01$ ve 0.05) göre kontrol edilmiştir. Ortaya çıkan

önemli farklılıklar Duncan testi ile %5 hata sınırı esas alınarak saptanmış ve farklılıklar harfler yardımıyla belirlenmiştir. Analizlerde yüzde oranların açığı değeri karşılıkları kullanılmıştır.

Tuzluluk stresi denemeleri 2 kez yinelenmiştir.

3.2.3 Gen ifade analizleri

Tuzluluk stresi denemeleri sonucunda tüm genotiplerde tuzluluk stresinin belirlendiği 225 mM NaCl + 22.5 mM CaCl₂.2H₂O tuz uygulaması moleküler çalışmalar için esas alınmıştır. Bu tuz konsantrasyonunu içeren besin ortamı üzerinde oluşturulan kültürlerden 0 (kontrol), 24, 48, 96 ve 192 saat sonra bitki örnekleri alınarak çalışmalarda kullanılmıştır.

Projede gen ifadesine esas moleküler yaklaşım genel olarak aşağıdaki aşamalarda gerçekleştirilmiştir:

- Yaprak örneklerinden total RNA izolasyonu,
- RNA'dan cDNA (Komplementer DNA) sentezlenmesi,
- Dehidrin genine yönelik cDNA sentez primerleri oluşturulması,
- Dizayn edilen primerler kullanarak cDNA'dan, ilgili gen bölgesinin çoğaltılması,
- Gen bölgesinin tA klonlama sistemi kullanılarak vektöre (plasmit) klonlanması,
- Vektörün (plasmit) hücreye (*Esheria coli*) transformasyonu, hücrelerin büyütülmesi, mavi/beyaz koloni seçimleri, gliserol stoklarının oluşturulması,
- Vektör (plasmit) içerisindeki gen bölgelerinin çoğaltımı (TempliPhi Amplifikasyonu),
- Vektör (plasmit) içerisindeki gen bölgelerin dizi analizi,
- Dizilerden real time PCR problemlerinin oluşturulması, gen ifadesi tespiti ve analizleri.

Yaprak örneklerinden CTAB (Hekzadesil Trimetil-Amonyum Bromür) metodu ile RNA izolasyonu: Çalışmada genotiplerin RNA izolasyonu Gambino vd. (2008)

yöntemine göre yapılmıştır. RNA kalite ve miktar ölçümleri %1'lik jel ve Nanodrop ND-1000 spektrofotometre kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Gambino vd. 2008).

RNA izolasyonunun aşamaları:

1. 2 ml'lik bir tüpe 882 µl ekstraksiyon buffer (Çizelge 3.2) ve 18 µl β-merkaptoethanolün ilave edilmiş ve su banyosunda +65 °C'de ısıtılmış,
2. Tüpe 150 mg sıvı azotta ezilmiş bitki örneği ilave edilmiş,
3. Örnekler +65 °C'de 10 dakika bekletilmiş,
4. Tüp içindeki mevcut sıvı ile aynı miktarda kloroform:isoamil alkol (24:1 v/v) tüpe eklenmiş ve karıştırılmış,
5. Tüp kapsamı +4 °C 11000 g'da 10 dakika süreyle santrifüj edilmiş,
6. Süpernatant yeni tüpe aktarılmış ve son karışımdaki (supernatant + LiCl) LiCl (lityum klorür) konsantrasyonu 3 M olacak şekilde üzerine yeterli miktarda LiCl eklenmiş,
7. Karışım 30 dakika buz içinde bekletilmiş,
8. Daha sonra 20 dakika 21000 g'da santrifüj edilmiş,
9. Tüpün üstündeki sıvı boşaltılmış ve pelet, 500 µl'de SSTE (Sodium sulfate-Tris-HCl-EDTA) bufferda (Çizelge 3.3) +65 °C'deki su banyosunda çözülmüş,
10. Üzerine 500 µl kloroform:isoamil alkol (24: 1 v/v) eklenmiş ve +4 °C 11000 g'da 10 dakika süreyle santrifüj edilmiş,
11. Süpernatant yeni tüpe aktarılmış ve üzerine buzdolabı sıcaklığındaki isopropanol eklenmiş,
12. +4 °C 21000 g'da 15 dakika süreyle santrifüj edilmiş,
13. Pelet %70 etil alkol ile yıkanıp, kurutulmuş,
14. RNA peleti, DEPC (Diethylpyrocarbonate) ilave edilmiş suda (50 µl) çözülmüştür.

Çizelge 3.2 RNA ekstraksiyon buffer

İçerik	Miktar
CTAB	%2
PVP-40	%2.5
NaCl	2 M
Tris-HCl pH 8.0	100 mM
EDTA pH 8.0	25 mM
β-mercaptoethanol	%2

Çizelge 3.3 SSTE buffer

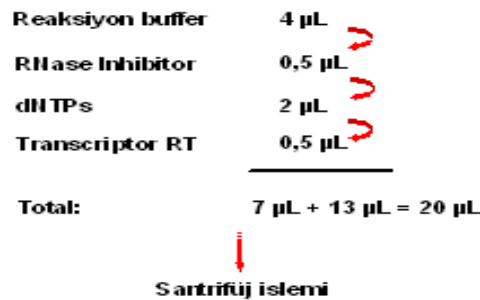
İçerik	Miktar
Tris-HCl pH 8.0	10 mM
EDTA pH 8.0	10 mM
SDS (Sodium dodecyl sulfate)	% 1
NaCl	1 M

Elde edilen RNA'lar %1'lik agaroz jelde görsel olarak kontrol edilmiş, miktar ve saflık tayinleri ise Nanodrop ND-1000 spektrofotometre aletinde belirlenmiştir.

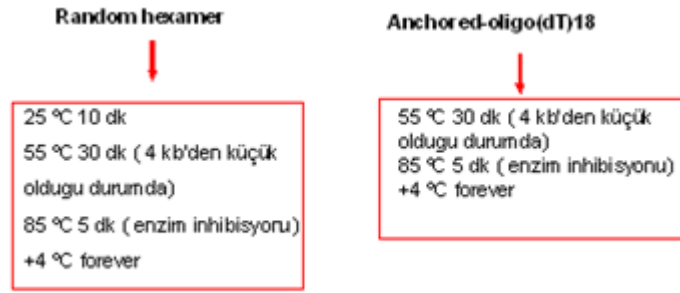
RNA'dan cDNA sentezlenmesi: Real time PCR'ın ilk aşaması olarak, örneklerle ait cDNA sentezi yapılmıştır. cDNA sentezi için First Strand cDNA Sentez Kiti (Roche, Cat No: 04897030001) kullanılmıştır. Bu aşamada farklı cDNA sentez primerleri olan RandomHexamer Primer ve Anchored-oligo(dT)₁₈ ayrı ayrı denenmiştir. cDNA sentezi aşağıda açıklandığı şekilde gerçekleştirilmiştir.



RNA miktarı artırıldığında hacim su ile ayarlanmıştır.



RT-PCR protokolü kullanılan primere göre aşağıdaki şekilde farklılaşmıştır.



Dehidrin genine yönelik cDNA sentez primerleri oluşturulması: Primer 3 programı kullanılarak 3 ayrı lokus bölgesine göre primerler oluşturulmuştur (Anonymous 2009).

FJ468294 Lokusu: LOCUS FJ468294 792 bp mRNA linear PLN 16-DEC-2008

DEFINITION *Pyrus pyrifolia* dehidrin mRNA, complete cds.

1 atcaaaacac ttcataaaa tcaaatatca gttcagaatg gcgaattatc agactaaata
61 tggtagaacg cccaagaca tagatgagta tgggaaccg attcaacagg gtactaccgg
121 aggcttagt ggtgccacca ctgtactgc gtacggggca acaggagggc agcaacaaca
181 agagagaggt actggcatga ctggaagtgg ttacgggact actgatgccc cgtacacagg
241 agggcagcaa caacaagagc gagggatgat ggacaagatc aaggaaaaga ttccaggaac
301 tgggtgtgga ctaggggatg acgacccta ctcacgaat gccagaccg gtactgggat
361 gactggaact ggttacggtg ctactgacgc cccgtacact ggaggggagt acgaagaaag
421 ggggatgatg gacaaggatc aggacaagat gccggggact gggcagaggg atgaaacca
481 ctcactcag acgaccacca ccacacctta cgggtggcacc accggagagc accaggaaaa
541 gaagggcgcc atggacaaaa tcaagaaaa gcttctgga tatgccatt aaatatat
601 acgtgtcgt gcgcatatgt attctagggt ctttgatgt gctaataacc ggtgcttgg
661 gtgattgtg gaacgaatt tcttcttac gtgcgcgagc gagcactccg cagggtcagt
721 gtgtgtttg taatcggtac cttgtggtt tatcaataga gcgatagat tctggttct
781 gtaaaaaaaaa aa

FJ468294 için oluşturulan primerler:

PPDhydF1: atggcgaattatcagactaa

PPDhydR1: ttaatggcgatatccaggaag

PPDhydF2: atggcgaattatcagactaaatgg

PPDhydR2: ttaatggcgatatccaggaagcttt

AF386513 Lokusu: LOCUS AF386513 604 bp mRNA linear PLN 21-JAN-2002
DEFINITION *Pyrus communis* putative desiccation protectant protein (LEA14) mRNA,
complete cds. VERSION AF386513.1 GI:18252326

1 tgaaatctct cttggattcg atcaaaaatc tttcattttt tgggttagg tttgcgtttg
61 aaaaatggcc gagcaagggt tcatggataa ggccaagaac tttgtcacag ataagatatac
121 aaatgtggcg aaaccagaag cagaagtcac agatgttgat tcaagaaga tgggcttgag
181 ccatgtggag tacctttcca aggtgtccgt gaccaatccc tacagccatt ccatcccat
241 ttgtgatac aaatacacc tcaaaagcgt taacaggagg attgcatcgg ggactatacc
301 ggacctgga tcaactaaagg caagtgcac aactgtgctg gaggtgctat tgaaggtgcc
361 acatagcata ttgtgacat tggcaaagga tctgggtgca gattgggact ttgactatga
421 gttggacata ggcctcacta ttgacctcc tgatcatcgg aactcacca caccactcaa
481 caagaaggga gagtcaage ttcccacct ctctaatca ccatgtcttt tcagatgcag
541 tttctttgc tattttgat tttgtgttt gttgatata gtataacttc attatggaat
601 ggat

AF386513 için oluşturulan primerler:

PCDhydF1: atggccgagcaaggttcatggata

PCDhydR1: ttagaagagggtgggaagctga

DQ660905 Lokusu: LOCUS DQ660905 993 bp mRNA linear PLN 01-JAN-2007
DEFINITION *Malus x domestica* dehydrin mRNA, complete cds. VERSION
DQ660905.1 GI:110238586.

1 acatcatccc aaacaaatca taagtattgt cactgaagtt ttattagtcg caacttcgca
61 aggcattggt attacagttt cattgtttg ttatctttt gaaatatgtc gaattatggt
121 aatacaacag cggaaaaaac taccgatgag tacgggaacc caacttaca cggtagcgca
181 ggagccgata ggaccgacga gttcgggaac gcggttcaac acggtcggac taataccggc
241 tacgggactg ctgaccta gactcgtgat gaagggattg ttggcatca tggcggcccc
301 getgtgettc agcgcctcagg aagctctagc tctcgtctg aagatgatgg gctaggtggg
361 agaaggaaga agggactgaa agagaagata aaggagaagc taccaggtgg tggtacaag
421 gatgaccagt actctggtgg aacgcagacc actaccctt acggtggtgg gacgacttac
481 aaggtaggag agcaacgcca ggagaagcta ccaggtggtg gtaacaagga tgaccagtac
541 tctggtggaa cgcagaccac tacccttac ggggtggtgg cgacttaca agtaggcgag

601 caacaccagg agaagggtac gacggacaag atcaaggaga agctgccagg tgggaatagg
661 gatgaccagt attctcatga cacgtcaact actgctgcag cttatggtgg gactgggcgc
721 accggagagc cccaggaaaa gaagaacatg atggacaaga tcaaagaaaa gcttctggt
781 ggccacgccg agtagataat catcccgttt cacataacta taagtaaag ccagtctgta
841 taataaaaga gtgtctggtc ggacctcggg tgcgtgatcc gtgcgtgggt gatccaccgt
901 tgcgcactgt tgttttggtt tctgttatgt gtaattttgt gtgctgttcc ctttgatta
961 atagtatatt tgttttggtt aaaaaaaaaaaa aaa

DQ660905 için oluşturulan primerler:

MDDhydrF1: atgtcgaattatgtaataacaacagc

MDDhydrR1: ctactcggcgtggccaccaggaa

Oligodt yöntemi ile elde edilen cDNA'lerin PCR'i: Çalışmada Ahlat 3, Ankara armudu ve Quince A genotiplerin RNA'larından elde edilen cDNA'larında, MDDhydr, PCDhyd1, PPDhyd1 ve PPDhyd2 primerleri ile PCR yapılmıştır. PCR ürünleri %2 agaroz jelde 60 dakika ladder ile beraber yürütülmüş ve primerden elde edilen bantlar genelde 400–500 bp (baz çifti) büyüklüğünde bulunmuştur. Daha sonra agaroz jelde istenilen bantlar kesilerek temizlenmiştir. Bu amaçla kullanılan PCR koşulları aşağıda verilmiştir.

PCR koşulları:

Buffer	5 µl
Primer (İleri)	2 µl
Primer (Ters)	2 µl
dNTP	1.5 µl
MgCl ₂	1.5 µl
Taq Polimeraz	0.75 µl
Kalıp cDNA	3 µl

PCR programı:

94 °C	3 dakika	
94 °C	1 dakika	
65 °C	1 dakika	
72 °C	2 dakika	—————> 34 döngü
72 °C	10 dakika	
4 °C	Sürekli	

olarak uygulanmıştır.

PCR ürünlerinin temizlenmesi (Wizard SV Gel ve PCR Clean-up Sistemi): PCR

ürünlerinin bantlarının temizlenmesi amacı ile “Wizard SV Gel ve Clean-up Sistemi” kullanılmış, protokol aşağıda belirtildiği şekilde uygulanmıştır:

1. 25 µl PCR ürünü %2 agaroz jelde 60-90 dakika süreyle yürütülmüş,
2. UV ışını altında istenilen bölge kesilip, ağırlıkları ölçülmüş,
3. Üzerine 1:1 oranında (ağırlık : hacim) membran binding solüsyonu eklenmiş ve 65 °C’de eritilmiş,
4. Klonlar temiz tüpe takılmış ve üzerlerine örnekler yüklenip 1 dakika ekletilmiş,
5. 14000 rpm’de, oda sıcaklığında 1 dakika santrifüj edilmiş,
6. Alt solüsyon uzaklaştırılmış ve klonlara 700 µl membran wash solüsyonu eklenmiş,
7. 14000 rpm’de, oda sıcaklığında 1 dakika santrifüj yapılmış, alt solüsyonu uzaklaştırılmıştır.
8. Membran wash solüsyonundan 500 µl eklenmiş ve 14000 rpm’de, oda sıcaklığında 5 dakika santrifüj yapılmış,
9. Klonlar temiz tüplere takılmış ve membrana değmeyecek şekilde klonun ortasına 25 µl nuclease free su eklenip, 1 dakika bekletilmiş,
10. 14000 rpm’de, oda sıcaklığında 1 dakika santrifüj yapılmış,
11. Klonlar atılıp, tüplerin kapakları kapatılmış ve +4 °C saklanmıştır.
12. cDNA’ların miktar ve saflığı Nanodrop Spektrofotometrede ölçülmüştür.
13. Temizlenen PCR ürünlerinin klonlanması aşamasına geçilmiştir.

PCR ürünlerinin klonlanması:

Ligasyon (PCR ürünlerinin pGEM-T Easy vektörüne klonlaması): PCR ürünlerinin ligasyonu için T/A klonlama vektörü olan pGEMT-Easy kullanılmıştır. Enzim, PCR ürünlerinin serbest 3 üstüne deoxyadenosin 5 phosphate'ı eklemekte, pGEM vektörünün 3 üstüne bağlanmasını sağlamaktadır. Ligasyonda ilk başta PCR ürünleri iki farklı oranda (1 ve 6.3 µl) kullanılmıştır ve denemelerde 6.3 µl PCR ürününden başarıyla sonuç alınmıştır. Ligasyon reaksiyonu Çizelge 3.4'de verilen şekillerde uygulanmıştır.

Çizelge 3.4 Ligasyon koşulları

İçerik	Ahlat-3, Ankara armudu ve QA	Pozitif Kontrol	Negatif Kontrol
PGEM (pGEM T Easy Vektör)	0.5 µl	1 µl	1 µl
PCR Ürünü	6.3 µl	-	-
T4 DNA (T4 DNA Ligase)	0.7 µl	1 µl	1 µl
2 X buffer	7.5 µl	5 µl	5 µl
Pozitif kontrol	-	2 µl	-
Su	-	1 µl	3 µl
Toplam Hacim	15 µl	10 µl	10 µl

Toplam reaksiyon 15 µl'e tamamlanacak şekilde distile su eklenerek ligasyon koşulları +4 °C'de 16 saat olarak belirlenmiştir.

Transformasyon: Bu aşamada *E. coli* (competent) suşuna ligasyon ürünü (plasmit) aktarılmış ve bunun için bakteri besi yeri ortamları aşağıda belirtildiği şekilde hazırlanmıştır.

1. 1 litre LB Agar için:

- 10 g NaCl
- 10 g Trypton
- 5 g Yeast Extract

1 litreye saf su ile tamamlanıp, pH=7 ayarlanmış, 20 g agar eklenerek 121 °C 25 dakika otoklavlanmış ve daha sonra 25'er ml olarak 100 ml'lik petrilere dağıtılmıştır.

2. 1 litre NZY⁺ Broth için:

- 10 g NZ Amine
- 5 g Yeast Extract
- 5 g NaCl

1 litreye saf su ile tamamlanıp, pH=7.5 ayarlanmış, 20 g agar eklenerek 121 °C 25 dakika otoklavlanmıştır.

3. 0.5 litre Terrific Broth için:

23.8 g Terrific Broth

300 ml saf su

4 ml glyserol

121 °C 25 dakika otoklavlanmıştır.

4. 1 litre XGAL için:

80 g XGAL + 2 ml DMF karışımı 0.2 µm filtre ile filtre edilmiştir.

5. 1 litre IPTG 1 litre için:

4.76 g IPTG + 20 ml saf su karışımı 0.2 µm filtre ile filtre edilmiştir.

6. 1 litre Ampicilline için:

100 mg Ampicilline + 10 ml saf su, 0.2 µm filtre ile filtre edilmiştir.

Ortamlar hazırlandıktan sonra transformasyon aşağıdaki protokole göre gerçekleştirilmiştir:

1. 50 ml'lik falkonlar önce buz içerisinde soğutulmuş ve daha sonra içerisine 10 ml NZY⁺, 125 µl MgCl₂, 125 µl 1 M MgSO₄ ve 200 µl %20 glukoz eklenip, +42 °C su banyosunda tutulmuştur,

2. *E. coli* kompotent hücre buz üzerinde eritilmiş ve bundan bir tüp içine 50 µl alınmıştır,

3. Üzerine 2 µl mercaptoethanol eklenmiş,

4. Karışım 10 dakika buzda tutulmuş,

5. Üzerine ligasyon ürünüden 2 µl eklenmiş ve 30 dakika buz üzerinde bekletilmiş,

6. +42 °C'de su banyosunda 30 saniye tutulmuş ve 2 dakika buz üzerinde tutulmuştur.

7. Su banyosunda ısıtılmış NZY⁺'dan 450 µl eklenip, +37 °C 225 rpm'de 60 dakika çalkalanmıştır.

8. Petrilere 70 µl NZY⁺ ile 10 µl ligasyon *E. coli* karışımı eklenip, petrilere dağıtılmıştır.

9. +37 °C'de 16-18 saat inkübasyona bırakılmıştır.

10. Daha sonra mavi hücrelerin belirginleşmesi için 2 gün +4 °C'de bekletilmiştir.

Tek hücre koloni ve gliserol stoklarının oluşturulması: Bu aşamada;

1. 18 ml TB (Terrific Broth) ve Ampicilline (50mg/ml) küvette karıştırılmış ve 150 µl platelere dağıtılmıştır.
2. Otoklavlanmış kürdanların, rekombinat hücrelerin (beyaz) ortasına sokulmasıyla bulaştırılmasından sonra bu kürdanlar platelere yerleştirilmiş,
3. Kürdanlar içerisinde TB bulunan platelerde 3-4 dakika tutulduktan sonra birbirine değmeyecek şekilde uzaklaştırılmıştır.
4. Plateler, üzerleri kapatıldıktan sonra +37 °C'de 300 rpm'de 16-18 saat inkübasyona bırakılmıştır.
5. İnkübasyonun sonunda plateler içindeki örneklerin üzerlerine %75'lik gliserolden 50'şer µl eklenmiş, vorteks yapıp, -80 °C'de derin dondurucuda muhafaza edilmiştir.

TempliPhi ampifikasyon kiti ile plazmitlerin çoğaltılması: Bu aşamada;

1. Gliserol örnek stokları -80 °C'den çıkartılmış, eritildikten sonra 1/50 oranında sulandırılmış ve bir plate içine aktarılmış,
2. 5 µl denatüre buffer eklenmiş ve hızlı devirde 1 dakika vorteks yapılmıştır.
3. Plateler +95 °C'de 3 dakika denatüre edilmiş ve 3 dakikanın sonunda hemen buz üzerine alınmıştır.
4. Plateler soğutulduktan sonra 5 µl TempliPhi premix eklenmiş ve 3 dakika vortekslenip, santrifüj edilmiştir.
5. Plateler nemli havlu kağıdına sarılarak saklama kutularına yerleştirilmiş ve 18 saat +37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır.
6. Premiksin DNA polimerazın inhibe olması için +65 °C'de 10 dakika bekletilip, buz üzerine alınmıştır.
7. Platelerin üzerine 10 µl steril su eklenmiş ve 2 dakika vortekslenmiştir.

Sekans PCR: Vektör (plasmit) içerisindeki gen bölgelerin dizi analizi için sekans PCR işlemi yapılmıştır. Bunun aşamaları:

1. Stok templiPhi 1400 devirde 2 dakika vortekslenmiş,
2. 5 µl stok templiPhi DNA'lardan örnekler alınıp (Ahlat-3, Ankara armudu Klon 19 ve QA), +94 °C'de denatüre edilmiş,

3. Örnekler hemen buz içine alınmış ve her tüp başına;
5 µl sekans premiks
2 µl T7 primeri
8 µl ddH₂O

eklenmiştir. Son hacim distile edilmiş su ile 20 µl'ye tamamlanmış ve PCR aşağıdaki programa göre yapılmıştır.

96 °C	3 dakika
96 °C	20 saniye
55 °C	20 saniye
60 °C	4 dakika, toplam 34 döngü olarak uygulanmıştır.

Sekans PCR ürünlerinin temizlenmesi: Aşağıdaki aşamalara göre yapılmıştır:

1. 20 µl sekans PCR ürünü sample plateye aktarılmış,
2. 11 µl dilute stop solüsyonu (Çizelge 3.5) eklenmiş,
3. 20 µl Agencourt Clean SEQ eklenmiş,
4. %85'lik EtOH'den 62 µl eklenmiş ve 7-8 kez pipetaj yapılmış,
5. Sample Plate, SPRIplate üzerine yerleştirilip 5 dakika bekletilmiş,
6. Alkol uzaklaştırılmış ve 100 µl %85'lik EtOH eklenmiş ve bu kez 3 dakika SPRIplate üzerinde bekletilmiş,
7. SPRIplate üzerindeyken, alkol uzaklaştırılmış ve Sample Plate ters çevrilerek, 10 dakika oda koşullarında kurutulmuş,
8. Üzerine 40 µl SLS (Sample Loading Solusyonu) eklenmiş ve pipetajla çözülmüş,
9. Çözülen örnekler Beckman Sample Plateye aktarılmıştır ve üzerlerine birer damla mineral yağ eklenmiş,
10. Beckman Buffer Platenin 3/4'ü dolacak şekilde buffer ilave edilmiş ve cihaza yüklenmiştir.

Çizelge 3.5 Dilute stop solüsyonu

İçerik	Miktar
ddH ₂ O	50 µl
3 M Sodium Acetate pH=5,2	20 µl
100 mM Na ₂ -EDTA pH=8,0	20 µl
20 mg/ml Glycogen	10 µl

Dizi analizi işlemi Beckman CEQ 8000 otomatik dizi analizi sisteminde gerçekleştirilmiştir. Sekans sonucu elde edilen diziler blast yöntemi ile gen bankasındaki genlerle karşılaştırılarak, dehidrinler ile benzerlik gösterip göstermediği tespit edilmiştir (Anonymous 2012).

Dizilerden real time PCR problemlerinin oluşturulması, gen ifadesinin tespiti ve analizleri: Real time PCR analizleri temel olarak;

1. Stres uygulanmış ve kontrol bitki örneklerinden toplam RNA'ların izolasyonu,
 2. Toplam RNA'lardan cDNA'ların elde edilmesi ve
 3. cDNA'ların Real time PCR analizinde kullanılması ve genetik analizler
- olmak üzere 3 aşamada gerçekleştirilmiştir. Birinci ve 2. aşamalar önceki bölümlerde verilen yöntemler doğrultusunda uygulanmıştır. Üçüncü aşama ise gen dizilerinden oluşturulan yeni primer ve problemler kullanılarak Roche LightCycler® 480 Real-Time PCR system protokolü ve yazılımlarına (software) göre uygulanmış ve gen ifadesi düzeyleri tespit edilmiştir.

Real time PCR reaksiyonları hazırlanırken, standart eğrilerin çizilebilmesi amacıyla uygulanan strese göre kontrol cDNA'lardan 6 logaritmik konsantrasyon 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000 ve 1/100000 oranlarında seri dilüsyonlar ile hazırlanmıştır. Ölçümlerin değerlendirilmesi aşamasında real time PCR aletine ait analiz programı ile her bir primer için ayrı ayrı standart eğriler çizilmiştir. İyi bir standart eğri grafiği çizilebilmesi için en az 1 logaritmik konsantrasyonun eğri üzerinden geçmesi ve etkinlik (efficiency) değerinin 1.7 ile 2 arasında, Slope değerinin ise -3.3'e yakın olmasına dikkat edilmiştir. Etkinlik değeri 2'ye yaklaştıkça standart eğri grafiğinin güvenilirliği de artmıştır.

Dhn geni ifade seviyelerine ilişkin bu sonuçlar $2^{-\Delta\Delta CT}$ metoduyla (Livak ve Schmittgen 2001), aktin genine göre normalize edilerek elde edilmiştir. Relatif ekspresyon seviyesindeki değişiklikler (REL) one way ANOVA (tek yönlü ANOVA) testine göre istatistiki olarak değerlendirilmiştir. Dunnet testinde de $P < 0.05$ olan değerler istatistiki olarak önemli kabul edilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1 Tuzluluk Stresine Karşı *Pyrus spp.* ve *Cydonia oblonga* Genotiplerinin *in Vitro* Koşullarda Sürgün Gelişim Performansları

In vitro tuzluluk stresi denemelerinde sürgünlerde canlılık oranı, ortalama sürgün sayısı ve ortalama sürgün uzunluğu özelliklerinde “genotip x uygulama” arasındaki interaksiyon; kallus çapı, sürgün zararlanma düzeyi ve ortalama yaş ağırlık özelliklerinde “genotipler” ve “uygulamalar” arasındaki farklılıklar; ortalama sürgün kalınlığında sadece “uygulamalar” arasındaki farklılıklar istatistiksel bakımdan önemli bulunmuştur (Çizelge 4.1-4.2).

4.1.1 Canlılık oranı

Bu çalışmada Ankara armudu (Klon 19), QA ve Ahlat-3 genotiplerinde tüm tuz seviyelerinde sürgünlerin canlılık oranı yüksek değerlerde olmuştur. Bu genotiplerde %80.50 ile %100.0 arasında değişen canlılık oranı değerleri arasındaki farklılık istatistiksel anlamda önemli bulunmamıştır. OHxF 333 genotipinde sadece 300 mM NaCl + 30 mM CaCl₂.2H₂O uygulamasında canlılık oranı diğer tuz seviyelerinden önemli düzeyde daha düşük (%77.66) bulunmuştur. Ahlat-1 ve Ahlat-2 genotipleri ise tuz stresinden en fazla etkilenen genotipler olmuştur. Bu genotiplerden Ahlat-1, 150 mM NaCl + 15 mM CaCl₂.2H₂O uygulamasından itibaren sürgünlerinin canlılığını önemli düzeyde kaybetmiştir. Ahlat-2'nin ise tüm tuz seviyelerinde sürgünlerinin canlılık oranı kontrole göre önemli düzeyde düşük olmuştur. Çalışmada sürgünlerin canlılık oranı bakımından önemli düzeyde en düşük değerler Ahlat-2 genotipinde 150 mM NaCl + 15 mM CaCl₂.2H₂O (3), 225 mM NaCl + 22.5 mM CaCl₂.2H₂O (4) ve 300 mM NaCl + 30 mM CaCl₂.2H₂O (5) uygulamalarında sırasıyla %41.50, %35.83 ve %29.60 olarak kaydedilmiştir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1 *Pyrus* spp. ve *Cydonia oblonga* Mill. genotiplerinde *in vitro* koşullarda tuz stresi uygulamalarının mikro sürgünler üzerine etkisi

Genotip	Uygulama*	Canlılık Oranı (%)	Ortalama Sürgün Sayısı (adet/eksplant)	Ortalama Sürgün Uzunluğu (mm)	Ortalama Sürgün Kalınlık Düzeyi (1-3)**	Kallus Çapı (mm)	Sürgünlerde Zararlanma Düzeyi (Kuruma) (0-4)***	Ortalama Yaş Ağırlık (g/eksplant)
Ankara Armudu (Klon 19)	1	100.0±0.0 a****	4.63±0.77 c	14.93±1.00 defghij	2.13±0.13	4.62±0.71	0.0±0.0	0.35±0.06
	2	100.0±0.0 a	2.52±0.29 d	16.05±0.44 cdef	1.86±0.10	2.53±0.52	0.27±0.21	0.23±0.02
	3	94.50±5.50 ab	1.40±0.11 d	16.26±1.17 cdef	1.61±0.17	1.88±0.41	0.91±0.41	0.16±0.01
	4	94.50±5.50 ab	1.16±0.06 d	16.13±0.38 cdef	1.38±0.15	1.19±0.44	1.75±0.32	0.10±0.01
	5	80.50±12.52 abcd	1.00±0.00 d	20.36±1.32 ab	1.47±0.19	0.61±0.39	2.63±0.29	0.11±0.02
OHxF 333	1	100.0±0.0 a	5.11±0.60 bc	18.15±1.55 abcd	2.41±0.16	2.73±0.40	0.0±0.0	0.29±0.03
	2	100.0±0.0 a	1.63±0.10 d	17.16±0.89 bcde	1.77±0.07	0.65±0.21	0.08±0.05	0.10±0.01
	3	100.0±0.0 a	1.77±0.15 d	14.64±1.56 defghijk	1.57±0.11	0.46±0.21	0.80±0.17	0.10±0.01
	4	94.33±3.58 ab	1.49±0.09 d	15.39±1.31 defghi	1.33±0.10	0.15±0.11	1.38±0.30	0.07±0.01
	5	77.66±11.95 bcde	1.36±0.16 d	16.67±0.95 cdef	1.20±0.10	0.00±0.00	2.06±0.23	0.05±0.01
QA	1	100.0±0.0 a	8.47±1.71a	11.31±0.74 jkl	2.25±0.13	4.13±0.45	0.0±0.0	0.51±0.09
	2	97.16±2.83ab	2.43±0.22 d	11.07±0.76 kl	1.90±0.16	1.47±0.52	0.50±0.28	0.28±0.04
	3	91.71±5.64ab	1.50±0.20 d	13.41±1.34 efghijkl	1.78±0.09	0.72±0.42	1.01±0.46	0.11±0.02
	4	91.60±5.71ab	1.69±0.18 d	11.83±0.84 hijkl	1.47±0.21	0.76±0.34	1.44±0.65	0.09±0.02
	5	91.50±3.80 ab	1.15±0.05 d	14.45±0.85 defghijk	1.38±0.18	0.34±0.28	2.06±0.77	0.05±0.01

* **1:** Kontrol; **2:** 75 mM NaCl + 7.5 mM CaCl₂.2H₂O; **3:** 150 mM NaCl + 15mM CaCl₂.2H₂O ; **4:** 225 mM NaCl + 22.5 mM CaCl₂.2H₂O; **5:** 300 mM NaCl + 30 mM CaCl₂.2H₂O

** Kalınlık düzeyi (1-3) (1=ince, 2=orta ve 3=kalın).

*** Zararlanma düzeyi (0-4) (0= zararlanma yok, 1=az, 2=orta, 3=çok, 4=şiddetli).

**** Farklı harfler Duncan testine göre istatistiksel bakımdan önemli farklılıkları göstermektedir.

Çizelge 4.1 *Pyrus* spp. ve *Cydonia oblonga* Mill. genotiplerinde *in vitro* koşullarda tuz stresi uygulamalarının mikro sürgünler üzerine etkisi (devam)

Genotip	Uygulama *	Canlılık Oranı (%)	Ortalama Sürgün Sayısı (adet/eksplant)	Ortalama Sürgün Uzunluğu (mm)	Ortalama Sürgün Kalınlık Düzeyi (1-3)**	Kallus Çapı (mm)	Sürgünlerde Zararlanma Düzeyi (Kuruma) (0-4)***	Ortalama Yaş Ağırlık (g/eksplant)
Ahlat-1	1	100.00±0.00 a	6.55±1.44 b	9.86±0.70 l	2.18±0.09	3.54±0.99	0.00±0.00	0.33±0.06
	2	80.50±5.04 abcd	1.70±0.10 d	11.79±0.52hijkl	2.05±0.27	1.36±0.62	1.13±0.42	0.18±0.02
	3	61.00±8.22 e	1.36±0.08 d	12.28±1.10 ghijkl	1.31±0.17	1.11±0.52	1.62±0.62	0.10±0.01
	4	44.33±5.66 f	1.00±0.00 d	18.24±1.08 abcd	1.61±0.27	1.25±0.56	1.95±0.87	0.09±0.01
	5	64.00±7.96 de	1.02±0.02 d	15.53±0.73 defgh	1.52±0.23	0.95±0.44	3.33±0.66	0.05±0.008
Ahlat-2	1	94.33±3.58 ab	5.66±0.85 bc	11.74±0.89 ijkl	2.45±0.18	4.43±0.78	0.0±0.0	0.42±0.05
	2	69.16±10.94 cde	1.31±0.11 d	14.60±1.27 defghijk	1.70±0.13	1.30±0.60	1.75±0.56	0.18±0.02
	3	41.50±7.27f	1.29±0.18 d	15.81±2.41 cdefg	1.44±0.15	1.09±0.51	1.38±0.62	0.09±0.006
	4	35.83±5.22 f	1.13±0.09 d	20.67±1.85 a	1.41±0.20	0.50±0.22	2.25±0.81	0.07±0.006
	5	29.60±9.91f	1.00±0.00 d	19.25±1.01 abc	1.50±0.22	0.20±0.02	3.80±0.20	0.05±0.0005
Ahlat-3	1	100.0±0.0 a	4.36±0.86 c	13.11±0.62 fghijkl	2.13±0.15	4.59±0.74	0.0±0.0	0.43±0.07
	2	91.66±5.66 ab	1.38±0.11 d	14.88±0.60 defghij	1.88±0.07	1.41±0.32	2.13±0.39	0.24±0.04
	3	86.16±6.63 abc	1.30±0.17 d	15.45±0.54 defghi	1.86±0.15	0.95±0.37	2.88±2.88	0.18±0.03
	4	97.16±2.83 ab	1.08±0.08 d	15.23±1.06 defghi	2.03±0.15	0.95±0.40	2.80±0.49	0.18±0.03
	5	97.16±2.83 ab	1.05±0.05 d	16.57±0.88 cdef	1.70±0.14	0.58±0.30	2.95±0.49	0.13±0.008
P		0.000***	0.03*	0.000***	-	-	-	-

* 1: Kontrol; 2: 75 mM NaCl + 7.5 mM CaCl₂.2H₂O; 3: 150 mM NaCl + 15mM CaCl₂.2H₂O ; 4: 225 mM NaCl + 22.5 mM CaCl₂.2H₂O; 5: 300 mM NaCl + 30 mM CaCl₂.2H₂O

** Kalınlık düzeyi (1-3) (1=ince, 2=orta ve 3=kalm).

*** Zararlanma düzeyi (0-4) (0= zararlanma yok, 1=az, 2=orta, 3=çok, 4=şiddetli).

**** Farklı harfler Duncan testine göre istatistiksel bakımdan önemli farklılıkları göstermektedir.

Çizelge 4.2 *Pyrus* spp. ve *Cydonia oblonga* Mill. genotiplerinde *in vitro* koşullarda farklı tuz stresi uygulamalarının mikro sürgünler üzerine ortalama etkisi

Uygulama*	Canlılık Oranı (%)	Ortalama Sürgün Sayısı (adet/eksplant)	Ortalama Sürgün Uzunluğu (mm)	Ortalama Sürgün Kalınlık Düzeyi (1-3)**	Kallus Çapı (mm)	Sürgünlerde Zararlanma Düzeyi (Kuruma) (0-4)***	Ortalama Yaş Ağırlık (g/eksplant)
1	99.05±0.65	5.80±0.48	13.18±0.58	2.26±0.06 a****	4.01±0.29 a	0.00±0.00 a	0.39±0.03 a
2	89.75±2.84	1.83±0.10	14.26±0.47	1.86±0.06 b	1.46±0.21 b	0.98±0.18 b	0.20±0.01b
3	79.14±4.23	1.44±0.06	14.64±0.60	1.59±0.06 c	1.04±0.18 c	1.44±0.21bc	0.12±0.01c
4	76.29±4.73	1.26±0.05	16.25±0.64	1.54±0.08 c	0.80±0.16 c	1.93±0.24 c	0.10±0.01cd
5	74.65±4.96	1.10±0.03	17.08±0.51	1.46±0.07 c	0.46±0.13 c	2.78±0.21 d	0.08±0.01d
P	-	-	-	0.000 ***	0.000 ***	0.000 ***	0.000 ***

* **1:** Kontrol; **2:** 75 mM NaCl + 7.5 mM CaCl₂.2H₂O; **3:** 150 mM NaCl + 15mM CaCl₂.2H₂O ; **4:** 225 mM NaCl + 22.5 mM CaCl₂.2H₂O; **5:** 300 mM NaCl + 30 mM CaCl₂.2H₂O

** Kalınlık düzeyi (1-3) (1=ince, 2=orta ve 3=kalın).

*** Zararlanma düzeyi (0-4) (0= zararlanma yok, 1=az, 2=orta, 3=çok, 4=şiddetli).

**** Farklı harfler Duncan testine göre istatistiksel bakımdan önemli farklılıkları göstermektedir.

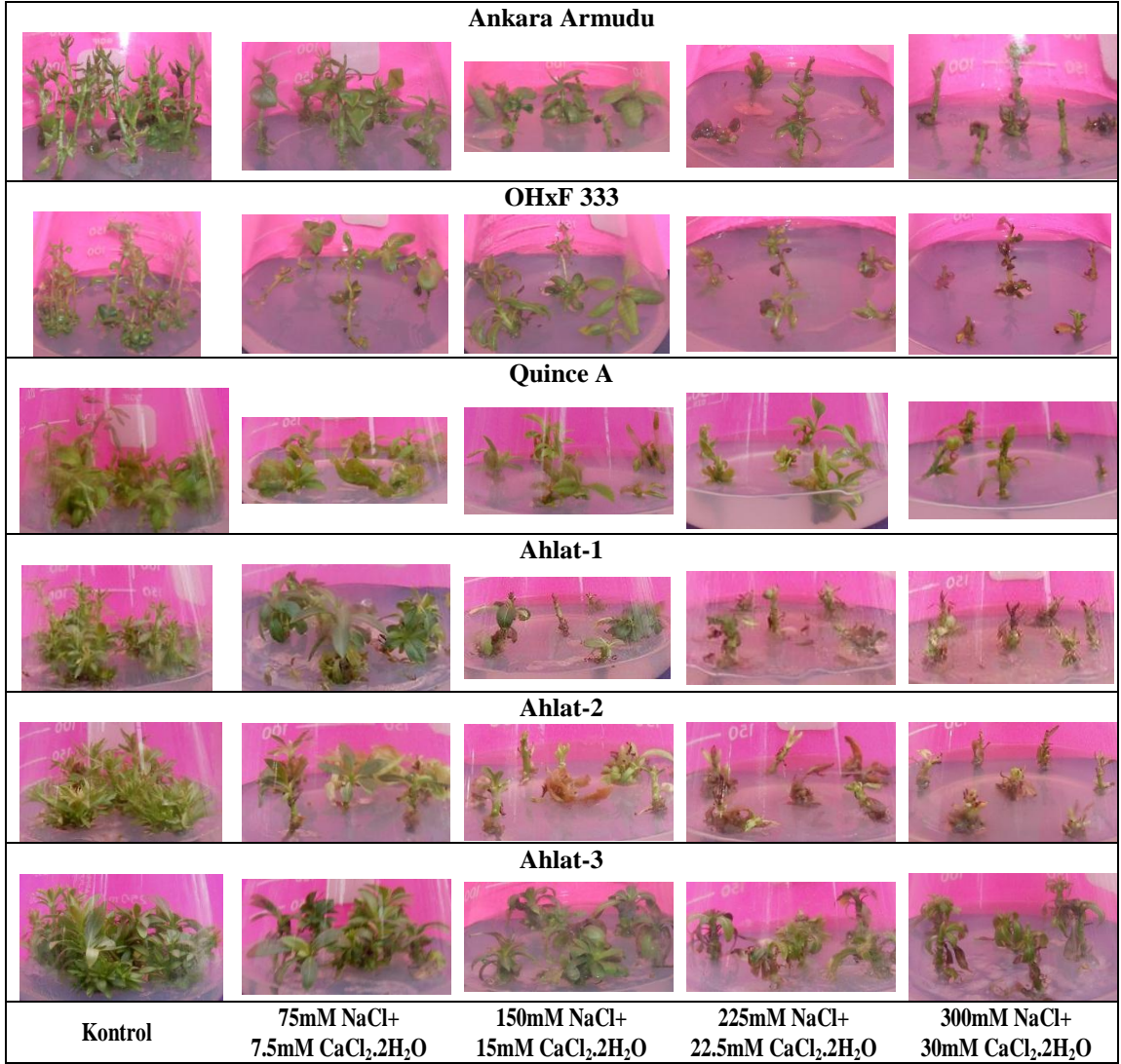
Çizelge 4.3 *Pyrus* spp. ve *Cydonia oblonga* Mill. genotiplerinde *in vitro* koşullarda tuz stresi uygulamalarının mikro sürgünler üzerine ortalama etkisi

Genotip	Canlılık Oranı (%)	Ortalama Sürgün Sayısı (adet/eksplant)	Ortalama Sürgün Uzunluğu (mm)	Ortalama Sürgün Kalınlık Düzeyi (1-3)**	Kallus Çapı (mm)	Sürgünlerde Zararlanma Düzeyi (Kuruma) (0-4)**	Ortalama Yaş Ağırlık (g/eksplant)
Ankara Armudu	93.90±3.04	2.14±0.29	16.75±0.52	1.69±0.08	2.17±0.33 a***	1.11±0.21 abc	0.19±0.02 abc
OH x F 333	94.40±2.81	2.27±0.29	16.40±0.58	1.66±0.09	0.80±0.21 c	0.86±0.16 a	0.12±0.01d
QA	94.39±1.85	3.05±0.60	12.42±0.45	1.76±0.08	1.49±0.31 b	1.01±0.25 ab	0.21±0.03 ab
Ahlat-1	69.96±4.33	2.33±0.47	13.54±0.65	1.73±0.11	1.65±0.33 ab	1.61±0.32 bc	0.15±0.02 cd
Ahlat-2	54.93±5.58	2.12±0.38	16.32±0.91	1.71±0.10	1.55±0.36 ab	1.77±0.32 cd	0.17±0.02 bcd
Ahlat-3	94.43±2.00	1.83±0.28	15.05±0.38	1.92±0.06	1.70±0.33 ab	2.15±0.26 d	0.23±0.02 a
P	-	-	-	-	0.001 ***	0.000 ***	0.000 ***

* Kalınlık düzeyi (1-3) (1=ince, 2=orta ve 3=kalın).

** Zararlanma düzeyi (0-4) (0= zararlanma yok, 1=az, 2=orta, 3=çok, 4=şiddetli).

*** Farklı harfler Duncan testine göre istatistiksel bakımdan önemli farklılıkları göstermektedir.



Şekil 4.1 Armut (Ankara armudu, OHxF 333), ahlat (Ahlat-1, Ahlat-2, Ahlat-3) ve ayva (Quince A) genotiplerinde *in vitro* koşullarda tuz stresi altında mikro sürgünlerin görünümü

4.1.2 Ortalama sürgün sayısı

Çalışmada genotiplerin tamamında tüm tuz seviyelerinde ortalama sürgün sayıları kontrole göre istatistiksel anlamda önemli düzeyde düşmüştür. Kontrolde en fazla ortalama sürgün sayısı QA genotipinde (8.47 ± 1.71 adet/eksplant) kaydedilmiş, bunu Ahlat-1 (6.55 ± 1.44 adet/eksplant), Ahlat-2 (5.66 ± 0.85 adet/eksplant) ve OHxF 333 (5.11 ± 0.60 adet/eksplant) genotipleri izlemiştir. Bununla birlikte ortalama sürgün sayısı tuz uygulamaları ile birlikte tüm genotiplerde 1.00 ± 0.00 ile 2.52 ± 0.26 adet/eksplant

arasında değişmiştir. Bu bakımdan farklı genotip x uygulama kombinasyonlarından elde edilen bulgular arasında istatistiksel anlamda bir farklılık bulunmamıştır (Çizelge 4.1).

4.1.5 Ortalama sürgün uzunluğu

Bu çalışmada “genotip x uygulama” interaksyonları değerlendirildiğinde en yüksek ortalama sürgün uzunluğu değerleri (20.67 ± 1.85 mm- 18.15 ± 1.55 mm) “Ahlat-2 genotipi x 225 mM NaCl+22.5 mM CaCl₂”, “Ahlat-2 genotipi x 300 mM NaCl+30 mM CaCl₂”, “Ankara armudu genotipi x 300 mM NaCl+30 mM CaCl₂” ve “OHxF 333 genotipi x kontrol” kombinasyonlarında belirlenmiştir. En düşük değerler (9.86 ± 0.70 mm- 13.41 ± 1.34 mm) ise Ahlat-1 genotipinde (kontrol, 75 mM NaCl+7.5 mM CaCl₂.2H₂O ve 150 mM NaCl+15 mM CaCl₂.2H₂O), QA genotipinde (kontrol, 75 mM NaCl+7.5 mM CaCl₂.2H₂O, 150 mM NaCl+15 mM CaCl₂.2H₂O ve 225 mM NaCl+22.5 mM CaCl₂.2H₂O), Ahlat-2 ve Ahlat-3 genotiplerinde kontrolde saptanmıştır. Genel olarak, genotiplerde tuz uygulamalarında kaydedilen ortalama sürgün uzunluğu değerlerinin, kontrole göre daha düşük olmadığı gözlenmiştir (Çizelge 4.1).

4.1.6 Ortalama sürgün kalınlık düzeyi

Bu çalışmada ortalama sürgün kalınlık düzeyleri, genotiplerin ortalaması olarak uygulamalara göre istatistiksel anlamda önemli farklılık göstermiştir. En yüksek değer 2.26 ± 0.06 ile kontrolde belirlenmiştir. Bunu 75 mM NaCl+7.5 mM CaCl₂ uygulaması 1.86 ± 0.06 ile izlemiştir. Diğer tuz uygulamaları (1.46 ± 0.07 - 1.59 ± 0.06) bu bakımdan aynı istatistik grup içerisinde yer almıştır. Genel olarak tuz konsantrasyonlarının yükselmesi ile birlikte ortalama sürgün kalınlık düzeyi azalmıştır (Çizelge 4.2).

4.1.5 Kallus çapı

Bu özellik bakımından genotiplerin ortalaması olarak uygulamalar ve uygulamaların ortalaması olarak genotipler arasındaki farklılıklar istatistiksel anlamda önemli olmuştur. Kalus çapında da genel olarak tuz konsantrasyonlarının yükselmesi ile birlikte bir düşüş gözlenmiştir. Kontrolde 4.01 ± 0.29 mm olan kallus çapı 75 mM NaCl+7.5 mM

CaCl₂ uygulamasında 1.46±0.21 mm olmuştur. Bununla birlikte 150 mM NaCl+15 mM CaCl₂ uygulamasından itibaren kaydedilen değerler (1.04±0.18 mm-0.46±0.13 mm) aynı istatistik grupta yer almıştır (Çizelge 4.2). Uygulamaların ortalaması olarak çalışmada en düşük kallus düzeyi (0.80±0.21 mm) OHxF 333 genotipinde kaydedilmiştir. Ankara armudu ise en iri (2.17±0.33 mm) kallusa sahip genotip olmuştur (Çizelge 4.3).

4.1.6 Sürgünlerde zararlanma düzeyi

Sürgünlerin zararlanma düzeyleri bakımından da genotiplerin ortalaması olarak uygulamalar arasındaki farklılıklar istatistiksel anlamda önemli bulunmuştur. Sürgünlerin zararlanma düzeyi tuz konsantrasyonunun artması ile birlikte önemli düzeyde yükselmiştir. En şiddetli zarar düzeyi 300 mM NaCl+30 mM CaCl₂.2H₂O uygulamasında kaydedilmiştir. 75 mM NaCl+7.5 mM CaCl₂.2H₂O uygulamasında 0.98±0.18 olan zarar düzeyi çalışmanın en yüksek dozu olan bu tuz uygulamasında 2.78±0.21'e ulaşmıştır (Çizelge 4.2). Bu çalışmada tuz uygulamalarının ortalaması olarak genotipler arasındaki farklılıklar da istatistiksel anlamda önemli bulunmuştur. Sürgünlerinin zararlanma düzeyi (0-4), 0.86±0.16 ile 1.11±0.21 arasında değişen OHxF 333, QA ve Ankara armudu, 1.44±0.21 ile 2.78±0.21 arasında değişen ahlat genotiplerine göre tuz stresinden daha az etkilenmiştir (Çizelge 4.2).

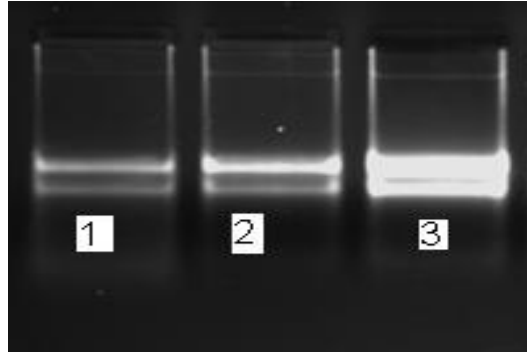
4.2.7 Ortalama yaş ağırlık

Çalışmada ortalama yaş ağırlık değerleri bakımından genotiplerin ortalaması olarak uygulamalar arasındaki farklılıklar istatistiksel anlamda önemli bulunmuştur. Tuz konsantrasyonunun artması ile birlikte ortalama yaş ağırlık önemli düzeyde düşüş göstermiştir. En düşük değerler, 300 mM NaCl+30 mM CaCl₂ ve 225 mM NaCl+22.5 mM CaCl₂.2H₂O uygulamalarından sırasıyla 0.08±0.01 ve 0.10±0.01 g/eksplant olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.2). Uygulamaların ortalaması olarak bu çalışmada istatistiksel bakımdan önemli bir farklılıkla en yüksek ortalama yaş ağırlık değerleri Ahlat-3, QA ve Ankara armudu genotiplerinde sırasıyla 0.23±0.02, 0.21±0.03 ve 0.19±0.02 g/eksplant olarak kaydedilmiştir (Çizelge 4.3).

4.3 Tuzluluk Stresi Altında *Pyrus spp.* ve *Cydonia oblonga* Genotiplerinde Mikro Sürgünlerde Dehidrin Geni İfadesi

4.2.1 İzole edilen RNA'nın miktar ve kalitesi, RNA'dan cDNA sentezlenmesi

Ahlat 3, Ankara Armudu (Klon 19) ve Quince A örneklerinden izole edilen RNA iki bant halinde, yeterli miktar ve saflıkta elde edilmiştir (Şekil 4.2-Çizelge 4.4).



Şekil 4.2 Ahlat-3, Ankara Armudu (Klon 19) ve Quince A (soldan-sağa) genotiplerinde RNA bantlarının görünümü

Çizelge 4.4 Ahlat-3, Ankara Armudu (Klon 19) ve Quince A genotiplerinde RNA'nın spektrofotometrik değerleri

Örnek	ng/µl	A260	A280	260/280	260/230
Ahlat-3 (kontrol)	301.27	7.532	3.432	2.19	2.04
Ankara Armudu (Klon 19) (192 saat)	350.91	8.773	3.972	2.21	2.25
QA (96 saat)	183.1	4.577	2.036	2.25	2.29

4.2.2 cDNA sentezi, PCR ile çoğaltılması, klonlanması ve sekansının elde edilmesi

LOKUS: AF386513.1

PRİMERLER: PCDhydF1: atggccgagcaaggttcatggata

PCDhydR1: ttagaagagggtgggaagcttga

Quince A

gtcgattgctcccggcccatggcggccgcgggaattcattttagaagaggcgtgggaagcttgaactctgcctacttg
ttgagtggatggtaaagttgccgatgacgggtaggtcaatgatgaggcctatgtccagctcatagtcgaagtccagctgca
cccagatcctttaccaatgtcaacaatatgctgtgtggaaccttcaatagcacctccagcagagttacattcacttgcccttatgga
tccggggtccggattgtcccggatgcaacttccttggttaaacgcctttgagggtgtattgatatcacagatcgggatggagt

ggctgtaaggattggtcacggatatcttggcaaggfactccacagagctcaagctaaccttcttgaatcaacatctgtgacttc
tgcttctgggttcgccatgttctctatctttctgccacgaagtcttggccttatccatgaaacctgtctggccataatcactagt
aatccggcgccgctgcacgtcgacc

NCBI/BLAST/tblastx Sonucu

Lokus	En yüksek	Toplam	Query coverage	E değeri
AF386513.1	116	1417	%87	6e-57

Ankara Armudu (Klon 19)

tgccggccgcccgaattcgattatggccgagcaaggttcatggataaggccaagaactctggcagaaaagataggaac
atggcgaagccagaagcagaagtcacagacgttgattcaagaaggtgagcttgagctctgtggagtaccttccaaggtatc
cgtgaccaatccctacagccactcgatccccatctgtgatatacaatacacctcaaaagcgttaacaggagattgcatccgg
gaccataccggaccctggatccataaaggcaagtgatgtaactgtgctggaggtgctactgaaagttccacacagcatattgt
gacattggtaaaggatctgggtgcagactgggacttcgactatgagttggcataggcctcatcattgacctaccctgcacgg
caattcaccatccactcaacaagaaggagagttcaagctcccaccctcttctaaatcactagtga

NCBI/BLAST/tblastx Sonucu

Lokus	En yüksek	Toplam	Query coverage	E değeri
AF386513.1	325	1644	%95	2e-86

Ahlat-3

tatccgtgaccaatccctacagccaactcggatccccatctgtgatatacaatacacctcaaaagcgttaacaggagattgc
atccgggaccataccggaccctggatccataaaggcaagtgatgtaactgtgctggaggtgctattgaaggtccacacagca
tattgtgacattggtaaaggatctgggtgcagactgggacttcgactatgagttggacataggcctcatcattgacctaccctgc
atcggaacttcaccataccactcaacaagaaggagagttcaagctcccaccctcttctaaatcactagtgaattcgggc
cgctgcaggtc

NCBI/BLAST/tblastx Sonucu

Lokus	En yüksek	Toplam	Query coverage	E değeri
AF386513.1	215	1112	%90	2e-53

LOKUS: DQ660905.1

PRIMERLER: MDDhydrF1: atgtcgaattatgtaataacaacagc

MDDhydrR1: ctactcgcgctggccaccaggaa

Quince A

gcatgctcccggccgcatggcggccgcggaattcgattatgtcgaattatggtaataacaacagccgaaaaactacagag
gagtactacgggaacccgacttacaacggtagcggcgagccggtaggaccgacgagttcgggaacgcggtcaacacgg
tcggaccgataccggctacgggactgctgatccaagactgctgatgaaggattgtgggcatcatggcggccccgctg
ctcagcgtcaggaagcttagctcttctgaagatgatgggctaggtgggagaaggaagaaggactgaaagacaaga
taaaggagaagctaccaggtggtcgtacaaggatgaccagtactctggtggaacgcagaccactacccttacggtggtgg
gacgacttacaggtgaaggagacaacgccaggagaagggtacgatggacaaaatcaagaagaagctgccaggtggg
aatagggatgaccagtattctcatgacacgtcaactactgctgcaccttatggtggga

NCBI/BLAST/tblastx Sonucu

Lokus	En yüksek	Toplam	Query coverage	E değeri
DQ660905.1	166	2057	%93	3e-61

Ankara Armudu (Klon 19)

gcatgctcccggccgcatggcggccgcggaattcgattttagaagagggtgggaagctgaactctcccttctgtgagtg
gtatggtgaagttgccgatgacggtaggtcaatgatgaggcctatgtccaactcatagtcgaagtcaggctgcaccagat
tcctttaccaatgttcaacaatatgctgtggaaccttcaatgacacctccagcacagttacatcacttgctttatggatccagg
gtccggtatggtcccggatgcaatctcctgttaacgctctttgagggtgtatttgatcacagatgggatacagtggtgta
gggattggtcacggataccttgcaaggactccacggagctcaagctcacttctgaaatcaacgtctgtgacattctgctct
ggcttgcctatgttctatctttctgccacgaagtcttggccttatccatgaaacctgctcggccataatcactagtgaattgc
ggccgctgcaggtcgaccatgaggagagctccaacgcgttgatgcat

NCBI/BLAST/tblastx Sonucu

Lokus	En yüksek	Toplam	Query coverage	E değeri
DQ660905.1	168	1322	%100	1e-45

Ahlat-3

gctcccggccgcatggcggccgcggaattcgattatgtcgaattatggtaataacaacagcaaaaactaccgaggagtacta
cgggaacccgacttacaatgtagcggcgagccggtaggaccgacgagttcgggaacgcggtcaacaaggtcggactg

ataccggctacgggactgctgatgccaaactgggatgaaggattgttgggcatcatggcggccccgggtgcttcagcg
ctcaggaagctccagctcttctgtctgaagatgatgggctaggtgggagaaggaagaaggactgaaagagaagattaaagg
agaagctaccaggtggtgtaacaaggatgaccagtactctggtggaacgcagaccactacccttacgggtggtgggacga
cttacacaggtgaaggagggaacgccaggagaagggtatgacggacaagatcaagaagaagctgccaggtgggaata
gggatgaccagtattctcatgacacgtcaactactgctgcacctatggtgggacaggggcgcacaggagagccccaggaaa

NCBI/BLAST/tblastx Sonucu

Lokus	En yüksek	Toplam	Query coverage	E değeri
DQ660905.1	160	1893	%99	2e-76

LOKUS : FJ468294.1

PRİMERLER : PPDhydF2: atggcgaattatcagactaaatgg

PPDhydR2: ttaatggcgatatccaggaagcttt

Quince A

tccggccgccatggcggccgcgggaattcgattatggcgaattatcagactaaatggtacaacgccccaaagacacagat
gagatgggaaccgattcaacaggggtactaccggaggcttcggtagtccaccactggactggatagggaccactgaag
ccccgtacacaggagggcagcaacaagagagaggtactggcatgactggaagtggttacgggactactgatccccg
tacacaggagggcagcaacaacaagagagagggatgatggataagatcaaggacaagattccaggaactgctggtggacg
tagggatgacgaccctactcaacgaatgccagaccggtactggcatgactggaactgggtacgggactactgacgcccc
gtactggaggggagtacgaagaaaggggatgatggacaaggtcaaggaccaagattccgggggactgggcagagg
gatgaaaaccctactcatctcagacgacc

NCBI/BLAST/tblastx Sonucu

Lokus	En yüksek	Toplam	Query coverage	E değeri
FJ468294.1	209	1753	%93	2e-76

Ahlat-3

tgctcccggccatggcgggtccgcgggaattcgattatggcgaattatcagactaaatggtacaacgccccaaagacaca
gatgagatgggaaccgattcaacaggggtactaccggaggcttcggtggtgccaccactggactgggtacggggcaaca
ggagggcagcagcaacaagagagaggtactggcatgactggaagtggttacgggactactgatccccgtacacaggagg
gcagcaacaacaagagagagggatgatggacaagatcaaggaaaagattccaggaactggtggtggacgtagggatgac
gaccctactcatgaaatgccagaccggtactgggatgactggaactgggtacggtactactgacgccccgtactggtg

gggagtagcaagaagggggatgatggacaagggtcaaggacaagatgccggggactgggcagaggggatgaaaccact
c

NCBI/BLAST/tblastx Sonucu

Lokus	En yüksek	Toplam	Query coverage	E değeri
FJ468294.1	351	1746	%95	3e-94

4.2.3 Real time PCR

Primer Tasarımı: Yukarıdaki dizi analizi sonuçlarına göre stresle daha ilişkili olduğu düşünülen DQ660905 lokusu prob ve primer dizaynı için seçilmiş ve internal kontrol olarak da Aktin mRNA kullanılmıştır. DQ660905 lokusu için ise primer ve proplar:

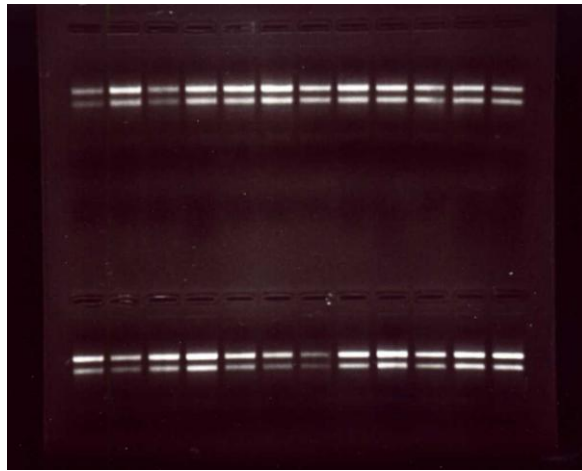
AKTİN PRİMERİ: F; ctgctggcattcatgagact
R; tctggtggagctacaacctt

AKTİN PROBU: UPL 125

DEHİDRİN PRİMERİ: F; caacgccaggagaagctac,
R; attcccacctggcagct

DEHİDRİN PROBU: UPL 31

RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi: Tuzluluk stresi uygulanmış mikro sürgünlerden izole edilen RNA'ların miktar ve kalite özellikleri çizelge 4.5'de, görünümü şekil 4.3'de sunulmuştur.



Şekil 4.3 İzole edilen RNA'ların görünümü

Çizelge 4.5 İzole edilen RNA'ların miktar ve kalite özellikleri

Örnek	ng/ µl	A260	A280	260/280	260/230
Ahlat-1 (24 saat, 1.tekerrür)	975.89	24.397	10.802	2.26	2.32
Ahlat-1 (24 saat, 2.tekerrür)	505.77	12.644	5.66	2.23	2.26
Ahlat-1 (24 saat, 3.tekerrür)	852.8	21.32	9.536	2.24	2.34
Ahlat-1 (48 saat, 1.tekerrür)	1053.16	26.329	11.719	2.25	2.34
Ahlat-1 (48 saat, 2.tekerrür)	1920.47	48.012	21.452	2.24	2.27
Ahlat-1 (48 saat, 3.tekerrür)	1403.65	35.091	15.603	2.25	2.3
Ahlat-1 (96 saat, 1.tekerrür)	1391.58	34.789	15.468	2.25	2.27
Ahlat-1 (96 saat, 2.tekerrür)	806.86	20.172	8.898	2.27	2.3
Ahlat-1 (96 saat, 3.tekerrür)	1753.04	43.826	19.549	2.24	2.32
Ahlat-1 (192 saat, 1.tekerrür)	502.78	12.57	5.654	2.22	2.37
Ahlat-1 (192 saat, 2.tekerrür)	621.12	15.528	6.881	2.26	2.2
Ahlat-1 (192 saat, 3.tekerrür)	979.78	24.495	10.888	2.25	2.23
Ahlat-2 (24 saat, 1.tekerrür)	493.49	12.337	5.389	2.29	2.36
Ahlat-2 (24 saat, 2.tekerrür)	917.89	22.947	10.116	2.27	2.32
Ahlat-2 (24 saat, 3.tekerrür)	807.17	20.179	8.88	2.27	2.3
Ahlat-2 (48 saat, 1.tekerrür)	776.19	19.405	8.555	2.27	2.32
Ahlat-2 (48 saat, 2.tekerrür)	1491.18	37.28	16.542	2.25	2.32
Ahlat-2 (48 saat, 3.tekerrür)	520.4	13.01	5.741	2.27	2.26
Ahlat-2 (96 saat, 1.tekerrür)	749.29	18.732	8.289	2.26	2.32
Ahlat-2 (96 saat, 2.tekerrür)	862.79	21.57	9.492	2.27	2.29
Ahlat-2 (96 saat, 3.tekerrür)	1618	40.45	18.004	2.25	2.31
Ahlat-2 (192 saat, 1.tekerrür)	3952.78	98.819	48.734	2.03	2.06
Ahlat-2 (192 saat, 2.tekerrür)	527.21	13.18	5.871	2.25	2.23
Ahlat-2 (192 saat, 3.tekerrür)	384.04	9.601	4.364	2.2	2.24
Ahlat-3 (24 saat, 1.tekerrür)	288.21	7.205	3.31	2.18	2.33
Ahlat-3 (24 saat, 2.tekerrür)	523.7	13.093	5.818	2.25	2.37
Ahlat-3 (24 saat, 3.tekerrür)	515.27	12.882	5.713	2.25	2.36
Ahlat-3 (48 saat, 1.tekerrür)	1325.99	33.15	14.776	2.24	2.31
Ahlat-3 (48 saat, 2.tekerrür)	539.8	13.495	6.006	2.25	2.29
Ahlat-3 (48 saat, 3.tekerrür)	647.75	16.194	7.108	2.28	2.32
Ahlat-3 (96 saat, 1.tekerrür)	2167.33	54.183	24.196	2.24	2.29
Ahlat-3 (96 saat, 2.tekerrür)	1030.62	25.766	11.218	2.3	2.28
Ahlat-3 (96 saat, 3.tekerrür)	2156.23	53.906	24.014	2.24	2.29
Ahlat-3 (192 saat, 1.tekerrür)	1645.7	41.143	18.201	2.26	2.36
Ahlat-3 (192 saat, 2.tekerrür)	1352.36	33.809	14.817	2.28	2.32
Ahlat-3 (192 saat, 3.tekerrür)	1145.81	28.645	12.577	2.28	2.36

Çizelge 4.5 İzole edilen RNA'ların miktar ve kalite özellikleri (devam)

Örnek	ng/ µl	A260	A280	260/280	260/230
OHxF 333 (24 saat, 1.tekerrür)	716.28	17.907	8.019	2.23	2.4
OHxF 333 (24 saat, 2.tekerrür)	399.62	9.99	4.564	2.19	2.3
OHxF 333 (24 saat, 3.tekerrür)	343.51	8.588	3.922	2.19	2.27
OHxF 333 (48 saat, 1.tekerrür)	733.25	18.331	8.086	2.27	2.37
OHxF 333 (48 saat, 2.tekerrür)	546.33	13.658	6.084	2.25	2.37
OHxF 333 (48 saat, 3.tekerrür)	465.48	11.637	5.304	2.19	2.27
OHxF 333 (96 saat, 1.tekerrür)	720.64	18.016	7.976	2.26	2.32
OHxF 333 (96 saat, 2.tekerrür)	528.39	13.21	5.87	2.25	2.32
OHxF 333 (96 saat, 3.tekerrür)	919.53	22.988	10.224	2.25	2.32
OHxF 333 (192 saat, 1.tekerrür)	573.79	14.345	6.401	2.24	2.24
OHxF 333 (192 saat, 2.tekerrür)	867.57	21.689	9.67	2.24	2.35
OHxF 333 (192 saat, 3.tekerrür)	808.28	20.207	8.952	2.26	2.4
Ankara Armudu (19) (24 saat, 1.tek)	795.26	19.881	8.736	2.28	2.32
Ankara Armudu (19) (24 saat, 2.tek)	1457.14	36.429	16.197	2.25	2.3
Ankara Armudu (19) (24 saat, 3.tek)	2109.98	52.749	23.71	2.22	2.26
Ankara Armudu (19) (48 saat, 1.tek)	1173.51	29.338	12.994	2.26	2.27
Ankara Armudu (19) (48 saat, 2.tek)	1270.28	31.757	14.085	2.25	2.29
Ankara Armudu (19) (48 saat, 3.tek)	1666.59	41.665	18.519	2.25	2.28
Ankara Armudu (19) (96 saat, 1.tek)	1221.89	30.547	13.483	2.27	2.31
Ankara Armudu (19) (96 saat, 2.tek)	1010.83	25.271	11.063	2.28	2.32
Ankara Armudu (19) (96 saat, 3.tek)	2671.13	66.778	30.133	2.22	2.25
Ankara Armudu (19) (192 saat, 1.tek)	1390.3	34.758	15.485	2.24	2.19
Ankara Armudu (19) (192 saat, 2.tek)	829.99	20.75	9.113	2.28	2.37
Ankara Armudu (19) (192 saat, 3.tek)	862.96	21.574	9.414	2.29	2.32
Quince A (24 saat, 1.tekerrür)	114.67	2.867	1.279	2.24	2.43
Quince A (24 saat, 2.tekerrür)	499.08	9.982	4.536	2.2	2.25
Quince A (24 saat, 3.tekerrür)	134.84	3.371	1.537	2.19	2.29
Quince A (48 saat, 1.tekerrür)	638.2	15.955	7.125	2.24	2.33
Quince A (48 saat, 2.tekerrür)	458.21	11.455	5.129	2.23	2.31
Quince A (48 saat, 3.tekerrür)	401.19	10.03	4.536	2.21	2.29
Quince A (96 saat, 1.tekerrür)	328.02	8.201	3.716	2.21	2.32
Quince A (96 saat, 2.tekerrür)	178.01	4.45	2.041	2.18	2.27
Quince A (96 saat, 3.tekerrür)	237.45	5.936	2.66	2.23	2.4
Quince A (192 saat, 1.tekerrür)	268.4	6.71	3.008	2.23	2.27
Quince A (192 saat, 2.tekerrür)	249.7	6.242	2.79	2.24	2.39
Quince A (192 saat, 3.tekerrür)	158.88	3.972	1.811	2.19	2.22

Primer Optimizasyonu: Dehidrin ve ACT primerleri, problemleri kullanılarak optimize edilmiştir. Optimizasyon içerikleri ve real time PCR programında kullanılan bağlanma dereceleri (Tm) çizelge 4.6 ve 4.7’de verilmiştir.

Çizelge 4.6 Dehidrin primer optimizasyon koşulları

Primer Optimizasyon Koşulları (TM 57 °C)	
cDNA	2 µl
İleri primer (10 pmol)	0.5 µl
Geri primer (10 pmol)	0.5 µl
FL Prob	0.5 µl
LC Prob	0.5 µl
Enzim (2x)	5 µl
Toplam hacim	10 µl

Çizelge 4.7 ACT Primer optimizasyon koşulları

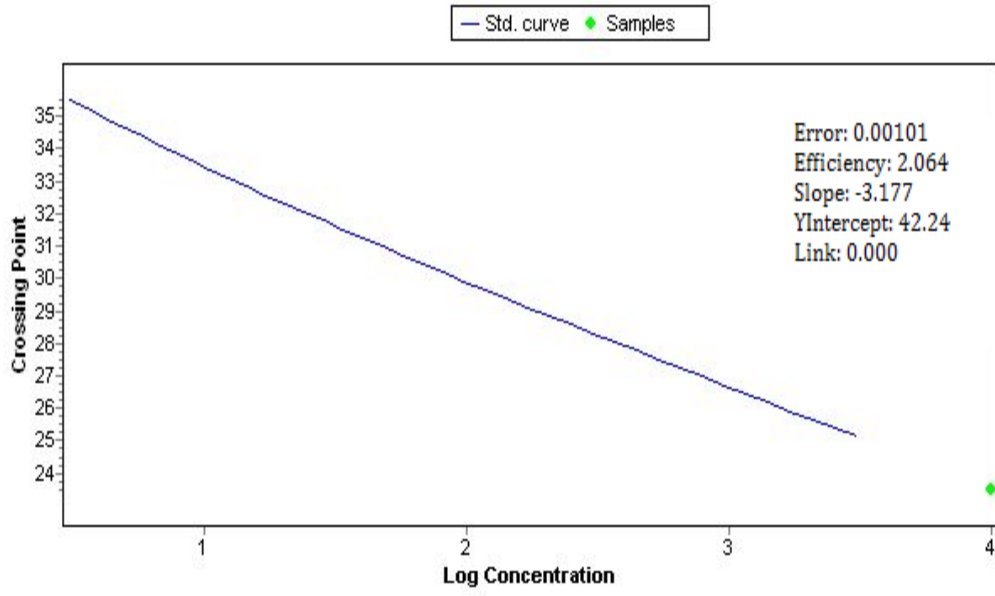
ACT Primer Optimizasyon Koşulları (TM 55 °C)	
cDNA	2 µl
İleri primer (10 pmol)	0.5 µl
Geri primer (10 pmol)	0.5 µl
FL Prob	0.5 µl
LC Prob	0.5 µl
Enzim (2x)	5 µl
Toplam hacim	10 µl

Örneklerin Cihaza Yüklenmesi: PCR reaksiyonu Light Cycler 480 (Roche) aracılığı ile çizelge 4.8’de sunulan programla gerçekleştirilmiştir. Bunun için örnekler plate yerleştirilmiş, 1 dakika 14.000 rpm’de santirifüj edilmiş ve Roche Light Cycler 480 aracılığı ile uygun sıcaklıkta yürütülmüştür (Çizelge 4.8).

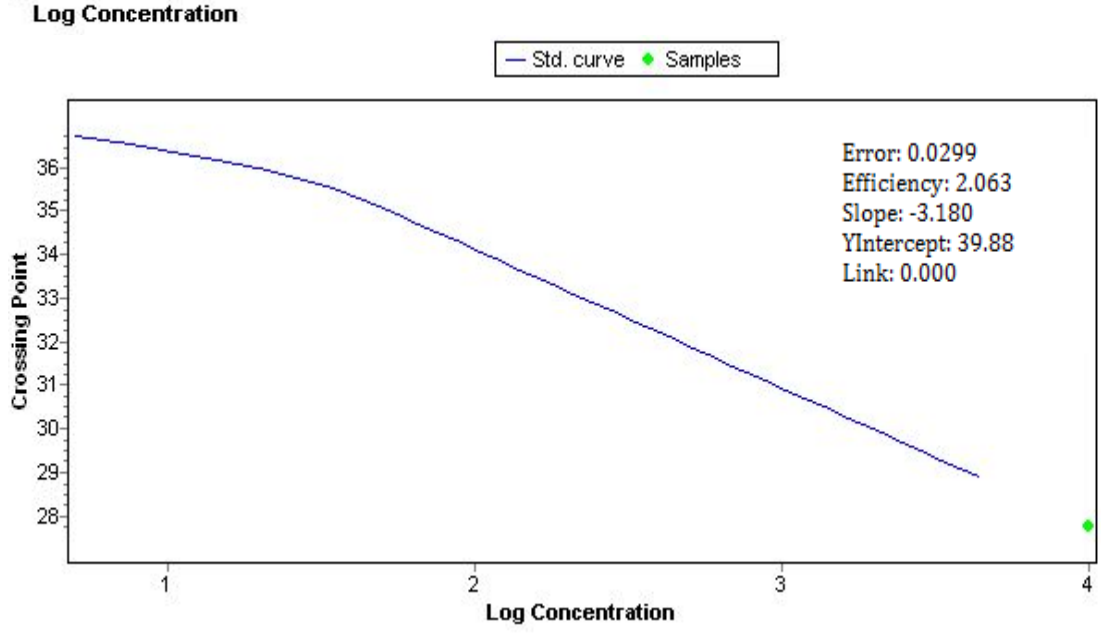
Çizelge 4.8 Real time PCR programı

Program					
Program	Cycles		Analiz Modu		
Ön inkübasyon	Acquisition Mode	Cycle	Hold(hh:mm:ss)	Ramp Rate	
95 °C	None	1	00:10:00	4.4	
Amplifikasyon	Acquisition Mode	Cycle	Hold(hh:mm:ss)	Ramp Rate	Quantification
95 °C	None		00:00:10	4.4	
57 °C	None	45	00:00:10	2.2	
72 °C	Single		00:00:05	4.4	
Soğutma	Acquisition Mode	Cycle	Hold(hh:mm:ss)	Ramp Rate	
40 °C	None	1	00:00:30	2.5	None

Standart Eğri: Kullanılan primerlere ait bazı standart eğri grafikleri şekil 4.4 ve 4.5’de sunulmuştur. Standart eğri grafiklerinin etkinlik (efficiency) değerleri yaklaşık 2 ve slope değerleri ise -3.3’e yakın bulunmuştur. İlgili primerler için real time PCR reaksiyon koşullarının ve standart eğrilerin uygun olduğu belirlenmiştir.



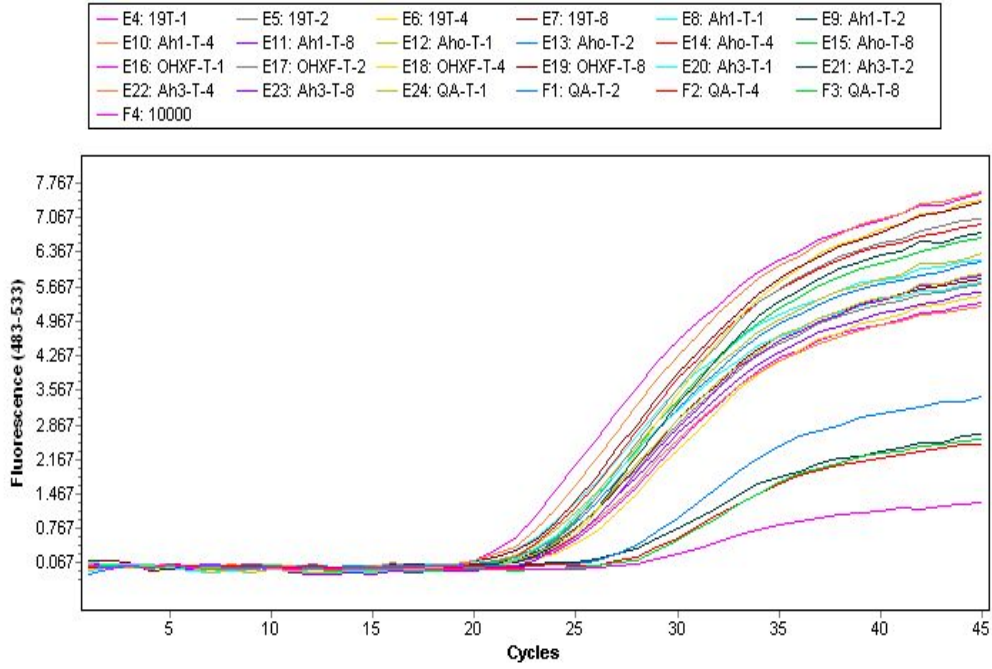
Şekil 4.4 Real time PCR cihazından alınan aktin primerine ait standart eğri grafiği, etkinlik ve slope değerleri



Şekil 4.5 Real time PCR cihazından alınan dehidrin primerine ait standart eğri grafiği, etkinlik ve slope değerleri

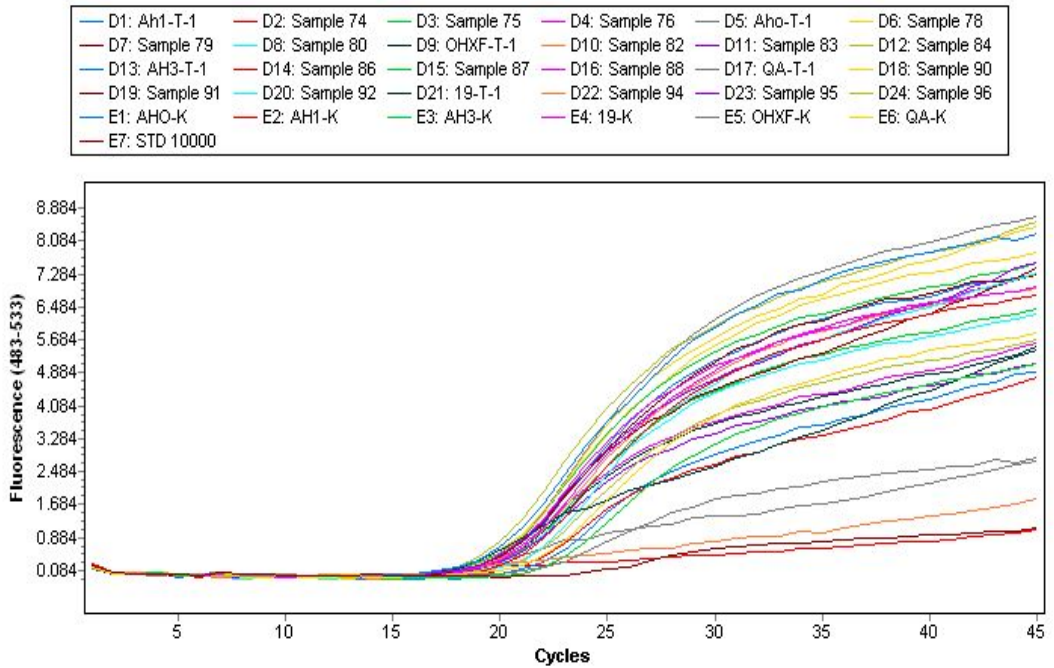
Gerçek Zamanlı Amplifikasyon Eğrileri: ACT ve dehidrin primerlerinde standart ve örneklere ait amplifikasyon eğrileri şekil 4.6 ve 4.7’de sunulmuştur. Amplifikasyon eğrilerinde Ct değerleri 21-28 döngüler arasında elde edilmiş ve analizlerle bu Ct değerlerinin anlamlı değerler olarak kullanılabilceği belirlenmiştir.

Amplification Curves



Şekil 4.6 Dehidrin primerinde standart ve örneklere ait amplifikasyon eğrileri

Amplification Curves

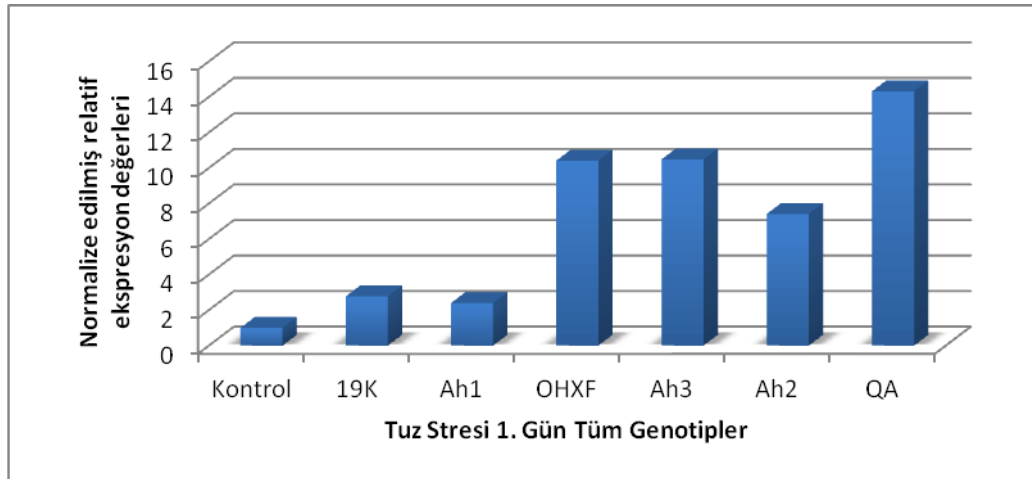


Şekil 4.7 ACT primerinde standart ve örneklere ait amplifikasyon eğrileri analizleri

Real Time PCR İfade Analizleri: Tuz stresi uygulanmış 6 farklı genotipte gerçekleştirilmiş olan quantitative real time PCR analizi sonuçları ve gen ifade seviyeleri şekil 4.8, 4.9, 4.10 ve 4.11’de sunulmuştur. Değişen dehidrin gen ifade seviyeleri, kontrol ile karşılaştırıldığında tuz stresi sürelerine göre sadece OHxF 333 genotipinde istatistiksel anlamda önemsiz bulunmuş ($P > 0.05$), diğer tüm genotiplerde ise değerler arasındaki farklılıklar önemli bulunmuştur.

Yirmidört saat (1 gün) tuz uygulamasından sonra dehidrin gen ifadesi:

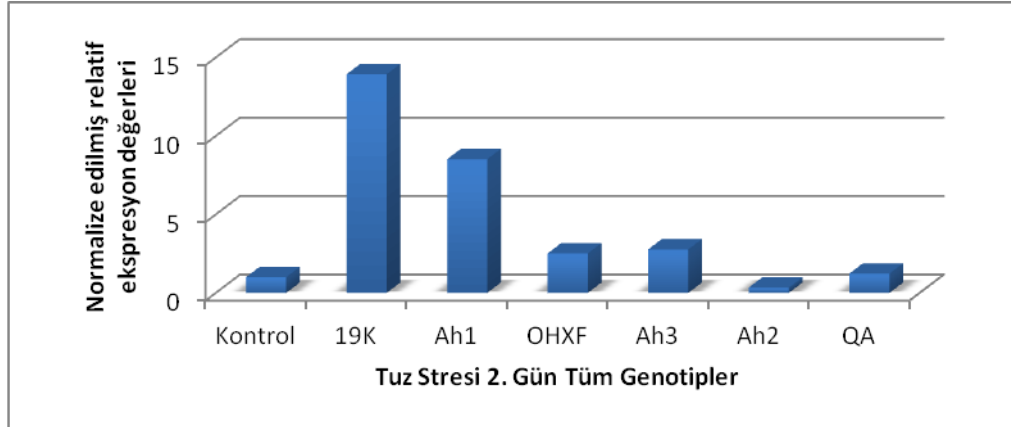
Bu sürenin sonunda gen ifade seviyeleri kontrole göre en yüksek Quince A genotipinde görülmüştür. Bu genotipte gen ifadesi kontrole göre 14 kat artmıştır. En düşük miktar ise Ankara Armudu (Klon 19) ve Ahlat-1 genotiplerinde belirlenmiştir. Genotiplerin 24 saat (1 gün) stres uygulamasından sonra dehidrin gen ifade seviyelerinin, kontrole göre sıralaması QA>AH-3>OHxF333>AH-2>AN-19>AH-1 şeklinde olmuştur (Şekil 4.8).



Şekil 4.8 Kontrole göre genotiplerde stres uygulamasından 24 saat sonra dehidrin geninin ifade seviyeleri

Kırksekiz saat (2 gün) tuz uygulamasından sonra dehidrin gen ifadesi:

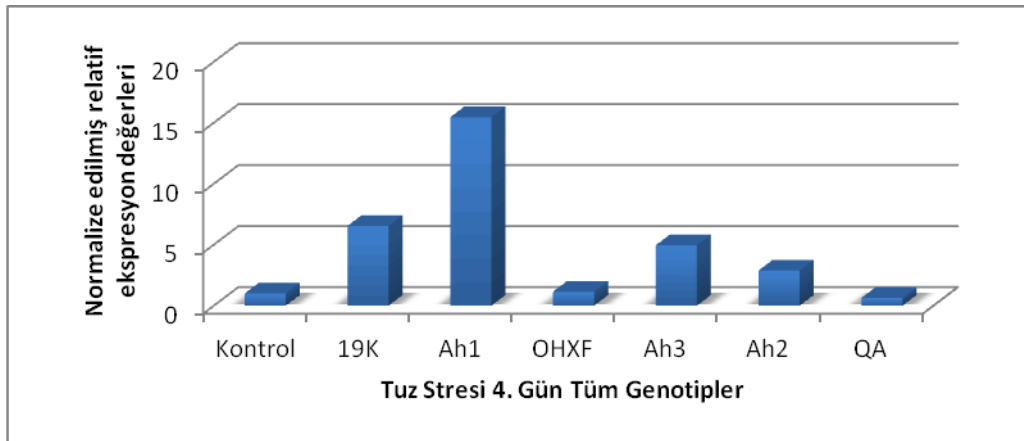
Bu sürenin sonunda gen ifade seviyeleri kontrole göre en yüksek Ankara Armudu (Klon 19) ve Ahlat-1 genotiplerinde görülmüştür. En düşük miktar ise Ahlat-3, OHxF 333 ve Ahlat-2 genotiplerinde belirlenmiştir. Genotiplerin 48 saat (2 gün) stres uygulamasından sonra dehidrin gen ifade seviyelerinin, kontrole göre sıralaması AN-19>AH-1>AH-3>OHxF333>QA>AH-2 şeklinde olmuştur (Şekil 4.9).



Şekil 4.9 Kontrole göre genotiplerde stres uygulamasından 48 saat sonra dehidrin geninin ifade seviyeleri

Doksanaltı saat (4 gün) tuz uygulamasından sonra dehidrin gen ifadesi:

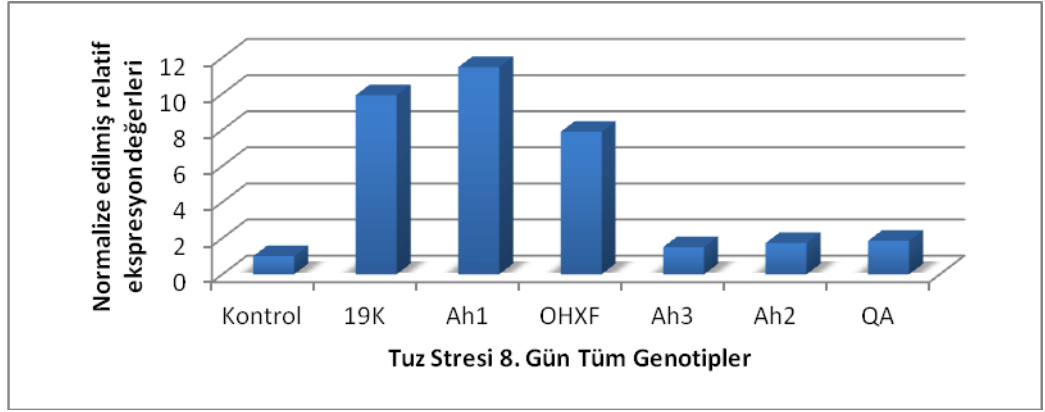
Bu sürenin sonunda gen ifade seviyeleri kontrole göre en yüksek Ankara Armudu (Klon 19) ve Ahlat-1 genotiplerinde görülmüştür. En düşük miktar ise Ahlat-2, Quince A ve Ahlat-3 genotiplerinde belirlenmiştir. Genotiplerin 96 saat (4 gün) stres uygulamasından sonra dehidrin gen ifade seviyelerinin, kontrole göre sıralaması AN-19>AH-1>AH-3>QA >OHxF333>AH-2 şeklinde olmuştur (Şekil 4.10).



Şekil 4.10 Kontrole göre genotiplerde stres uygulamasından 96 saat sonra dehidrin geninin ifade seviyeleri

Yüzdoksaniki saat (8 gün) tuz uygulamasından sonra dehidrin gen ifadesi:

Bu sürenin sonunda gen ifade sevipleri kontrole göre en yüksek Ahlat-1 ve Ankara Armudu (Klon 19) genotiplerinde görülmüştür. En düşük miktar ise Ahlat-3, Ahlat-2 ve Quince A genotiplerinde belirlenmiştir. Genotiplerin 192 saat (8 gün) stres uygulamasından sonra dehidrin gen ifade seviyelerinin, kontrole göre sıralaması AH-1>AN-19>OHxF333>QA>AH-2>AH-3 şeklinde olmuştur (Şekil 4.11).



Şekil 4.11 Kontrole göre genotiplerde stres uygulamasından 192 saat sonra dehidrin geninin ifade seviyeleri

5 TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada, bazı armut (Ankara armudu ve OH x F 333) (*P. communis* L.), ahlat (Ahlat-1, Ahlat-2, Ahlat-3) (*P. elaeagrifolia* Pall.) ve ayva (*C. oblonga* Mill.) (Quince A) genotiplerinde farklı tuz stresi seviyelerinin (75 mM NaCl+7.5 mM CaCl₂.2H₂O, 150 mM NaCl+15 mM CaCl₂.2H₂O, 225 mM NaCl+22.5 mM CaCl₂.2H₂O ve 300 mM NaCl+30 mM CaCl₂.2H₂O) *in vitro* koşullarda mikro sürgünlerin büyüme ve gelişmesi üzerine etkileri ve 225 mM NaCl+22.5 mM CaCl₂.2H₂O tuz uygulamasında mikro sürgünlerde dehidrin gen ifadeleri araştırılmıştır. Genotiplerin tuza tepkilerinin belirlenmesinde *in vitro* koşullar, deneme alanı, süresi ve homojenliği bakımlarından uygun bulunduğu için birçok odunsu bitki türünde tercih edilmektedir. Bu tip çalışmalarda bitkisel kaynak olarak ise mikro sürgünler ya da *in vitro* bitkicikler yaygın olarak kullanılabilir (Sivritepe ve Eriş 1999, Shibli vd. 2000, 2002 ve 2003, Vijayan vd. 2003, Perez-Tornero vd. 2009).

Tuz stresi denemelerinde genotiplerin tuza dayanıklılığını/hassasiyetini değerlendirmede dikkate alınan önemli bir kriter olan canlılık oranı (Munns 2002) bakımından bu çalışmada yer alan genotiplerin NaCl+CaCl₂.2H₂O konsantrasyonlarına tepkilerinin farklı olduğu belirlenmiştir. Ankara armudu, QA ve Ahlat-3 genotiplerinde tüm tuz seviyelerinde sürgünlerin canlılık oranı yüksek değerlerde (%80.5-100.0) bulunmuş ve OHxF 333 genotipinde sadece en yüksek tuz seviyesinde (300 mM NaCl+30 mM CaCl₂.2H₂O) canlılık oranı önemli düzeyde düşüş (%77.66) göstermiştir. Ahlat-1 ve Ahlat-2 genotiplerinde ise çalışmamızın düşük tuz seviyelerinde (sırasıyla 150 mM NaCl+15 mM CaCl₂.2H₂O ve 75 mM NaCl+7.5 mM CaCl₂.2H₂O) sürgünler canlılığını önemli düzeyde (%61.0 ve %69.16) kaybetmiştir (Çizelge 4.1). Bu sonuç, canlılık oranı bakımından Ankara armudu, QA ve Ahlat-3 genotiplerinin diğerlerine göre yüksek tuz seviyelerine karşı daha tolerant olduğunu göstermektedir. Sürgünlerin canlılık oranları ile ilgili bulgularımız ahlat genotipleri arasında bu bakımdan önemli farklılıklar bulunduğu işaret etmektedir. Okubo ve Sakuratani (2000) saksıda yetiştirdikleri 2 yaşlı bitkilerde *Pyrus betulifolia* genotipinde 100 mM NaCl uygulamasında yüksek canlılık oranı ve hafif yaprak hasarı belirlerken, *P. pyrifolia* genotipinde 25 mM NaCl uygulamasında yapraklarda şiddetli zararlanma ve test

bitkilerinde ölümler saptadıklarını bildirmişlerdir. Çalışmamızda ise 75 mM ve 150 mM NaCl konsantrasyonlarında sadece Ahlat-1 ve Ahlat-2 genotiplerinde canlılık oranları diğerlerinden daha düşük olmuş ve bu değerler de %60 seviyelerinde kaydedilmiştir. Tuzluluk stresinin *in vitro* koşullarda test edildiği bir diğer çalışmada da Vijayan vd. (2003) dutun mikro sürgünlerinin tuzluluğa tepkisinin genotiplere göre büyük değişim gösterdiğini belirlemişlerdir. Araştırmacılar, Englishblack dut genotipinde %1.0 NaCl (215.5 mM) seviyesinde sürgünlerin %50.0'sinin canlı kaldığını, Kolitha-3 genotipinde ise bu canlılık düzeyinin %0.25 NaCl seviyesinde (43.1 mM) saptandığını bildirmişlerdir.

Bu çalışmada ortalama sürgün sayısı genotiplerin tamamında tüm tuz seviyelerinde kontrole göre istatistiksel anlamda önemli düzeyde daha düşük bulunmuştur. Bu bulgu, turunç (Shiyab vd. 2003), kivi (Sotiropoulos vd. 2004), armut (Sotiropoulos vd. 2006), GF 677 ve nemared (Sotiropoulos vd. 2006), elma (Sotiropoulos 2007), CAB-6P (vişne) (Chatzissavvidis vd. 2008), *Citrus macrophylla* (Perez-Tornero vd. 2009) genotiplerinde elde edilen bulgular ile uyumluluk göstermektedir. Sotiropoulos vd. (2006), OH x F 333 armut klon anacında *in vitro* koşullarda MS besin ortamında en yüksek sürgün sayısını borun 0.1 mM ve NaCl'ün 0-20 mM dozlarında (2.6-2.7 adet) elde etmişlerdir. Borun tuzluluk stresi amacıyla besin ortamına katılmadığı çalışmamızda ise *in vitro* koşullarda bu genotipte kontrol uygulamasında sürgün sayısı 5.11 adet/eksplant olarak belirlenmiştir.

Çalışmamızda, genotiplerin ortalaması olarak tuz konsantrasyonlarının yükselmesi ile birlikte ortalama sürgün kalınlık düzeyi azalmıştır. Bununla birlikte ortalama sürgün uzunluğu, tuz uygulamalarında kontrole göre daha düşük değerlerde kaydedilmemiştir. Bazı “genotip x tuz uygulaması” interaksiyonlarında yüksek tuz konsantrasyonlarında ortalama sürgün uzunluğu daha yüksek değerlerde bulunmuştur. Bu sonuç Sotiropoulos vd.'nin (2006) bulguları ile uyumluluk göstermiştir. Araştırmacı OH x F 333 armut klon anacında en uzun sürgünleri denemedeki en yüksek tuz konsantrasyonu olan 80 mM NaCl ile uygulamasından elde ettiğini bildirmiştir. Bu bulguların tersine dut (Vijayan vd. 2003), acı badem (Shibli vd. 2003), *Citrus* (Shiyab vd. 2003, Perez-Tornero vd. 2009, Ghaleb vd. 2010), kivi (Sotiropoulos vd. 2004), armut (Sotiropoulos vd. 2006), GF 677

ve nemared (Sotiropoulos vd. 2006), elma (Sotiropoulos 2007), Gisela 5 (Erturk vd. 2007), zeytin (Troncoso vd. 2008) ve ayvada (Sotiropoulos vd. 2008) yürütülmüş çalışmalarda tuz konsantrasyonlarının artması ile birlikte mikro sürgünlerin uzunluklarında azalma saptanmıştır.

Bu çalışmada mikro sürgünlerin dip kısmında kallus oluşumu besin ortamındaki tuzlardan etkilenmiştir. Kalus çapı, tuz konsantrasyonlarının yükselmesi ile birlikte genel olarak düşüş göstermiştir. Benzer sonuç, buğday (Barakat ve Abdel-Latif 1996) ve kırmızı fasulyede (Thiagarajan vd. 2013) de belirlenmiştir. Bu bakımdan bulgularımız araştırmacıların bulguları ile paralellik göstermiştir.

Çalışmamızda mikro sürgünlerin zararlanma düzeyi tuz konsantrasyonunun artması ile birlikte önemli düzeyde yükselmiştir. En şiddetli zarar düzeyi 300 mM NaCl+30 mM CaCl₂.2H₂O uygulamasında belirlenmiştir. Bu bakımdan genotipler arasındaki farklılıkların da önemli bulunduğu çalışmamızda OHxF 333, QA ve Ankara armudu genotiplerinin, ahlat genotiplerine göre tuz stresinden daha az etkilendiği saptanmıştır. Matsumoto vd. (2006a), tuza dayanıklılık bakımından dış koşullarda türler arasında yaptıkları karşılaştırmalarda Asya yabani armut türlerinin (*P. betulaefolia* Bunge, *P. pyrifolia* Nakai ve *P. xerophila* Yu), Akdeniz yabani armut türlerine (*P. amygdaliformis* Vill. ve *P. elaeagrifolia* Pall.) göre stresten daha fazla etkilendiğini, 30 gün boyunca 75 mM ve 150 mM NaCl solusyonu ile sulamadan sonra Akdeniz türlerinde yaprak zararlanması gözlenmezken, Asya türlerinde yapraklarda zararlanmalar meydana geldiğini belirlemişlerdir. Araştırmacıların köklü bitkilerde dış koşullarda elde ettikleri bulgular çalışmamızda ulaştığımız bulgular ile kısmen uyumluluk göstermektedir. Çalışmamızda da *in vitro* koşullarda köksüz mikro sürgünlerde 75 mM ve 150 mM NaCl seviyelerinde genel olarak diğer Avrupa armut genotiplerinin yanı sıra ahlat genotiplerinde de yüksek düzeylerde zararlanma meydana gelmemiştir.

Bu çalışmada tuz konsantrasyonunun artması ile birlikte genotiplerin ortalaması olarak yaş ağırlık değerleri önemli düzeyde düşüş göstermiş ve en yüksek değerler Ahlat-3, QA ve Ankara armudu genotiplerinden elde edilmiştir. Oysa, Sotiropoulos vd. (2006), OH x F 333 armut klon anacında 0.1 bor ile birlikte 80 mM NaCl tuz uygulamasında

taze ağırlık değerini (0.135 g), 0 mM NaCl uygulamasına (0.103 g) göre önemli düzeyde daha yüksek bulmuşlardır. Bununla birlikte araştırmacıların 0 mM NaCl uygulamasından elde ettikleri yaş ağırlık değeri, çalışmamızda bu genotipte kontrol uygulamasında belirlediğimiz değerden (0.39 g) bir hayli düşüktür. Bulgularımız ile uyumlu olarak tuzluluk stresi altında dut (Vijayan vd. 2003), armut (Sotiropoulos vd. 2006), GF 677 ve nemared (Sotiropoulos vd. 2006), elma (Sotiropoulos 2007), ayva (Sotiropoulos vd. 2008) ve *Citrus* (Perez-Tornero vd. 2009, Ghaleb vd. 2010) genotiplerinde de sürgünlerin yaş ağırlığının azaldığı bildirilmiştir.

Çalışmamızda ayrıca 225 mM NaCl+22.5 mM CaCl₂.2H₂O tuz stresi altında armut, ahlat ve ayva genotiplerinde 24, 48, 96 ve 192 saat dilimlerinde dehidrin gen ifade seviyeleri de araştırılmıştır. Tuz stresi koşullarında genotipler zaman dilimi içinde farklı ifadeler göstermiştir. Benzer şekilde tuz stresi altında yabani nohut (Bhattarai ve Fettig 2005) ve fasulye (Hernández-Lucero vd. 2014) bitkilerinde de zaman dilimi içinde dehidrin gen ifadelerinin farklı olduğu gösterilmiştir. Bulgularımız, Quince A, Ahlat-3, OHxF 333, Ahlat-2 (24 saat) ve Ankara armudu (48 saat) genotiplerinin dehidrin gen ifadesi bakımından tuzluluk stresine daha erken cevap verdiğini, Ahlat-1 Ankara armudu ve OHxF 333 genotiplerinde 192 saatlik dilimde gen ifadelerinin diğer genotiplerden daha yüksek düzeyde olduğunu göstermiştir. Dehidrin geninin ifadesi bakımından tuz stresine erken cevap veren genotiplerden özellikle QA, Ahlat-3 ve Ahlat-2'de 24 saatten sonraki zaman dilimlerinde gen ifadesi düşük seviyelerde olmuştur. Shen vd. (2004) *Boea crassifolia* bitkilerinde *in vitro* koşullarda 150 mM NaCl tuz stresi altında 8 saatlik uygulamada *BcDh2* gen ifadesinin yükseldiğini, ancak 24 saat sonra bunun düşüşe geçtiğini bildirmişlerdir. Öztürk vd. (2002) de arpada benzer bulgular elde etmişlerdir. Hernández-Lucero vd. (2014) de fasulyede 2 ve 5 gün süreyle 200 mM NaCl uygulaması sonrasında dehidrin gen ifadesinin 2 günlük uygulamada artış, 5 günlük uygulamada ise düşüş gösterdiğini belirtmişlerdir. Bulgularımız araştırmacıların bulguları ile paralellik göstermektedir. Çalışmamızda ayrıca Ankara armudu ve Ahlat-1 genotiplerinde ilk 24 saatte gen ifadesinin düşük olduğu, ancak 48 saat uygulamasından sonra bunun artış gösterdiği, 192 saat uygulamasından sonra ise hala yüksek seviyelerini koruduğu belirlenmiştir. Bu bulgumuz ise Xiao vd.

(2007), pirinçte 200 mM NaCl uygulamalarından sonra (1, 3, 6, 18, 36 ve 72 saat) dehidrin geninin ifadesinin zaman içinde artış gösterdiği bulgusu ile uyumludur.

Sonuç olarak, bu çalışmada yer alan armut, ahlat ve ayva genotiplerinin mikro sürgünleri *in vitro* koşullarda besin ortamında NaCl+CaCl₂.2H₂O tuz konsantrasyonlarının artışı ile birlikte farklı düzeylerde sürgünlerde büyüme ve gelişme özellikleri bakımından gerilik ve zararlanmalar göstermiştir. Yüksek tuz konsantrasyonlarında ortamda çözünebilir madde kapsamındaki artışının bir sonucu olarak osmotik potansiyelin yükselmesi ve iyonların toksik etkisi nedeniyle tuzlu koşullarda bitkiler strese girmektedir (Sotiropoulos vd. 2006). Bitkiler tuzluluğa karşı çeşitli mekanizmalar geliştirmiştir. Bu mekanizmalar bir enerji tüketimini gerektirmektedir. Stres altında osmotik düzenlemeler için kullanılan organik bileşiklerin yapımında ihtiyaç duyulan enerji, bitkilerin gelişimi için kullanılmadığından onların büyüme ve gelişmelerini sınırlandırabilmektedir (Stavarek ve Rains 1984). Ayrıca gövde su potansiyeli ve yaprak iç dış CO₂ oranlarının NaCl uygulamasıyla azalması fotosentetik düşüşe ve bitkideki su potansiyelindeki azalmayla uyarılan stoma kapanmasına neden olabilmektedir. Farklı bitki genotiplerinin tuz stresine toleranslığı bu bitkilerde yapraklara Na⁺ ve Cl⁻ taşınımını sınırlayan, gövdede tuzu dışlayan mekanizmalara sahip oluşları ile açıklanabilmektedir (Matsumoto vd. 2006b, Chatzissavvidis vd. 2008).

Çalışmamızda Ahlat-3, Quince A ve Ankara armudu genotiplerinin mikro sürgünlerinin özellikle yüksek tuz konsantrasyonlarında (225 mM NaCl+22.5 mM CaCl₂.2H₂O ve 300 mM NaCl+30 mM CaCl₂.2H₂O) canlılıklarını yüksek oranlarda (%97.16-80.50) devam ettirmesi bunların tuz stresine karşı toleranslı olabileceği kanaatini doğurmaktadır. Bu genotiplerin, 225 mM NaCl+22.5 mM CaCl₂.2H₂O tuzluluk stresi altında dehidrin gen ifadesi daha erken olan genotipler kapsamında yer aldığı dikkat çekmektedir. İleriki çalışmalarda tuz stresinin moleküler mekanizmasının aydınlatılması amacıyla bu genotiplerde dehidrin gen ifadesi için tuz stresi altında uzun zaman dilimlerinin yanında daha kısa zaman dilimlerinin (0-48 saat) detaylı incelenmesi önerilmektedir.

Bu çalışmada, mikro sürgünlerin köksüz olması nedeni ile stres cevabını alabilmek için uygulanmış olan yüksek tuz konsantrasyonu (225 mM NaCl+22.5 mM CaCl₂.2H₂O) muhtemelen osmotik stres oranlarının üzerinde kalmıştır. Bu yüksek tuz uygulaması ile iyon dengesinin bozulması, buna ek olarak genotip farklılıkları, gen ifadesinde özellikle zamana göre farklılıklar oluşturmuştur. Bu nedenle ileri dönemlerde köklü mikro sürgünler ya da bitkiler ile düşük tuz konsantrasyonlarında yürütülecek çalışmalar ile dehidrin gen ifadesi-zaman ilişkileri daha net ortaya çıkabilecektir.

KAYNAKLAR

- Al Mansoori, T.A., Alaa El-Deen, M.N. and Caligari, P.D.S. 2007. Evaluation of *in vitro* screening techniques for salt tolerance in date palm. *Acta Horticulturae*, 736; 301-307.
- Alcazar, R., Marco, F., Cuevas, J.C., Patron, M., Ferrando, A., Carrasco, P., Tiburcio, A.F. and Altabella, T. 2006. Involvement of polyamines in plant response to abiotic stress. *Biotechnology Letters*, 28; 1867-1876.
- Andreu, P., Arbeloa, A., Lorente, P. and Marin, J.A. 2011. Early detection of salt stress tolerance of *Prunus* rootstocks by excised root culture. *HortScience*, 46 (1); 80-85.
- Anonim. 2014. Web Sitesi: <http://www.khgm.gov.tr>, Erişim Tarihi: 20.04.2014.
- Anonymous. 2009. Web Sitesi: <http://frodo.wi.mit.edu>, Erişim Tarihi: 01.02.2009.
- Anonymous. 2012. Web Sitesi: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>, Erişim Tarihi: 15.03.2012.
- Anonymous. 2014. Web Sitesi: <http://faostat.fao.org>, Erişim Tarihi: 20.04.2014.
- Artlip, T.S., Callahan, A.M., Bassett, C.L. and Wisniewski, M.E. 1997. Seasonal expression of a dehydrin gene in sibling deciduous and evergreen genotypes of peach (*Prunus persica* [L.] Batsch). *Plant Molecular Biology*, 33; 61-70.
- Artlip, T.S. and Wisniewski, M.E. 1997. Tissue-specific expression of a dehydrin gene in one-year-old 'Rio Oso Gem' peach trees. *Journal of The American Society for Horticultural Science*, 122; 784-787.
- Aruani, M.C., Barnes, N., Striebeck, G., Osre, B. and Machuca, Y. 2011. Physical and physico-chemical properties of saline soils and effects on yield and quality of 'Williams' pear in the Upper Rio Negro Valley, Argentina. *Acta Horticulturae*, 909; 303-308.
- Awang, Y.B. and Atherton, J.G. 1994. Salinity and shading effects on leaf water relations and ionic composition of strawberry plants grown on rockwool. *Journal of Horticultural Science*, 62(2); 377-383.

- Aygün, A., Şan, B., Koltarla, A., Erdoğan, V., Güneş, N. ve Dumanoglu, H. 2007. Ankara armudu klonlarının sürgün ucu kültürü ile *in vitro* çoğaltımı.V. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi. 4-7 Eylül 2007. Bildiriler Kitabı, Cilt: 1, s. 202-206; Erzurum.
- Aziz, B.A., Suraya, A.N. and Zain, H.S.M. 2011. The effect of NaCl on the mineral nutrient and photosynthesis pigments content in pineapple (*Ananas comosus*) *in vitro* plantlets. *Acta Horticulturae*, 902; 245-251.
- Bahmani, R., Gholami, M., Mozafari, A.A. and Alivaisi, R. 2012. Effects of salinity on *in vitro* shoot proliferation and rooting of apple rootstock MM 106. *World Applied Sciences Journal*, 17(3); 292-295.
- Banuls, J., Legaz, F. and Primo-Millo, E. 1991. Salinity-calcium interactions on growth and ionic concentration of *Citrus* plants. *Plant and Soil*, 133; 39-46.
- Barakat, M.N. and Abdel-Latif, T.H. 1996. *In vitro* selection of wheat callus tolerant to high levels of salt and plant regeneration. *Euphytica*, 91; 127-140.
- Bartelsa, D. and Sunkara, R. 2005. Drought and salt tolerance in plants. 2005. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 24; 23-58.
- Bartels, D. and Sunkar, R. 2005. Drought and salt tolerance in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 24; 23-58.
- Bassett, C.L., Wisniewski, M.E., Artlip, T.S, Richart, G., John, L., Norelli, G.J and Farrell, J.R. 2009. Comparative expression and transcript initiation of three peach dehydrin genes. *Planta*, 230(1); 107-118.
- Bernstein, L. 1975. Effects of salinity and sodicity on plant growth. *The Annual Review of Phytopathology*, 13; 295-312.
- Bhattarai, T. and Fettig, S. 2005. Isolation and characterization of a dehydrin gene from *Cicer pinnatifidum*, a drought-resistant wild relative of chickpea. *Physiologia Plantarum*, 123; 452-458.
- Boland, A.M., Martin, S. and Jerie, P. 1997. Effects of saline irrigation on fruit growth of peach and nectarine. *Acta Horticulturae*, 449; 615-622.

- Bracci, T., Minnocci, A. and Sebastiani, L. 2008. *In vitro* olive (*Olea europaea* L.) cvs Frantoio and Moraiolo microshoot tolerance to NaCl. *Plant Biosystems*, 142; 563-571.
- Bresler, E., McNeal, B.L. and Carter, D.L. 1982. *Saline and Sodic Soils-Principles-Dynamics-Modeling*. Springer, 236 p., Berlin.
- Brini, F., Hanin, M., Lumbreras, V., Amara, I., Khoudi, H., Hassairi, A., Pages, M. and Masmoudi, K. 2007. Overexpression of wheat dehydrin DHN-5 enhances tolerance to salt and osmotic stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Reports*, 26(11); 2017-2026.
- Chartzoulakis, K.S., Therios, I.N. and Misopolinos, N.D. 1995. Growth, ion content and photosynthetic performance of salt-stressed kiwifruit plants. *Irrigation Science*, 16; 23-28.
- Chatzissavvidis, C., Veneti, G., Papadakis, I. and Therios, I.N. 2008. Effect of NaCl and CaCl₂ on the antioxidant mechanism of leaves and stems of the rootstock CAB-6P (*Prunus cerasus* L.) under *in vitro* conditions. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 95; 37-45.
- Chauhan, R.P.S., Chauhan, C.P.S. and Kumar, D. 1980. Free proline accumulation in cereals in relation to salt tolerance. *Plant and Soil*, 57; 167-175.
- Chelli-Chaabouni, A., Mosbah, A.B., Maalej, M., Gargouri, K., Gargouri-Bouزيد, R. and Drira, N. 2010. *In vitro* salinity tolerance of two pistachio rootstocks: *Pistacia vera* L. and *P. atlantica* Desf. *Environmental and Experimental Botany*, 69; 302-312.
- Chinnusamy, V., Jagendorf, A. and Zhu, J.K. 2005. Understanding and improving salt tolerance in plants. *Crop Science*, 45; 437-448.
- Cramer, M.D. and Lips, S.H. 1995. Enriched rhizosphere CO₂ concentrations can ameliorate the influence of salinity on hydroponically grown tomato plants. *Physiologia Plantarum*, 94; 425-432.
- Creda, A., Nieves, M. and Guillen, M.G. 1990. Salt tolerance of lemon tress as affected by rootstock. *Irrigation Science*, 11; 245-249.
- Çavuşoğlu, K. ve Kabar, K. 2008. Bazı bitki büyüme düzenleyicilerinin tuzlu koşullar altındaki arpa tohumlarının çimlenmesi üzerindeki etkilerinin karşılaştırılması. *Fırat Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 20(1); 43-55.

- Dodds J.H. and Roberts, L.W. 1993. Experiments in Plant Tissue Culture. Cambridge University Press, 231 p., New York.
- Dolcet-Sanjuan, R., Mok, D.W.S. and Mok, M.C. 1990. Micropropagation of *Pyrus* and *Cydonia* and their responses to Fe-limiting conditions. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 21; 191-199.
- Donnini, S., Cinelli, F., Sensale, L., Muleo, R., Zocchi, G. and Ranieri, A. 2008. Pear plantlets cultured 'in vitro' under lime-induced chlorosis display a better adaptive strategy than quince plantlets. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 93; 191-200.
- Donnini, S., Castagnab, A., Ranierib, A. and Zocchia, G. 2009. Differential responses in pear and quince genotypes induced by Fe deficiency and bicarbonate. *Journal of Plant Physiology*, 166; 1181-1193.
- Dziadczyk, P., Bolibok, H., Tyrka, M. and Hortynski, J.A. 2003. *In vitro* selection of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) clones tolerant to salt stress. *Euphytica*, 132; 49-55.
- Erturk, U., Sivritepe, N., Yerlikaya, C., Bor, M., Ozdemir, F. and Turkan, I. 2007. Responses of the cherry rootstock to salinity *in vitro*. *Biologia Plantarum*, 51(3); 597-600.
- Flower, T.J., Troke, P.F. and Yeo, A.R. 1977. The mechanism of salt tolerance in halophytes. *Annual Review of Plant Physiology*, 28; 89-252.
- Gambino, G., Perrone, I. and Gribaudo, I.A. 2008. Rapid and effective method for RNA extraction from different tissues of grapevine and other woody plants. *Phytochemical Analysis*, 19(6); 520-525.
- Garcia-Agustin, P. and Primo-Millo, E. 1995. Selection of a NaCl tolerant *Citrus* plant. *Plant Cell Reports*, 14; 314-318.
- Garcia-Banuelos, M.L., Gardea, A.A., Winzerling, J.J. and Vazquez-Moreno, L. 2009. Characterization of a midwinter-expressed dehydrin (DHN) gene from apple trees (*Malus domestica*). *Plant Molecular Biology Reporter*, 27; 476-487.
- Ghaleb, W.S., Sawwan, J.S., Akash, M.W. and Al-Abdallat, A.M. 2010. *In vitro* response of two *Citrus* rootstocks to salt stress. *International Journal of Fruit Science*, 10(1); 40-53.

- Ghosh, S.C., Asanuma, K., Kusutani, A. and Toyota, M. 2001. Effect of salt stress on some chemical components and yield of potato. *Soil Science and Plant Nutrition*, 47; 467-475.
- Gonzalez-Rosas, H., Salazar-Garcia, S., Ramirez-Reyes, G., Rodriguez-Ontiveros, J.L. and Ramos-Villasenor, A.C. 2003. Preliminary results on *in vitro* selection for tolerance to chloride excess in avocado. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 9(1); 39-43.
- Gorham, J., Wyn Jones, R.G. and McDonnell, E. 1985. Some mechanisms of salt tolerance in crop plants. *Plant and Soil*, 89; 15-40.
- Grattan, S.R. and Grieve, C.M. 1999. Salinity-mineral nutrient relation in horticultural crops. *Scientia Horticulturae*, 78; 127-157.
- Groppa, M.D. and Benavides, M.P. 2008. Polyamines and abiotics stress: recent advances. *Amino Acids*, 34; 35-46.
- Habibi, F. and Amiri, M.E. 2013. Influence of *in vitro* salinity on growth, mineral uptake and physiological responses of two *Citrus* rootstocks. *International Journal of Agronomy and Plant Production*, 4; 320-326.
- Hamrouni, L., Abdallah, F.B., Chedly Abdelly, C. and Ghorbel, A. 2008. *In vitro* culture: a simple and efficient way for salt-tolerant grapevine genotype selection. *Plant Biology and Pathology*, 331(2); 152-163.
- Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., Zhu, J.K. and Bohnert, H.J. 2000. Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual Review of Plant Physiology*, 51; 463-499.
- Hekmetshoar, H. 1999. *Plant Physiology Under Stress*. Tabriz University Press, 345 p., Tabriz.
- Hellebust, J.A. 1976. Osmoregulation. *Annual Review of Plant Physiology*, 27; 485-506.
- Hernandez-Lucero, E., Rodriguez-Hernandez, A., Ortega-Amaro, M.A. and Jimenez-Bremont, J.F. 2014. Differential expression of genes for tolerance to salt stress in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Molecular Biology Reporter*, 32; 318-327.
- Jackson, J.E. 2005. *Biology of Apples and Pears*. Cambridge University Press, 488 p., New York.

- Kumari, G., Jyothisna, K.G., Giridara, K.S., Thippeswamy, M., Annapurnadevi, A., Thimma, N.S. and Chinta, S. 2007. Effect of salinity on growth and proteomic changes in two cultivars of mulberry (*Morus alba* L.) with contrasting salt tolerance. *Indian Journal of Biotechnology (IJBT)*, 6; 508-518.
- Kalefetoğlu, T. ve Ekmekçi, Y. 2005. The effects of drought on plants and tolerance mechanisms (Review). *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 18(4); 723-740.
- Koç, S. 2005. Fasulyelerde Tuzluluğa Tolerans Bakımından Genotipsel Farklılıkların Erken Bitki Gelişim Aşamasında Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Koc, N.K., Bas, B., Koc, M. and Kusek, M. 2009. Investigations of *in vitro* selection for salt tolerant lines in sour orange (*Citrus aurantium* L.). *Biotechnology*, 8; 155-159.
- Kosova, K., Vitamvas, P. and Prasil, I.T. 2007. The role of dehydrins in plant response to cold. *Biologia Plantarum*, 51(4); 601-617.
- Köksal, A.İ., Dumanoğlu, H. ve Güneş, N. 2002. Ankara Armudu. Ankaralılar Vakfı Yayınları, No: 3, Ajans-Türk Basın ve Basım A.Ş., 51 s., Ankara.
- Lauchli, A. and Lutge, U. 2004. *Salinity: Environment-Plants-Molecules*. Kluwer, 552 p., The Netherlands.
- Leopard, A.C. and Willing, R.P. 1984. Evidence for toxicity effects of salt on membranes, In: *Salinity Tolerance in Plant*. Staplea, R.C. and Toenniessen, G.H. (eds), John Wiley and Sons, Inc., 67-76, New York.
- Levi, A., Panta, G.R., Parmentier, C.M., Muthalif, M.M., Arora, R., Shanker, S. and Rowland, L.J. 1999. Complementary DNA cloning, sequencing and expression of an unusual dehydrin from blueberry floral buds. *Physiologia Plantarum*, 107(1); 98-109.
- Levitt, J. 1972. *Responses of Plants to Environmental Stresses*. Academic Press, Inc. 697 p., New York.
- Liang, D., Xia, H., Wu, S. and Ma, F. 2012. Genome-wide identification and expression profiling of dehydrin gene family in *Malus domestica*. *Molecular Biology Reports*, 39; 10759-10768.

- Lloyd, J., Kriedeman, P.E. and Aspinall, D. 1990. Contrast between *Citrus* species in response to salinisation: an analysis of photosynthesis and water relations for different rootstock-scion combination. *Physiologia Plantarum*, 78; 236-246.
- Lombard, P.B. and Westwood, M.N. 1987. Pear rootstocks, In: Rootstocks for Fruit Crops. Rom, R.C. and Carlson, R.F. (eds), A Wiley-Interscience Publication, John Wiley and Sons, Inc., 145-183, New York.
- Mahajan, S. and Tuteja, N. 2005. Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 444; 139-158.
- Mahmoudi, S. and Hakimiyan, M. 1995. Principles of Soil. Tehran University Press, 475 p., Tehran.
- Matsumoto, K., Tamura, F., Chun, J.P. and Tanabe, K. 2006a. Native Mediterranean *Pyrus* rootstock, *P. amygdaliformis* and *P. elaeagnifolia*, present higher tolerance to salinity stress compared with Asian Natives. *Japanese Society for Horticultural Science*, 75(6); 450-457.
- Matsumoto, K., Chun, J.P., Tamura, F., Kamamoto, Y. and Tanabe, K. 2006b. Salt tolerance in *Pyrus* species is linked to levels of Na and Cl translocation from roots to leaves. *Japanese Society for Horticultural Science*, 75(5); 385-391.
- Matsumoto, K., Tamura, F., Chun, J.P., Ikeda, T., Imanishi, K. and Tanabe, K. 2007. Enhancement in salt tolerance of Japanese pear by using *Pyrus betulaefolia* rootstock. *Horticulture Research*, 6(1); 47-52.
- Matsumoto, K., Tamura, F., Chun, J.P., Zhang, C. and Tanabe, K. 2008. Influences of NaCl on the growth, photosynthesis, ion and water relations in rootstocks of Japanese pear. *Acta Horticulturae* 772; 231-235.
- Mayor, A., Pineda, B., Garcia-Abellan, J.O., Anton, T., Garcia-Sogo, B., Sanchez-Bel, P., Flores, F.B., Atares, A., Angosto, T., Pintor-Toro, J.A., Moreno, V. and Bolarin, M.C. 2012. Overexpression of dehydrin *tas14* gene improves the osmotic stress imposed by drought and salinity in tomato. *Journal of Plant Physiology*, 169(5); 459-468.
- Molassiotis, A.N., Sotiropoulos, T., Tanou, G., Kofidis, G, Diamantidis, G. and Therios, E. 2006. Antioxidant and anatomical responses in shoot culture of the apple rootstock MM 106 treated with NaCl, KCl, mannitol or sorbitol. *Biologia Plantarum*, 50; 331-338.

- Montoliu, A., Lopez-Climent, M.F., Arbona, V., Perez-Clemente, R.M. and Aurelio, Gomez-Cadenas, A. 2009. A novel *in vitro* tissue culture approach to study salt stress responses in *Citrus*. *Plant Growth Regulation*, 59; 179-187.
- Munns, R. 2005. Genetic and salt tolerance: bringing them together. *New Phytologist*, 167; 645-663.
- Musacchi, S., Quartieri, M. and Tagliavini, M. 2006. Pear (*Pyrus communis*) and quince (*Cydonia oblonga*) roots exhibit different ability to prevent sodium and chloride uptake when irrigated with saline water. *European Journal of Agronomy*, 24; 268-275.
- Myers, B.A., West, D.W., Callinan, L. and Hunter, C.C. 1995. Long term effects of saline irrigation on the field and growth of mature Williams pear trees. *Irrigation Science*, 16; 35-46.
- Okubo, M., Furukawa, Y. and Sakuratani, T. 2000. Growth, flowering and leaf properties of pear cultivars grafted on two Asian pear rootstock seedlings under NaCl irrigation. *Scientia Horticulturae*, 85; 91-101.
- Okubo, M. and Sakuratani, T. 2000. Effects of sodium chloride on survival and stem elongation of two Asian pear rootstock seedlings. *Scientia Horticulturae*, 85; 85-90.
- Ozturk, Z.N., Talame, V., Deyholos, M., Michalowski, C.B., Galbraith, D.W., Gozukirmizi, N., Tuberosa, R. and Bohnert, H.J. 2002. Monitoring large-scale changes in transcript abundance in drought and salt stressed barley. *Plant Molecular Biology*, 48; 551-573.
- Palombi, M.A., Lombardo, B. and Caboni, E. 2007. *In vitro* regeneration of wild pear (*Pyrus pyraster* Burgsd) clones tolerant to Fe-chlorosis and somaclonal variation analysis by RAPD markers. *Plant Cell Reports*, 26; 489-496.
- Perez-Tornero, O., Tallon, C.I., Porras, I. and Navarro, J.M. 2009. Physiological and growth changes in micropropagated *Citrus macrophylla* explants due to salinity. *Journal of Plant Physiology*, 166; 1923-1933.
- Picchoni, G.A., Miyamoto, S. and Storey, J.B. 1990. Salt effects on growth and ion uptake of pistachio rootstock seedling. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 115; 647-653.

- Plaut, Z. 1997. Irrigation with low-quality water: effects on productivity, fruit quality and physiological processes of vegetable crops. *Acta Horticulturae*, 449; 591-597.
- Ponnamperuma, F.N. 1984. Role of cultivar tolerans in inceasing rice production on saline lands, In: *Salinity Tolerance in Plants*. Staples, R.C. and Toenniessen, G.H. (eds), John Wiley and Sons, Inc., 255-271, New York.
- Porcel, R., Azcon, R. and Juan Ruiz-Lozano, M. 2005. Evaluation of the role of genes encoding for dehydrin proteins (LEA D-11) during drought stress in arbuscular mycorrhizal *Glycine max* and *Lactuca sativa* plants. *Journal of Experimental Botany*, 56; 1933-1942.
- Puhakainen, T., Hess, M.W., Makela, P., Svensson, J., Heino, P. and Palva, E. T. 2004. Overexpression of multiple dehydrin genes enhances tolerance to freezing stress in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology*, 54; 743-753.
- Rai, A. and Takabe, T. 2006. *Abiotic Stress Tolerance in Plants. Toward the Improvement of Global Environment and Food*. Springer, 256 p., The Netherlands.
- Rengasamy, P. 2006. World salinization with emphasis on Australia. *Journal of Experimental Botany*, 57; 1017-1023.
- Rhodes, D. and Hanson, A.D. 1993. Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology*, 44; 357-384.
- Saavedra, L., Svensson, J., Carballo, V., Izmendi, D., Welin, B. and Vidal, S. 2006. A dehydrin gene in *Physcomitrella patens* is required for salt and osmotic stress tolerance. *The Plant Journal*, 45; 237-249.
- Sairam, R.K. and Tyagi, A. 2004. physiology and molecular biology of salinity stres tolerances in plants. *Current Sciences*, 86; 407-421.
- Sakamoto, A. and Murata, N. 2002. The role of *Glycine betaine* in the protection of plants from stres: clues from transgenic plants. *Plant Cell and Environment*, 25; 163-171.
- Savitri, E.S., Basuki, N., Aini, N. and Arumingtyas, E.L. 2013. Identification and characterization drought tolerance of gene LEA-D11 soybean (*Glycine max* L. Merr) based on PCR-sequencing. *American Journal of Molecular Biology*, 3; 32-37.

- Schmutz, U. and Ludders, P. 1993. Physiology of saline stress in mango rootstock. *Acta Horticulture*, 341; 160-167.
- Shannon, M.C. 1984. Breeding, selection and the genetics of salt tolerance, In: *Salinity Tolerance in Plant*. Stales, R.C. and Toenniessen, G.H. (eds), John Wiley and Sons, Inc., 231-254, New York.
- Shannon, M.C. and Grieve, G.M. 1999. Tolerance of vegetable crops to salinity. *Scientia Horticulture*, 78; 5-38.
- Sharma, S. and Sharma, N. 2008. Rootstocks affect growth, water relations, gas exchange, and anatomy of 'Flemish Beauty' pear under water stress. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 83; 658-662.
- Shen, Y., Tang, M.J., Hu, Y.L. and Lin, Z.P. 2004. Isolation and characterization of a dehydrin-like gene from drought-tolerant *Boea crassifolia*. *Plant Science*, 166; 1167-1175.
- Shiblia, R., Mohammada, M., Abu-Eina, A. and Shatnawia, M. 2000. Growth and micronutrient acquisition of some apple varieties in response to gradual *in vitro* induced salinity. *Journal of Plant Nutrition*, 23; 1209-1215.
- Shibli, R.A. and Al-Juboory, K.H. 2002. Comparative responses of 'Nabali' olive microshoot, callus and suspension cell cultures to salinity and water deficit. *Journal of Plant Nutrition*, 25; 61-74.
- Shibli, R.A., Shatnawi, M.A. and Swaidat, I.Q. 2003. Growth, osmotic adjustment and nutrient acquisition of bitter almond under induced sodium chloride salinity *in vitro*. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 34; 1969-1979.
- Sivritepe, N. and Eriş, A. 1999. Determination of salt tolerance in some grapevine cultivars under *in vitro* conditions. *Turkish Journal of Biology*, 23; 473-485.
- Sotiropoulos, T.E. and Dimassi, K.N. 2004. Response to increasing rates of boron and NaCl on shoot proliferation and chemical composition of *in vitro* kiwifruit shoot cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 79; 285-289.
- Sotiropoulos, T.E., Fotopoulos, S., Dimassi, K.N. and Tsirakoglou, V. 2006. Response of the pear rootstock to boron and salinity *in vitro*. *Biologia Plantarum*, 50; 779-781.

- Sotiropoulos, T.E. 2007. Effect of NaCl and CaCl₂ on growth and contents of minerals, chlorophyll, proline and sugars in the apple rootstock M 4 cultured *in vitro*. *Biologia Plantarum*, 51; 177-180.
- Sotiropoulos, T.E., Therios, I.N., Tsirakoglou, V. and Dimassi, K.N. 2007. Response of the quince genotypes BA 29 and EMA used as pear rootstocks to boron and salinity. *International Journal of Fruit Science*, 6; 93-101.
- Stavarek, S.J. and Rains, D.W. 1984. The development of tolerance to mineral stress. *HortScience*, 19; 377-382.
- Storey, R. and Walker, R.R. 1999. *Citrus* and salinity. *Science Horticulturae*, 78; 39-81.
- Szabolcs, I. 1989. Salt-affected soils. CRC Press, 274 p., Florida.
- Tal, M. 1984. Physiological genetics of salt resistance in higher plants: studies on the level of the whole plant and isolated organs, tissues and cells, In: *Salinity Tolerance in Plant*. Stales, R.C. and Toenniessen, G.H. (eds), John Wiley and Sons, Inc., 301-320, New York.
- Tattini, M., Gucci, R., Coradeschi, M.A., Ponzio, C. and Everard, J.D. 1995. Growth, gas Exchange and ion content in *Olea europaea* plants during salinity stress and subsequent relief. *Physiologia Plantarum*, 95; 203-210.
- Therios, I.N. and Misopolinos, N.D. 1988. Genotype responses to sodium chloride salinity of four major olive cultivars (*Olea europaea* L.). *Plant and Soil*, 106; 105-111.
- Thiagarajan, T., Recinos, H. and Tillett, A. 2013. Effect of salinity on callus formation and organogenesis of red Kidney beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *European Scientific Journal*, 9; 357-368.
- Thiyagarajah, M., Fry, S.C. and Yeo, A.R. 1996. *In vitro* salt tolerance of cell wall enzymes from halophytes and glycophytes. *Journal of Experimental Botany*, 47; 1717-1724.
- Troncoso, J., Linan, J., Cantos, M., Garcia, J.L. and Troncoso, A. 2008. *In vitro* selection of salt-tolerant olive clones. *Acta Horticulturae*, 791; 217-224.
- Turhan, E., Dardeniz, A. ve Müftüoğlu, N.M. 2005. Bazı Amerikan asma anaçlarının tuz stresine toleranslarının belirlenmesi. *Bahçe*, 34; 11-19.
- Vijayan, K., Chakraborti, S.P. and Ghosh, P.D. *In vitro* screening of mulberry (*Morus* spp.) for salinity tolerance. *Plant Cell Reports*, 22; 350-357.

- Wang, K., Zhang, L., Gao, M., Lv, L., Zha, Y., Zhang, L., Li, B., Han, M. and Alva, A.K. 2013. Influence of salt stress on growth and antioxidant responses of two *Malus* species at callus and plantlet stages. *The Pakistan Journal of Botany*, 45; 375-381.
- Wang, W., Vinocur, B. and Altman, A. 2003. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*, 218; 1-14.
- Wisniewski, M.E., Bassett, C.L., Renaut, J., Farrell, R.Jr., Tworkoski, T. and Artlip, T.S. 2006. Differential regulation of two dehydrin genes from peach (*Prunus persica*) by photoperiod, low temperature and water deficit. *Tree Physiology*, 26; 575-584.
- Wisniewski, M., Bassett, C., Norelli, J., Macarisin, D., Artlip, T., Gasic, K. and Korban, S. 2008. Expressed sequence tag analysis of the response of apple (*Malus x domestica* 'Royal Gala') to low temperature and water deficit. *Physiologia Plantarum*, 133; 298-317.
- Wu, Q.S. and Zou, Y. 2009. Adaptive responses of birch-leaved pear (*Pyrus betulaefolia*) seedlings to salinity stress. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj*, 37; 133-138.
- Wyn, J.R.G. and Storey, R. 1978. Salt stress and comparative physiology in the gramineae. IV. comparison of salt stress in *Spartina x townsendii* and three barely cultivars. *Australian Journal of Plant Physiology*, 5; 839-850.
- Xiao, B., Huang, Y., Tang, N. and Xiong, L. 2007. Over-expression of a LEA gene in rice improves drought resistance under the field conditions. *Theoretical and Applied Genetics*, 115; 35-46.
- Xu, J., Zhang, Y.X., Wei, W., Han, L., Guan, Z.Q., Wang, Z. and Chai, T.Y. 2008a. *BjDHNs* confer heavy-metal tolerance in plants. *Molecular Biotechnology*, 38; 1073-1085.
- Xu, J., Zhang, Y., Guan, Z., Wei, W., Han, L. and Chai, T. 2008b. Expression and function of two dehydrins under environmental stresses in *Brassica juncea* L. *Molecular Breeding*, 21(4); 431-438.

- Yakubov, B., Barazani, O., Shachack, A., Rowland, L.J., Shoseyov, O. and Goldhirsh, A.G. 2005. Cloning and expression of a dehydrin-like protein from *Pistacia vera* L. *Trees*, 19; 224-230.
- Yang, Y., He, M., Zhu, Z., Li, S., Xu, Y., Zhang, C., Singer, S.D. and Wang, Y. 2012. Identification of the dehydrin gene family from grapevine species and analysis of their responsiveness to various forms of abiotic and biotic stress. *BMC Plant Biology*, 12; 140.
- Yeo, A. 1998. Molecular biology of salt tolerance in the context of whole-plant physiology. *Journal of Experimental Botany*, 49; 915-929.
- Yupsanis, T., Kefalas, P.S., Elefteriou, P. and Kotinis, K. 2001. RNase and DNase activities in the alfalfa and lentil grown in isoosmotic solutions of NaCl and Mannitol. *Journal of Plant Physiol*, 158; 921-927.
- Zekri, M. and Parsons, L.R. 1990. Calcium influences growth and leaf mineral concentrations of *Citrus* under saline conditions. *HortScience*, 25(7); 784-780.
- Zhu, J.K. 2001. Cell signaling under salt, water and cold stresses. *Current Opinion in Plant Biology*, 4; 401-406.
- Zhu, J.K. 2002. Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 53; 41-48.
- Zhu, J.K. 2003. Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Current Opinion in Plant Biology*, 6; 441-445.
- Ziska, L.H., Seeman, J.R. and Dejong, T.M. 1990. Salinity induced limitation on photosynthesis in *Prunus salicina*, a deciduous tree species. *Plant Physiology*, 93; 864-870.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Javad JAVADİSABER

Doğum Yeri : Tebriz

Doğum Tarihi : 27/07/1974

Medeni Hali : Evli

Yabancı Dili : Türkçe, Farsca ve İngilizce

Eğitim Durumu

Lise : Seghatol Islam High School, Tebriz, İran, 1992.

Lisans : Tebriz Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, 1997.

Yüksek Lisans: Tebriz Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü,
Eylül 1997-Haziran 2000.

Çalıştığı Kurumlar

Seed and Plant Improvement Institute (SPII), Department of Horticulture, Karaj, İran,
2000-2004.

Seed and Plant Improvement Institute (SPII), Genetics and Genetic Resources Research
Department, Karaj, İran, 2004-2007.

Yayınlar

Hakemli Dergilerdeki Yayınlar

Grigorian, V., Javadisaber, J., Kasrai, R., Motalebi Azar, A and Dejampour, J. 2002.
Determination of sodium chloride tolerances in seedlings of some almond
cultivars. Iranian Journal of Horticultural Science and Technology, 3(1-2); 1-14.

Dumanoğlu, H., Erdoğan, V., Aygün, A. ve Javadisaber, J. 2009. Ankara ilinde “Granny
Smith” elma çeşidinde ekstrem yaz iklimi koşullarının meyve kalite özellikleri
üzerine etkisi. Tarım Bilimleri Araştırma Dergisi, 2(2); 193-199.

Ulusal Kongrelerde Sunulan Bildiriler

Javadisaber, J., Mozaffary, J. and Zarifi, E. 2005. Preliminary study of morphological
diversity of three wild almond species (*Amygdalus* spp) in Mianjangle station,
Fars. The 4th Iranian Horticultural Sciences Congress. 8-10 November 2005.
Ferdowsi University, Mashhad, Iran.

Zarifi, E. Agayev, Y.M. Hajiloo, J. and Javadisaber, J. 2005. Chromosome studies on
some species of almond (*Amygdalus* spp) from Iran. The 4th Iranian Horticultural
Sciences Congress. 8-10 November 2005, Ferdowsi University, Mashhad, Iran.