



**MARULDA (*Lactuca sativa* L.) TUZ STRESİ ÜZERİNE
MELATONİNİN ETKİLERİNİN MOLEKÜLER VE
FİZYOLOJİK DÜZEYDE BELİRLENMESİ**

Meryem KUKARA

**Yüksek Lisans Tezi
Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı
Bitkisel Biyoteknoloji Bilim Dalı
Prof. Dr. Mahmut Sinan TAŞPINAR**

2019

Her hakkı saklıdır

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**MARULDA (*Lactuca sativa* L.) TUZ STRESİ ÜZERİNE
MELATONİNİN ETKİLERİNİN MOLEKÜLER ve FİZYOLOJİK
DÜZEYDE BELİRLENMESİ**

Meryem KUKARA

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
Bitkisel Biyoteknoloji Bilim Dalı

ERZURUM

2019

Her hakkı saklıdır



TEZ ONAY FORMU

**MARULDA (*Lactuca sativa* L.) TUZ STRESİ ÜZERİNE MELATONİNİN ETKİLERİNİN
MOLEKÜLER VE FİZYOLOJİK DÜZEYDE BELİRLENMESİ**

Prof. Dr. Mahmut Sinan TAŞPINAR danışmanlığında, Meryem KUKARA tarafından hazırlanan bu çalışma, 09/11/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı-Bitkisel Biyoteknoloji Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak **oybirliği / oy çokluğu (/)** ile kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Mahmut Sinan TAŞPINAR

İmza :

Üye : Doç. Dr. Murat AYDIN

İmza :

Üye : Doç. Dr. Emre İLHAN

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu'nun 12/12/2019 tarih ve ...48.../33... nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mehmet KARAKAN
Enstitü Müdürü

Bu çalışma BAP projeleri kapsamında desteklenmiştir.
Proje No:FYL-2019-7164

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildiriş, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

MARULDA (*Lactuca sativa* L.) TUZ STRESİ ÜZERİNE MELATONİNİN ETKİLERİNİN MOLEKÜLER ve FİZYOLOJİK DÜZEYDE BELİRLENMESİ

Meryem KUKARA

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı
Bitkisel Biyoteknoloji Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mahmut Sinan TAŞPINAR

Tuzluluk ürün gelişimini, verimini ve kalitesini etkileyen önemli bir abiyotik stres faktörüdür. Marul tuz stresine oldukça hassas bir bitki olup, tuz stresi marul tarımını etkilemektedir. Bu çalışmada NaCl altındaki marul bitkisinde melatonin uygulamasının yaprak nispi su içeriği (%), klorofil miktarı, hücre membran hasarı (%)’na ait fizyolojik parametrelerdeki değişimler ile DNA metilasyonu ve bazı tuz toleransı ile ilgili genlerin (*SOS1*, *SOS2*, *AKT1*, *NHX1*, *HKT1*) mRNA ifadesine de etkileri incelenmiştir. Böylece, tuz stresinde melatonin uygulamasının tuz toleransında fizyolojik ve moleküler düzeydeki rolü aydınlatılarak marulda tuz toleranslı genotiplerin ıslahına yol gösterici temel moleküler bilgilerin elde edilmesi hedeflenmektedir.

Çalışma sonucunda, NaCl stresinin klorofil miktarı ve nispi su içeriğini azalttığı, hücre membran hasarını arttırdığı belirlenmiştir. Fakat tuzlulukla birlikte melatonin uygulamasının klorofil miktarını ve nispi su içeriğini arttırdığını, hücre membran hasarını azalttığı tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra, elde edilen verilere göre, NaCl stresi altında gen ifadesi analizleri sonucunda Yedikule ve İvanka genotiplerinde *SOS1*, *SOS2*, *AKT1*, *NHX1* ve *HKT1* genlerinin mRNA ifade seviyelerinin arttığı ve melatonin uygulamasında bu genlerin mRNA ifade seviyelerinin azaldığı belirlenmiştir. Diğer taraftan MSAP analizi sonucuna göre, her iki genotipte de kontrole kıyasla NaCl stresinde metilasyon seviyesinde azalma belirlenirken, NaCl stresi altında uygulanan melatoninin ise tuz stresine kıyasla metilasyon seviyelerini artırdığı fakat yine de bu oranın kontrolden daha az olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar melatoninin tuz yanıtta önemli bir bileşen olduğunu göstermiştir.

2019, 76 sayfa

Anahtar Kelimeler: NaCl, melatonin, metilasyon, MSAP

ABSTRACT

Master Thesis

DETERMINATION OF MOLECULAR AND PHYSIOLOGICAL EFFECTS OF MELATONIN ON SALT STRESS IN LETTUCE (*Lactuca sativa* L.)

Meryem KUKARA

Ataturk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Agricultural Biotechnology
Department of Plant Biotechnology

Supervisor: Prof. Dr. Mahmut Sinan TAŞPINAR

Salinity is an important abiotic stress factor that affects plant growth, yield and quality. Lettuce which is a quite sensitive to salt stress and it effects plant production. In this research, effects of melatonin application on salt stressed lettuces were investigated on leaf relative water content (%), amount of chlorophyll, cell membrane damage changes (%), alterations of physiological parameters, DNA methylations and mRNA expressions of some salt tolerance genes (SOS1, SOS2, AKT1, NHX1, HKT1). Thus, it is aimed to obtain basic molecular information leading the breeding of salt tolerant genotypes the lettuce by clarifying the role of melatonin application in salt stress at physiological and molecular level in salt tolerance.

As a result of the study, it was determined that NaCl stress decreased chlorophyll amount and relative water content and increased cell membrane damage. However, it was found that MEL application with salinity increases the amount of chlorophyll and relative water content and reduces cell membrane damage. In addition, it was determined that mRNA expression levels of SOS1, SOS2, AKT1, NHX1 and HKT1 genes were increased in Yedikule and Ivanka genotypes and the melatonin application of these genes decreased mRNA expression levels. On the other hand, according to the results of MSAP analysis, methylation levels of NaCl stress were decreased in both genotypes compared to control, whereas melatonin applied under NaCl stress increased methylation levels compared to salt stress, but this ratio was still less than control. These results showed that melatonin is an important component in salt response.

2019, 76 pages

Keywords: NaCl, melatonin, methylation, MSAP

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışma Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü Bitkisel Biyoteknoloji Laboratuvarı'nda yapılmıştır.

Tez çalışmamı destekleyen üniversitemiz BAP birimine teşekkür ederim.

Yüksek lisans tez çalışmamı hazırlarken değerli yardım ve katkılarından dolayı başta saygıdeğer tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Mahmut Sinan TAŞPINAR olmak üzere hiçbir zaman desteğini esirgemeyen, her zaman yanımda olan tüm zorluklarla başa çıkmamı sağlayan Sayın Doç. Dr. Murat AYDIN'a teşekkür ederim.

Tez çalışmamda yardımlarından dolayı Sayın Araş. Gör. Dr. Esra ARSLAN'a teşekkür ederim.

Bu dönemde beni yalnız bırakmayan değerli dostlarım Sayın Zir. Müh. Esra YAPRAK'a, Sayın Zir. Müh. Sümeyra UÇAR'a, Yük. Zir. Müh. Sedat KARACA'ya, Sayın Doktora Öğrencisi Esma YİĞİDER'e teşekkür ederim.

Bana yaşamım boyunca güvenip desteklerini bir an bile esirgemeyen maddi manevi her zaman destekçim olan başta babam Nihat KUKARA'ya, annem Müzeyyen KUKARA'ya, ablam Şeyma KUKARA'ya ve kardeşim Tuğba KUKARA'ya sonsuz teşekkürler.

Meryem KUKARA

Aralık, 2019

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	14
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	22
3.1. Materyal.....	22
3.1.1 Kullanılan bitkisel materyal	22
3.1.2. Kullanılan alet ve cihazlar	22
3.1.3. Kullanılan çözelti ve solüsyonlar	23
3.2. Yöntem	27
3.2.1. Bitki çimlendirme ortamlarının hazırlanması.....	27
3.2.2. Tohum sterilizasyonu	27
3.2.2.a. Sterilizasyonda kullanılan solüsyonların hazırlanışı	27
3.2.2.b Tohum sterilizasyonun yapılışı	27
3.2.3. Bitki büyütme besin çözeltisinin hazırlanışı	28
3.2.4. Tohum çimlendirilmesi, bitkilerin yetiştirilmesi ve kimyasal ajanların uygulanması.....	28
3.2.4.a. Stres ajanı ve iyileştirici olarak kullanılan kimyasalların hazırlanışı	28
3.2.4.b. Tohum çimlendirilmesi, bitkilerin yetiştirilmesi ve kimyasal ajanların uygulanması	29
3.2.5. Fizyolojik parametreler	29
3.2.5.a. Hücre membran hasarı (%).....	30
3.2.5.b. Nispi su içeriği (%).....	30
3.2.5.c. Klorofil miktarı (SPAD).....	30
3.2.5.d. Fizyolojik parametrelere ait verilerin analizi	31

3.2.6. Moleküler değerlendirmeler	31
3.2.6.a. Gen ifadesi analizi	31
3.2.6.b. MSAP analizi	34
4. ARAşTIRMA BULGULARI	42
4.1. Hücre Membran Hasarı (%)	42
4.2. Nispi Su İçeriği (%).....	44
4.3. Klorofil miktarı (SPAD).....	46
4.4. mRNA İfade Analiz Sonuçları	48
4.5. MSAP Analizleri ve % Polimorfizm.....	53
5. TARTIşMA ve SONUÇ	57
5.1. Sonuç ve neriler	65
KAYNAKLAR	66
ZGEMİř	77

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

%	Yüzde
°C	Santigrat derece
ABA	Absisik asit
Ca	Kalsiyum
cm	Santimetre
CO ₂	Karbondioksit
dNTP	Deoksinükleotit Trifosfat
DREB	Kuraklık Stresi Transkripsiyon Faktörü
EDTA	Etilendiamintetraasetik Asit
ET	Etilen
Et-Br	Etidium Bromid
FAO	Food and Agriculture Organisation
g	Gram
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
HIOMT	Hidroksiindelo-O-metiltransferaz
HKT	Yüksek Afinitili K ⁺ Taşıyıcısı
IAA	İndol-3-asetik asit
IAAld	İndol-3-asetaldehit
JA	Jasmonik asit
K	Potasyum
L	Litre
MEL	Melatonin
mg	Miligram
mg	Miligram
Mg/lt	Miligram/Litre
ml	Mililitre
mL	mililitre
mM	Milimolar
mM	Milimolar

MSAP	Methyl-Sensitive Amplification Polymorphism (Metilasyona duyarlı çoğaltım polimorfizmi)
MEL	Melatonin
Na	Sodyum
NaCl	Sodyum Klorür
NO	Nitrik Oksit
O ₂	Oksijen
PSII	Fotosistem II
qRT-PCR	Kantitatif RT-PCR,
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA (Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA)
RE	Restriksiyon enzim
ROT	Reaktif Oksijen Türleri
RT-PCR	Real Time PCR
SA	Salisilik asit
SAM	S-adenozil-L-metionin
SNAT	Serotonin-N-asetiltransferaz
SOS	Tuza Aşırı Duyarlı
T5H	Triptamin5-hidroksilaz
TA	Taze Ağırlık
TDC	Triptofan dekarboksilaz
TE	Tris-EDTA Tamponu
v/v	Hacim/Hacim
w/v	Ağırlık/Hacim
µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar

ŞEKİLLER DİZİNİ

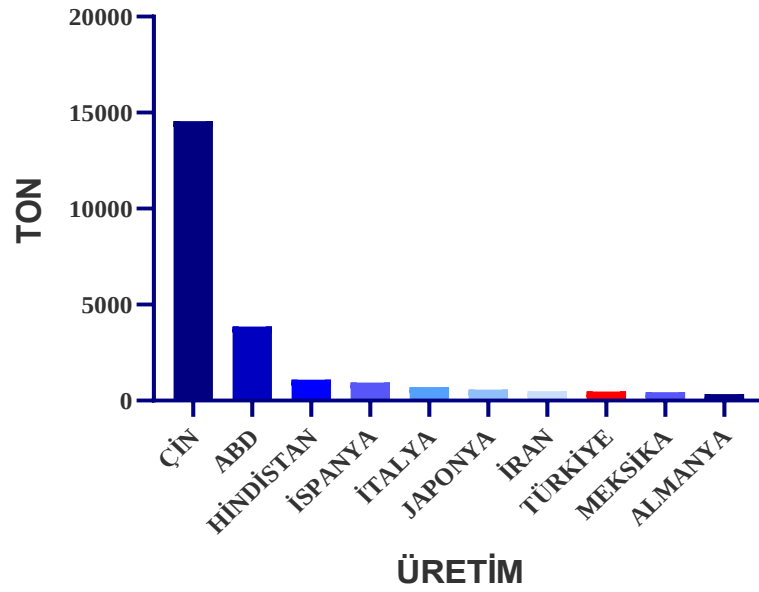
Şekil 1.1. 2014-2017 verilerine göre marul üretiminde ilk 10 ülke.....	1
Şekil 1.2. DNA metilasyon mekanizması	7
Şekil 1.3. MSAP yöntemine genel bakış	8
Şekil 1.4. MEL'in biyosentetik yolu	10
Şekil 1.5. Bir bitki büyüme düzenleyicisi ve biyostimülatör olarak MEL'in etkisi	12
Şekil 4.1. Uygulamalara göre çeşitlerin hücre membran hasarı oranları (%).....	44
Şekil 4.2. Uygulamalara göre genotiplerin nispi su içerikleri (%)	46
Şekil 4.3. Uygulamalara göre çeşitlerin SPAD değerlerine etkisi	48
Şekil 4.4. Tuzluluk stresi ve MEL uygulaması altındaki genotiplerin yapraklarındaki SOS1 geninin ifade değişimleri ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)	49
Şekil 4.5. Tuzluluk stresi ve MEL uygulaması altındaki genotiplerin yapraklarındaki SOS2 geninin ifade değişimleri ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)	50
Şekil 4.6. Tuzluluk stresi ve MEL uygulaması altındaki genotiplerin yapraklarındaki AKT1 geninin ifade değişimleri ($2^{-\Delta\Delta C_t}$).....	51
Şekil 4.7. Tuzluluk stresi ve MEL uygulaması altındaki genotiplerin yapraklardaki NHX1 geninin ifade değişimleri ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)	52
Şekil 4.8. Tuzluluk stresi ve MEL uygulaması altındaki genotiplerin yapraklardaki HKT1 geninin ifade değişimleri ($2^{-\Delta\Delta C_t}$).....	53

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Marul bitkisinin tuzluluk toleransı	3
Çizelge 1.2. MEL'in bitkilerdeki etkileri.....	11
Çizelge 3.1. Çalışma esnasında aşağıdaki alet ve cihazlar kullanılmıştır.....	22
Çizelge 3.2. MS kültür ortamında kullanılan kimyasallar ve miktarlar.....	23
Çizelge 3.3. Hoagland ve Arnon (H2395) kullanılan kimyasallar ve miktarlar	24
Çizelge 3.4. mRNA ifade seviyelerinin belirlenmesinde kullanılan kimyasal ve çözeltiler.....	25
Çizelge 3.5. mRNA ifade seviyelerinin belirlenmesinde kullanılan kimyasal ve çözeltiler.....	26
Çizelge 3.6. MEL çözeltilerinin içeriği.....	29
Çizelge 3.7. Kullanılan primerlerin baz dizilimi ve Tm sıcaklıkları	34
Çizelge 3.8. Kullanılan primer ve adaptörlerin baz dizilimi.....	39
Çizelge 4.1. Uygulamalara göre genotiplerin hücre membran hasarı (%).....	42
Çizelge 4.2. Uygulamalara göre genotiplerin Nisbi su içeriği.....	45
Çizelge 4.3. Uygulamalara göre genotiplerin SPAD değerleri.....	47
Çizelge 4.4. İvanka genotipinde MEL ve NaCl stresi altında DNA metilasyon seviyeleri.....	54
Çizelge 4.5. Yedikule genotipinde MEL ve NaCl stresi altında DNA metilasyon seviyeleri.....	56

1. GİRİŞ

Marul (*Lactuca sativa* L.) Asteraceae familyasına ait birçok ülkede yetiştirilen, salata grubu sebzeler içerisinde en çok tüketilen sebze türü olup; yılın tamamında pazarlarda bulunabilen, kendine döllen, büyük yapraklı tek yıllık bir bitkidir. Önemli bir besin kaynağı olan marul Türkiye'de toplam tarım alanlarının %3,41'ini oluşturan sebze üretim alanları içerisinde %1,19'luk bir paya sahiptir (TÜİK 2018). Dünyadaki toplam marul üretim alanının yaklaşık 1 milyon hektarı Asya'da bulunmaktadır. Türkiye 490,423 ton ile dünya üretiminde sekizinci sıradadır (FAOSTAT 2018).



Şekil 1.1. 2014-2017 verilerine göre marul üretiminde ilk 10 ülke (FAOSTAT 2018)

Marulun morfolojik özellikleri arasında en önemli yeri tüketilen kısmı olan yaprak almaktadır. Yaprakların düz veya kıvrıkcık oluşu ile yaprak rengi önemli birer ayırıcı faktördür. Ayrıca, yaprak şekli ve rengi yanında göbek ve baş oluşturma, yaprak etliliği, gevrekliği ve erkencilik gibi özellikler de ayırıcı faktörler arasında sayılabilir (Vural vd 2000).

100 g marulda; %96 su, 13 cal enerji, 0,9 g protein, 0,1 g yağ, 2,9 g karbonhidrat, 330 IU A vitamini, 6 mg C vitamini, 0,06 mg thiamine ve riboflavin, 0,3 mg niacin, 20 mg Ca, 22 mg P, 0,5 mg Fe, 9 mg Na ve 175 mg K bulunur (Peirce 1987). Marul antioksidanlar, fenolik bileşikler, lif ve karotinoidler gibi sağlığı destekleyen bileşikleri yüksek oranda içermektedir (Caldwell and Britz 2006; Du *et al.* 2014). Ayrıca marulun antosiyaninler ve diğer flavonoidlerin sentezini teşvik etmek veya fenilalanin amonyak liyaz (PAL) biyosentezinden sorumlu genleri aktive etmek yoluyla abiyotik streslerin etkilerine karşı bitkilerde koruma mekanizmalarını araştırmak için ideal bir bitki olduğu rapor edilmiştir (Lee *et al.* 2013). Modern marul yetiştiriciliğinin kayda değer başarıları, hastalık/böcek direnci, geliştirilmiş kalite ve artan verim alanlarında yapılmıştır. Bu özellikler *in vitro* koşullarda bitki kültür uygulamaları, biyoteknolojik yöntemler ve gen transfer stratejileri kullanılarak geliştirilebilir (Mohebodini *et al.* 2011).

Açıkta ve örtü altında değişik mevsimlere uygun olarak ıslah edilmiş marulun yılın 12 ayı üretimini yapmak mümkündür. En iyi yetiştiği toprak tipleri: besin maddeleri ve organik maddelerce zengin, kumlu tın ve killi tın arasında kalan topraklardır. En uygun pH: 6.0 - 7.0 arasında, en uygun sıcaklık derecesi ise 15,5°C ile 18,3°C arasında olmalıdır (Anonim 2015).

Yüksek tuzluluk, mahsul verimliliğini kısıtlayan önemli stres faktörüdür. Dünya çapında 800 milyon hektardan fazla arazi tuzdan etkilenmekte olup tuzluluk seviyesinin bir sonucu olarak üretimden çıkarılmaktadır. (Bartha *et al.* 2015). Bu durum her yıl yüzlerce milyon doların kaybedilmesine sebep olmaktadır (Munns and Tester 2008). Kimi bitkiler stres koşullarına karşı mekanizmalar oluştururken kimileri de koşullara adapte olurlar. Belli bir tuzluluk derecesinde bir bitkiden verim azalması olmaksızın ürün alınabilirken, bir diğer bitkiden hiç ürün alınamayabilir. Bunun nedeni bitkilerin tuzluluğa karşı toleranslarının farklı olması, yani tuzlu topraktan su alabilmek için ozmotik ayarlamayı yapabilme yeteneklerinin farklı olmasıdır. Marul bitkisi için oransal verimlere karşılık gelen sulama suyu ve toprak saturasyon eriyiği elektriksel iletkenlikleri örnek değerler olarak Çizelge 1.1’de verilmiştir (Kanber vd 1992; Kotuby vd 1997; Bayraklı 1998).

Çizelge 1.1. Marul bitkisinin tuzluluk toleransı

Bitki Çeşidi	Eşik Değer		Verimdeki Azalma (%)					
	EC _e	EC _w	10		25		50	
			EC _e	EC _w	EC _e	EC _w	EC _e	EC _w
Marul	1.3	0.9	2.1	1.4	3.2	2.1	5.2	3.4

Tuza duyarlı çoğu kültür bitkisi solma gösterir, ileri aşamalarda ise yaşamları sona erer ya da önemli ürün kaybına uğrarlar (Kacar vd 2006). 2019 yılında 7.74 milyar olan insan nüfusunun 2050 yılında 12 milyara ulaşacağı düşünüldüğünde, toprakların tuzluluğa ve diğer streslere (biyotik ve abiyotik) maruz kalmaya devam etmesine bağlı olarak, tarım ürünlerinin verimliliklerinin azalacağı ve artan insan nüfusuyla birlikte besin ihtiyaçlarının karşılanamayacağı ön görülmektedir. Bu ihtiyacı karşılamak için üretim alanlarında artan sulama uygulamalarının toprakta tuz birikimine yol açacağı yine iklim değişikliği sonucu değişen yağış rejiminin tuzlulukla sonuçlanacağına da düşünülmektedir. Bu nedenle, bitkilerin diğer stres faktörleri ile birlikte tuzluluğa dayanıklılık düzeylerinin de belirlenmesi ve besin değerleri yüksek toleranslı bitkilerin geliştirilmesinin önemi daha artmaktadır (Çulha vd 2011).

Stres, biyotik ve abiyotik çevre faktörlerinin etkisiyle bitkilerde meydana gelen değişimler olarak ifade edilmektedir. Stres etmenleri bitkilerde sıfırdan başlayarak orta ve en yüksek düzeyde büyüme ve gelişmeyi olumsuz yönde etkilerken, üründe nitelik ve nicelik kayıplarına yol açmaktadır. Genetik adaptasyon derecesine ve çevre şartlarına bağlı olarak stres faktörleri bitkilere farklı düzeyde zarar vermektedir. Abiyotik ve biyotik stres koşullarında ürün kaybı %65-87 arasında değişirken abiyotik şartların neden olduğu ürün kaybı %51-82 arasında değişmektedir (Kacar vd 2013).

Soğuğa dayanıklı, nemli hava koşullarına ihtiyaç duyan marul tuza oldukça yüksek oranda hassastır ve bu hassasiyet bitkide strese neden olmaktadır. Bununla birlikte, topraktaki aşırı tuz, ozmotik strese, iyon toksisitesine, besin iyon dengesine etki eder ayrıca bitki büyümesini ve fizyolojik fonksiyonları da etkilemektedir (Zhang *et al.* 2018).

Tuzluluğun bitkiler üzerindeki etkisi iki farklı fazda incelemektedir. Bunlardan birincisi, osmotik etki nedeniyle ortaya çıkan hızlı faz (ozmotik stres), diğeri ise bitkilerde tuz toksisitesine neden olan yapraklarda tuz birikimi nedeniyle oluşan yavaş fazdır. Bu faz tuzun spesifik etkilerinin görüldüğü fazdır (Munns 2005).

Faz-1, bitkiler strese kısa süreli maruz kaldıklarında oluşur ve bitki köklerinin dışındaki tuzlu çözeltinin osmotik etkilerinden kaynaklanmaktadır. Kökler, çevresindeki yüksek tuz konsantrasyonunu su alımını daha da zorlaştıran bir eşik değeri seviyesine çıkartırlar. Bunun sonucunda ise yaprak ve kök büyümesinde küçük miktarlarda azalma gözlenir. (Munns and Tester 2008).

Faz-2 ise bitkinin strese uzun süreli maruz kalmasından sonra oluşmaktadır. Bu faz tuzun toksik etkisine karşı bitkinin gösterdiği bir cevaptır. Tuzlar hızlı bir şekilde oluşur ve enzim aktivitesini inhibe ederler. Duyarlı bitkilerde bitkinin fotosentetik kapasitesini azaltırlar ve yaşlı yaprakların ölümüne neden olurlar (Munns and Tester 2008).

Bitkide fazla NaCl alınımı, su potansiyelini azaltırken hücredeki iyon dengesini bozup bitki gelişimini negatif yönde etkilemektedir. Hücrede Na^+ ve Cl^- düzeyi artarken Ca^{+2} , K^+ ve Mg^{+2} konsantrasyonları azalmaktadır. Hücreye giren Na^+ , zar potansiyelini bozmakta ve anyon kanalları vasıtasıyla hücre dışındaki Cl^- 'un pasif olarak hücreye girişini kolaylaştırmaktadır. Büyüme ve gelişme için gerekli temel elementlerden biri olan K^+ , osmotik dengenin korunmasında, enzim aktivitesinin düzenlenmesinde, protein sentezinde, negatif yüklü proteinlerin nötralizasyonunda ve stomaların hareketinde rol almaktadır. Hücre dışında Na^+ miktarının artmasıyla hücreye Na^+ 'nın girişi artarken, K^+ 'nın hücreye alınımı azalmakta ve buna bağlı olarak K^+ bağlanacağı alanlara Na^+ 'nın bağlanmasından dolayı Na^+/K^+ dengesi bozulmaktadır. Ayrıca, NaCl birikiminin mikrotübüllerin depolimerizasyonuna neden olduğu ve hücre bölünmesinde iş ipliklerinin oluşumunu engellediği düşünülmektedir (Çulha vd 2011). Na^+ 'nın yüksek konsantrasyonlarının tüm bitki hücrelerinde (halofitlerde bile) toksik olduğu ve pek çok bitki türünde normal büyüme ve gelişme için K^+/Na^+ oranının korunmasının temel olduğu

ifade edilmektedir (Zhang *et al.* 2010). İyon dengesinin korunmasını sağlayan 3 genel mekanizma vardır, bunlar;

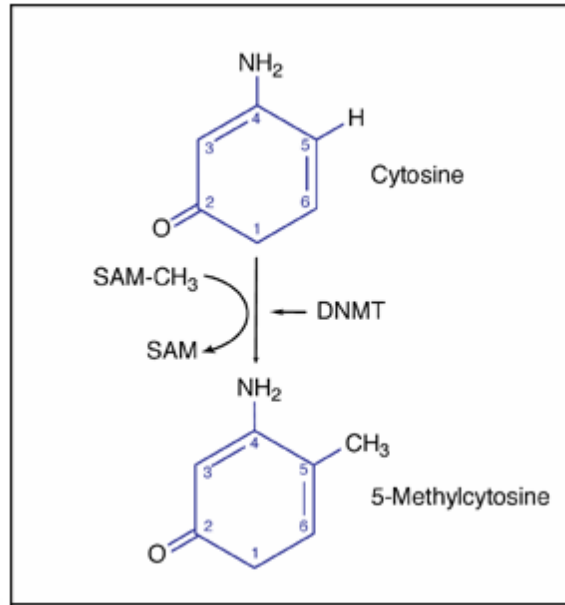
- 1) Plazma zarındaki her bir Na^+/H^+ antiporter yoluyla Na^+ 'nın çıkarımı (*SOS1* antiporteri)
- 2) *NHX1* gibi vakuolar Na^+/H^+ antiporterler yoluyla çıkarımı
- 3) Yüksek ve düşük K^+ kanallarının farklı fonksiyonları yoluyla hücrelerde K^+ tutulması ile gerçekleşir (Zhang *et al.* 2010).

Tuz stresi aynı zamanda kloroplast ve mitokondrideki elektron taşıma sistemi, yağ asidi oksidasyonu, fotorespirasyon ve çeşitli detoksifikasyon reaksiyonlarının indirgenmesine neden olmaktadır. Bu işlevlere, birçok hücrel bileşen ve yapılarda oksidatif zarara neden olan ve hücrel redoks dengesini bozan reaktif oksijen türlerinin (ROT) hızlı artışları eşlik etmektedir (Yıldız vd 2014). Gerçekte, ROT'lar bitkilerin abiyotik strese karşı olan cevaplarında hem stres metabolizmasının toksik yan ürünleri olarak hem de kalsiyum, hormon ve protein fosforilasyonu temelli stres cevaplarının ortaya çıkmasından sorumlu olan karmaşık metabolik süreçlerde önemli bir sinyal iletim molekülü olarak ikili rol oynamaktadırlar. Yapılan çalışmalarda ROT sinyallerinin tuzluluk stresine cevapta da önemli bir rolü olduğu gösterilmiştir. ROT'lar hücre temel bileşiklerini, özellikle antioksidantlar tarafından detoksifiye olmayan membran lipidlerini oksitleyerek hücre membran hasarına neden olabilmektedir (Karadayı 2017).

Yapılan çalışmalarda, toprakta tuz oranı artışının vajatatif gelişmeyi olumsuz yönde etkilediği bu nedenle de marul büyüklüklerinde azalmaya yol açtığı, verimde ise düşük tuzlulukta %11, yüksek tuzlulukta %26'ya varan azalma meydana getirdiği tespit edilmiştir. Tuz stresi, çimlenme, yaprak su içeriği, fotosentez oranı, klorofil içeriği, kök ve sürgün büyümesi ve lipid peroksidasyonunda azalmalara yol açmıştır (Shannon *et al.* 1983; Barassi *et al.* 2006; Mota-Cadenas *et al.* 2010; Pérez-López *et al.* 2013; Mohammadi and Khoshgoftarmanesh 2014; Xu and Mou 2015).

Tuz stresi ile yapılan birçok çalışma, tuzluluğun bitki metabolizması üzerindeki etkisinin fizyolojik mekanizmasına odaklanmış olsa da tuz stresinin epigenetik etkileri konusunda çok az bilgi bulunmaktadır.

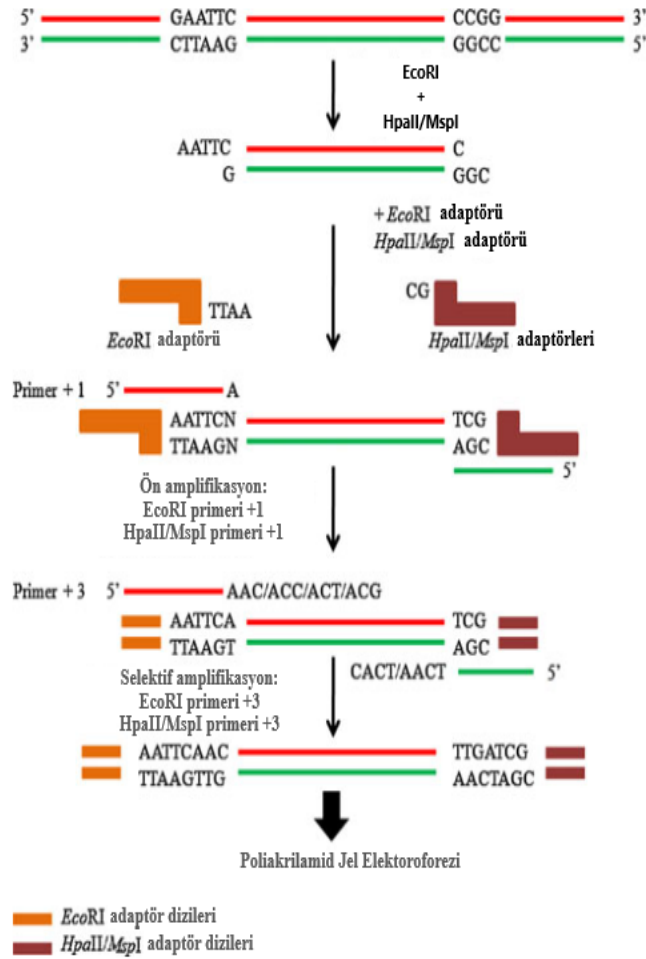
Bitkilerin gen ekspresyonunu ve protein fonksiyonunu farklı şekilde düzenleme yeteneği bitki direncinin temelini oluşturmaktadır. DNA sekansında değişiklik olmadan, gen ekspresyonundaki değişiklikler olarak bilinen epigenetik modifikasyonlar, bitkilerin seçilen DNA şablonlarını susturabileceği veya süper aktif edebileceği moleküler mekanizmalardan biridir (Habu *et al.* 2001). DNA metilasyonu en önemli epigenetik mekanizmadır, geri dönüşümlüdür (Kress *et al.* 2001). DNA metilasyonu 1948 yılında Hotchkiss tarafından ilk olarak keşfedilen epigenetik marker olmuştur. Metillenme, DNA'daki CG çiftleri halinde bulunan sitozinlerde ve genellikle de her iki zincirde birden olur. Metilasyon, DNA dizisindeki guaninin önünde yerleşmiş sitozinlerin (CpG) 5.karbonuna metil grubu bağlanması ile gerçekleşmekte ve bölgesel hipermetilasyon, promotor bölgede bulunan CpG adacıklarını etkileyerek genin aktivitesini durdurmaktadır (Michalowsky 1989).



Şekil 1.2. DNA metilasyon mekanizması (Michalowsky 1989).

Metilasyon düzeyinde bir azalma gen ekspresyonunda bir artışa yol açarken, metillenmiş DNA'nın gen ekspresyonunu inhibe ettiği bilinmektedir (Finnegan *et al.* 1998). Metilasyon seviyesi, bitkinin strese cevap verme yeteneğine büyük ölçüde katkıda bulunmaktadır (Joel 2013). DNA metilasyon mekanizması, bitkilerin toprak verimliliği değişikliklerini ve abiyotik stresleri içeren çeşitli ipuçlarına tepki vermesinin başka bir yoludur ve mekanizma bazı fizyolojik, biyokimyasal veya adaptasyon süreçlerini anlamak için kullanılmaktadır (Zenda *et al.* 2018). Tuz stresinin genetik modifikasyonu uyarıcı ve NaCl konstrasyonuna bağlı DNA hasarına neden olduğu bilinmektedir. Yine tuzluluğun bitkilerde DNA metilasyonunun hipermetilasyon ve hipometilasyon evrelerinin her ikisinin de değişime neden olduğu bilinmektedir (Demirkıran *et al.* 2013). Bitkide stres kaynaklı meydana gelen DNA metilasyonunun tespiti MSAP ve CRED-RA teknikleri ile belirlenebilmektedir (Tsaftaris and Polidoris 2000). Bu tekniklerden biri de AFLP'nin modifiye edilmiş hali olan MSAP'dir. Farklı mantarlarda, bitkilerde ve hayvan türlerinde anonim "CCGG" dizilerinin metilasyonunu incelemek için kullanılmaktadır. Bir çift metilasyona duyarlı izoşizomer restriksiyon enzimleri kullanılır. Bunlar *EcoRI*, *HpaII* ve *MspI*'dir. *HpaII* ve *MspI* aynı tetranükleotid restriksiyon bölgesini (5' CCGG) tanır, ancak sitozin metilasyonuna karşı duyarlılıkları farklı olmaktadır (Guevara *et al.* 2017).

MSAP yönteminde, genomik DNA metilasyona duyarlı (*EcoRI/HpaII*) ve metilasyona duyarlı olmayan (*EcoRI/MspI*) endonükleazlarla kesilir, ardından elde edilen DNA parçaları spesifik adaptörlere bağlanır ve elde edilen DNA parçaları seçici primerler kullanarak PCR’de çoğaltılır. Elde edilen PCR ürünleri, floresan etiketli primerler (yıldız işareti) olarak üç seçici nükleotit kullanılarak seçici bir PCR reaksiyonunda DNA şablonu olarak kullanılır. Seçici PCR ürünleri Poliakrilamid jel’de görüntülenir (Şekil 1.3.) (Abid *et al.* 2011).

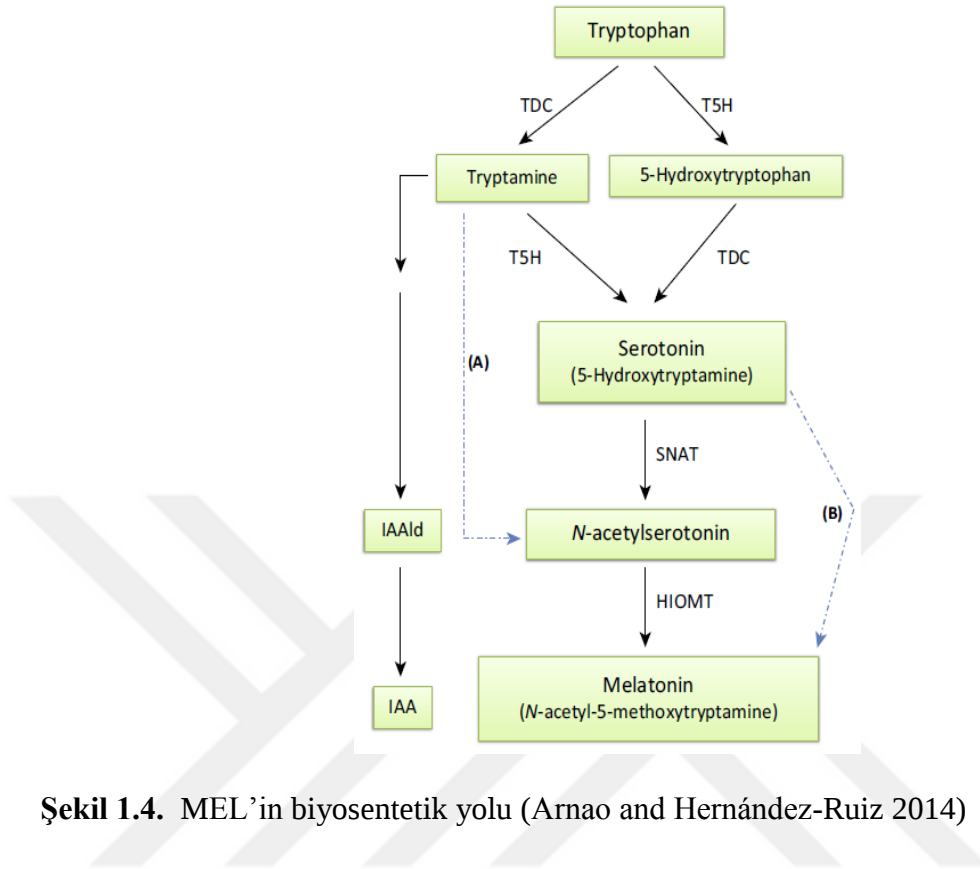


Şekil 1.3. MSAP yöntemine genel bakış

Tuz stresine maruz kalmış bitkiler bu stresin neden olduğu olumsuz etkilere karşı biyokimyasal ve moleküler düzeyde tolerans mekanizmaları geliştirmiştir. Gen

ekspresyonunun düzenlenmesinin sebeplerinden biri de, bitkilerin tuz stresine uyum sağlamaya çalışmasıdır (Xiong *et al.* 2002). Tuz stresi altında tuz toleransına katkıda bulunan proteinleri kodlayan genler veya tuz stresi altında hücrelerin korunmasına ve onarılmasına yol açan yollarda bulunan enzimlerin aktivitesini düzenleyen genler ve bu genleri aktive eden transkripsiyon faktörleri ifade olmaktadır (Flowers 2004; Munns 2005). Tuz stresi sensör genlerinin (*SOS1*, *SOS2*, *AKT1*, *HKT1*, *NHX1*) aktivitesini veya endojen antioksidan seviyelerini artıran genetik değişiklikler, ürün toleransında faydalı bir strateji sunmaktadır. Bununla birlikte, genetiği değiştirilmiş ürünlere bağlanan karmaşıklıklar ve tartışmalar nedeniyle, bu genlerin geleneksel tarımda çok az uygulaması bulunmaktadır. Bu nedenle, stres toleransını arttırmak ve yaprak ömrünü uzatmak, tuz stresine karşı enzimlerin aktivitesini arttırmak, fotosentez etkinliğini geliştirmek ve stresi tolere etmek için gen ifadesini düzenlemek gibi alternatif bir strateji önemli tarımsal uygulamalara yol açabilir (Munns and Tester 2008; Fan *et al.* 2018; Zhang *et al.* 2018). Bu stratejilerden birisi olan ve tuz toleransını arttırmakta kullanılan melatonin (MEL), son yıllarda dikkat çekmiştir (Fan *et al.* 2018).

MEL (N-asetil-5-metoksitriptamin), 1958'de sığır pineal bezinde keşfedilmiş ve serotonininden (5-hidroksitriptamin) türetilmiş indolik bir bileşiktir (Şekil 1.4).



Şekil 1.4. MEL'in biyosentetik yolu (Arnao and Hernández-Ruiz 2014)

Bitkilerde MEL'in 1995 yılında keşfedilmesinden sonra biyotik ve abiyotik stres üzerine etkilerine yönelenmiştir. MEL'in çok çeşitli sebze, meyve, tahıl, tıbbi ve aromatik bitkiler ile süs ve yabani bitki türlerinde bulunduğu bildirilmiştir (Reiter *et al.* 2007; Feng *et al.* 2014). Bitkilerde biyotik-abiyotik strese karşı bitki biyostimülatörü görev yapmasının yanı sıra bitki büyümesinde (köklenme, yaprak yaşlanma, fotosentetik verim ve biyokütle verimi) ve bitki vejetatif gelişim süreçlerinde (çiçeklenme süreçlerinde potansiyel bir düzenleyici, meyve ve tohumların oluşumu ve olgunlaşması) de rol oynamaktadır (Arnao *et al.* 2018; Fan *et al.* 2018). MEL doğal kaynaklı, toksik olmayan ve biyobozunur bir hormondur. Bu açıdan tohum ön çinlendirme yöntemlerine ek olarak tohum kalitesi modifikasyonları için güvenilir ve ekonomiktir (Janas and Posmyk 2013). MEL bitki biyostimülasyonu, ekolojik mahsulleri geliştirmek ve güvenli gıda üretimini desteklemek için ümit vaat eden bir araç olmaktadır (Kołodziejczyk *et al.* 2016).

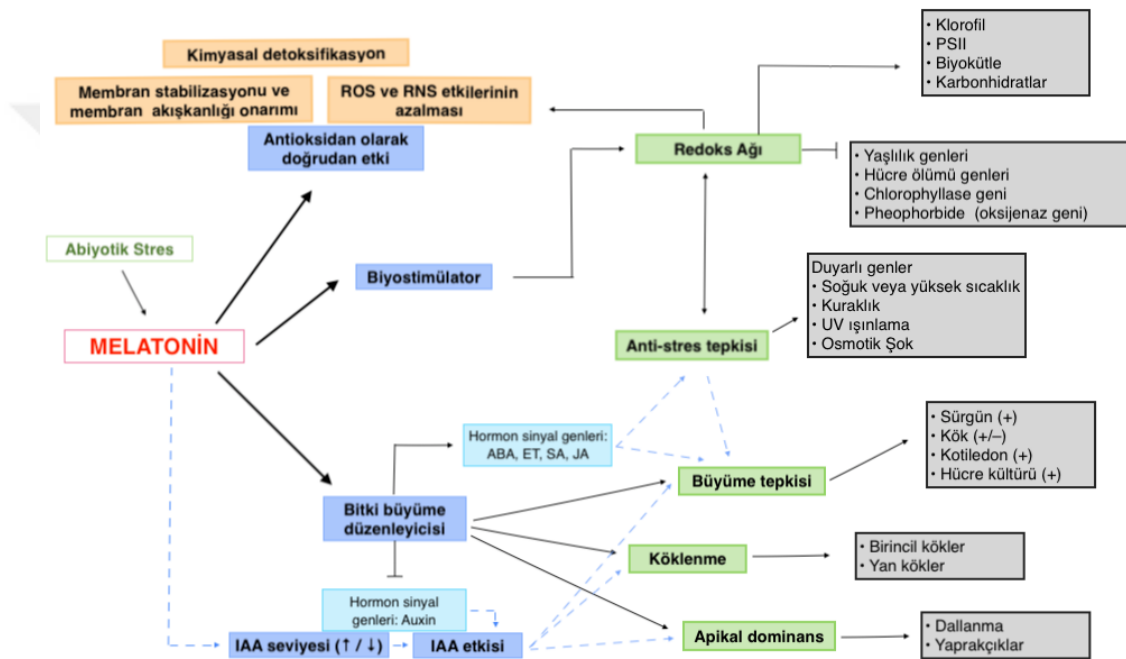
Mevcut veriler ve gözlemlere dayanarak, tarımsal üretimde MEL'in yadsınamaz bir öneminin olduğu görülmektedir. MEL'in bitkilerdeki etkileri Çizelge 1.2'de özetlenmiştir.

Çizelge 1.2. MEL'in bitkilerdeki etkileri (Arnao and Hernández-Ruiz 2014)

	MEL'in bitkilerdeki etkileri
Vejetatif gelişim	Fidelerin büyümesini harekete geçirir. Birincil köklerin büyümesini teşvik eder veya inhibe eder. Gövde ve yaprakların gelişimini düzenler. Yaprakların yaşlanması ile oluşan klorofil kaybını geciktirir. Fotosentezi, CO₂ alımını ve biyokütleyi artırır. Eksplant kültürlerinde kök ve sürgün oluşumunu teşvik eder.
Üreme gelişimi	Çeşitli türlerde farklı çiçeklenme aşamalarını etkiler Çeşitli türlerde meyve gelişimi ve tohum oluşum sürelerini değiştirir.
Stres altındaki bitki	Stres durumlarına maruz kalan bitkilerin büyümesini etkiler. Stresli bitkilerde prolin seviyesinde artışa neden olur. Stresli tohumların çimlenme oranını artırır. Erken yaprak dökümü ve patojen yayılmasını hafifletir. Oksidatif strese karşı klorofilleri korur ve bitkilerdeki fotosentez oranını hızlandırır.

MEL doğrudan etkili bir antioksidan olarak, ROT, reaktif azot türleri (RNS) ve çeşitli kimyasal kirleticileri detoksifiye etmektedir. MEL ayrıca, membran akışkanlığında önemli bir rol oynar ve gen ekspresyonunu artırıp ya da azaltarak düzenleyici bir membran stabilizatörü görevi görebilir. Bir biyostimülatör olarak MEL, anti stres yanıtında rol alan redoks ağı genlerinin ekspresyonunu değiştirir ve fotosentez ile ilgili parametreleri optimize ederek yaşlanma genlerini baskılar ve bitkileri güçlendirir. Bitki

büyüme düzenleyicisi olarak MEL, büyüme yanıtı, köklenme ve dallanma ile ilgili enzimlerin, promotörlerin ve hormon reseptörlerinin ekspresyonunu düzenler. Bu eylemler, indol-3-asetik asidin (IAA) aracılık ettiği bilinen yola paralel bir yolda gerçekleşebilir. Ayrıca, MEL bitkilerin fenotipik tepkisini etkileyerek bitki dokularındaki IAA seviyelerini değiştirebilir. Düzenleme işlemleri sırasıyla oklar ve çubuk çizgilerle gösterilir (Şekil 1.5.) (Arnao and Hernández-Ruiz 2014).



Şekil 1.5. Bir bitki büyüme düzenleyicisi ve biyostimülatör olarak MEL'in etkisi (Kesik çizgiler, varsayımsal ilişkileri göstermektedir. (+) büyümenin aktivasyonunu gösterir; (-), büyümenin inhibisyonunu belirtir)

Yapılan çalışmalarla biyoteknolojik ve moleküler yöntemler kullanılarak bitkilerde MEL seviyesinin artırılmasının mümkün olduğu ortaya konmuştur. O nedenle bu alanda elde edilecek olan bir başarı, hem bitkilerin stres şartlarına karşı savunma mekanizmasını geliştirerek hem de insanların MEL içeriği yüksek gıdaları tüketmesine olanak sağlayacaktır. Tüm bu nedenlerden dolayı bu molekülün bitkilerde üstlendiği görevlerin daha iyi anlaşılması için çok fazla sayıda yeni araştırmanın yapılması gerekmektedir (Yakupoglu vd 2018).

Bununla birlikte, çeşitli ürün türlerinde küresel DNA metilasyon profillemesi, gen ekspresyonu ile ilgili birçok çalışma olmasına rağmen, marul üzerine yapılan az sayıda araştırma bulunmaktadır. Bu çalışmada, tuz stresi altındaki marul bitkisinde DNA metilasyonu, tuz stresi sensör genlerinin ekspresyonu ve fizyolojik parametreler üzerine MEL'in etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla, tuz stresi için NaCl uygulamaları ve antagonist olarak düşünülen MEL uygulamaları sonucunda marul genomunda DNA metilasyonunun varlığı ve tuz stresi sensör genlerinin ekspresyonunun nasıl düzenlendiği moleküler düzeyde tespit edilmeye çalışılmıştır. Böylece, morfolojik ölçüm sonuçlarına daha kesinlik ve güvenilirlik kazandırılması hedeflenmiştir.



2. KAYNAK ÖZETLERİ

Biyotik ve abiyotik çevre etmenlerinin etkisi altında bitkilerde ortaya çıkan değişimler stres olarak ifade edilmektedir. Stres bitkilerde büyüme ve gelişmeyi olumsuz yönde etkileyerek üründe kalite ve verimin azalmasına, bitki ve bitki organlarının ölümüne neden olmaktadır. Stres etmenlerinin oluşturduğu zarar bitkinin olumsuz çevre şartlarına genetik adaptasyon derecesine bağlı olarak değişmektedir (Singh and Dubey 1995).

Tuzluluk bitkide tohum çimlenmesini, bitkinin büyümesini, gelişimini, verim ve verim öğelerini, yaprak nispi su içeriğini, klorofil miktarını ve hücre membranını etkilemektedir. Tohum çimlenmesi, bir bitkinin oluşumu ve büyümesi için esastır (Daiya *et al.* 1980). Fidelerin yüksek NaCl konsantrasyonlarına maruz bırakılması, hücrelerin bölünmesini ve genişlemesini inhibe ederek, çimlenmeyi engeller ve potansiyel olarak tohum ölümüne neden olur (Neumann 1997). Bijeh (2012), tuzlu koşullar altında marul tohumlarının çimlenme oranlarını araştırmıştır. Tohumlara 0, 0,5, 1,0 ve 1,5 mM konsantrasyonlarında tuz uygulaması yapmış ve sırasıyla %95, %67, %27 ve %8 oranında çimlenme olduğunu kaydetmiştir.

Gıda ve Tarım Örgütü (FAO, 1985) marul sulama suyunda 0,9 dS /m, toprakta ise 1,3 dS /m'lik bir EC eşik değeri olması gerektiğini bildirmiştir (Schrader 2017). Yapılan bir araştırmada 1,4 dS/m sulama suyu ve 2,1 dS/m toprak EC değerleri marulda verimi %10 azaltmıştır ayrıca eşik seviyelerinde veya üstünde, bitkide bodur büyüme, yapraklarda sararma ve lezyon oluşumuna neden olmuştur (Hoffman *et al.* 1979). Farklı bir çalışmada ise marula 3, 7, 11, 15, 19 ve 23 dS /m konsantrasyonlarında tuz uygulanmış ve verimde %50 düşüş gözlenmiştir (Shannon *et al.* 2000).

Tuğcu (2016), yaprak lahanası (karalahana) yerli çeşidini (*Brassica oleracea*. var. *acephala* cv.) kullandığı bir çalışmada değişik vejetasyon dönemlerine kadar uyguladıkları farklı tuz konsantrasyonlarının fizyolojik, morfolojik ve kimyasal değişikliklerini tespit

etmişlerdir. Denemede 0, 50, 100 ve 200 mM NaCl uygulaması, iki farklı uygulama zamanı için (8 gerçek yapraklı ve hasat dönemine kadar) test edilmiştir. Çalışma sonucunda, ele alınan farklı vejetatif dönemlerden hasat dönemine kadar tuz uygulaması ile yaprak hücrelerinde membran zararlanması, yaprak sıcaklığı ve hasar indeksi kriterlerinde en yüksek ortalamalara ulaşılmıştır. Farklı tuz konsantrasyonları sonucunda ele alınan kriterlerden yaprak hücrelerinde membran zararlanması, yaprak sıcaklığı ve hasar indeksi miktarlarının tuz konsantrasyonunun artışıyla ilgili olarak arttığı belirlenmiştir. Diğer tüm kriterlerde, tuzluğun 0 mM'dan 200 mM'e doğru artmasıyla elde edilen ortalamaların azaldığı tespit edilmiştir. Yaprak su potansiyeli açısından tuz konsantrasyonu arttıkça gün ortası yaprak su potansiyelinin (Ψ_{go}) düştüğü yani yapraklarda su stresinin arttığı sonucuna varılmıştır.

Zapata *et al.* (2004), farklı bitki türlerinde (ıspanak, marul, kavun, biber, brokoli, pancar ve domates) tuzluluğun etkilerini tespit etmek amacıyla çimlenme oranı, fide büyümesi, etilen üretimi solunum oranı ve poliamin seviyesini değerlendirmişlerdir. Kontrol uygulaması (1 mM NaCl) ve 100, 150 mM NaCl uygulamaları altında tohum çimlendirmesi yapılmıştır. Ispanak haricindeki türlerde fide ağırlığı ve çimlenme yüzdesi tuzlulukla azalma göstermiştir. Çimlenme oranı üzerine tuzluluğun en düşük etkisi marulda tespit edilmiştir. Solunum oranı, ıspanak hariç tüm türlerde tuz miktarının artışıyla birlikte artış gösterdiği belirlenmiştir. Diğer taraftan, etilen üretiminde ise bazı türlerde artış gözlenirken diğerlerinde azalış tespit edilmiştir. Araştırmacılar bitkilerde tuz stresine karşı enzimlerin aktivitesini arttırmak, fotosentez etkinliğini geliştirmek ve stresi tolere etmek için gen ifadesini düzenlemek gibi çeşitli stratejiler geliştirmişlerdir. Bu stratejilerden birisi olan ve tuz toleransını arttırmakta kullanılan MEL, son yıllarda dikkat çekmiştir (Fan *et al.* 2018).

Hniličková *et al.* (2019), yaptığı bir çalışmada farklı bitki türlerini (marul, ıspanak ve semizotu) 50 gün boyunca farklı dozlarda tuz stresine maruz bırakmış (50, 100, 200, 300 mmol / L) ve bitkilerde etkisini gözlemlemişlerdir. Yapılan uygulamalarda marulun tuz stresinden en fazla etkilendiği, kuru ağırlığının önemli ölçüde azaldığı, Na^+ ve K^+ dengesinin bozulduğu ve membran stabilitesinin etkilendiği bildirilmiştir. Ispanakta,

düşük tuz konsantrasyonlarında sodyum birikimi gözlenmiş ve büyüme pozitif olarak etkilenmiştir. Semizotunda ise artan NaCl konsantrasyonu ile kuru ağırlıkta önemli bir azalma olmamış, Na^+ / K^+ dengesi olduğu gibi korunmuştur.

Fernández *et al.* (2016), tuzdan etkilenen tarımsal bir bölgede su teresi (*Nasturtium officinale* L.) ve marul (*Lactuca sativa*) yetiştirmiş ve etkilerini incelenmiştir. Su teresinde, verim azalması ve yapraklardaki Cl birikmesi arasında doğrusal bir ilişki ($R^2 = 0.75$) gözlenirken, verim maruldaki gibi tuzluluktan çok fazla etkilenmemiştir. NaCl uygulaması, her iki ürünün yaprak dokularında Ca_2^+ alınımasını etkilemesine rağmen, Na^+ birikimini artırdığı, ayrıca su teresinde de K^+ biriktirdiği tespit edilmiştir.

Amirjani (2011), çeltik (*Oryza sativa*) bitkisinde yaptığı bir çalışmada 200 mM tuz konsantrasyonun yapraklardaki klorofil b içeriğini %41, klorofil a içeriğini ise %33 azalttığını bildirmiştir. Yine aynı bitkide yapılan başka bir çalışmaya göre 100 mM NaCl uygulaması yapılan bitkiler kontrolle karşılaştırıldığında klorofil a, b ve karotenoid (Car) içeriklerinde sırasıyla %30, %45 ve %36 azalma gözlenmiştir (Chutipaijit *et al.* 2011). Qados (2011), fasulyede tuz stresi üzerine yaptığı bir çalışmada; NaCl uygulamasının klorofil içeriğini önemli ölçüde azalttığını ayrıca on günlük uygulamadan sonra klorofil b, toplam klorofil ve karotenoid içeriğini de önemli ölçüde azalttığını bildirmiştir.

Tuz stresinin genetik modifikasyonu uyarıcı ve NaCl konsantrasyonuna bağlı DNA hasarına neden olduğu bilinmektedir. Yine tuzluluğun bitkilerde DNA metilasyonunun hipermetilasyon ve hipometilasyon evrelerinin her ikisinde değişimine neden olduğu bilinmektedir (Demirkıran vd 2013).

DNA metilasyonu stres adaptasyonunda kritik bir rol oynamaktadır (Mirouze and Paszekowski, 2011). DNA metilasyonundaki değişimler dokuya spesifik tek bir gen ifadesindeki kalıbın öncülüğünde olur. Bu değişimler özellikle organizmaların çevresel şartlara karşı tepkisinde geçici çeşitlilik meydana getirdiği için popülasyon seviyesinde oldukça önemlidir (Bassing *et al.* 2002; Chen and Ni 2006; Boyko *et al.* 2007). Somatik dokularda DNA metilasyonundaki azalma ile strese spesifik genlerin ifade seviyesi

arasında bir bağlantı bulunmaktadır. Choi and Sano (2007), tütün bitkilerini alüminyum, tuz ve düşük sıcaklık streslerine maruz bırakarak, Gliserofosfodiesteraz protein (NtGPDL) geni ve DNA metilasyonu arasındaki bağlantıyı incelemişlerdir. Abiyotik stresler üzerine metilasyon ile NtGPDL'nin ekspresyonu arasında yakın bir ilişki olduğunu bildirmişleridir. DNA metilasyonu histon modifikasyonuna bağlı olduğundan, kodlama bölgelerinde demetilasyonun kromatin yapısının değişmesine neden olabileceği ve böylece transkripsiyonunu artıracaklarını öne sürmüşlerdir. DNA metilasyon seviyesinin olumsuz çevre şartlarına cevap olarak değişebileceğini ve bunun strese cevap veren genlerin aktivasyonu ile yakından ilgili olduğunu Wada *et al.* (2004) bildirmişlerdir.

Kovar *et al.* (1997), yaptıkları çalışmada tütün hücre süspansiyonu kültüründe, ozmotik ve tuz stresi ortamından tekrar stressiz ortamlara alındığında geri dönüşlü olan iki heterokromatik lokasyonda DNA hipermetilasyonunun indüklendiğini gözlemlemiştir.

Dünya genelinde, ekonomik değeri yüksek olan domates, biber, fasulye, mısır, buğday, yonca, pamuk gibi birçok tarımsal üründe tuz stresine toleranslılık ile ilgili gerek morfolojik ve fizyolojik gerekse sitolojik ve moleküler düzeyde çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Örneğin; Al-Lawati *et al.* (2016)'nın yaptıkları bir çalışmada yonca bitkisi kullanılmış olup tuza dayanıklı bir çeşit ile birlikte 11 yerel çeşit 0-8-12-20 dS/m değerlerinde tuz çözeltilerine maruz bırakılmıştır. Yapılmış olan DNA analizi ve MSAP analizleri sonucunda artan tuz konsantrasyonu ile birlikte bitki DNA'sında metilasyon derecesinin arttığı tespit edilmiş olmakla birlikte bitkinin gelişimi ile morfolojik özellikleri üzerinde olumsuz etkiler bıraktığı da tespit edilmiştir.

Yapılan başka bir çalışmada, tarlada yetiştirilen süt aşamalarındaki taze mısır yapraklarında DNA metilasyon paternlerinin, seviyelerinin ve polimorfizm frekanslarının, kükürt (S) ve klor(Cl) tarafından nasıl etkilendiği araştırılmak için MSAP tekniği kullanılmıştır. Sonuç olarak, S ve Cl'nin, taze mısır genomunun iç sitozindeki demetilasyon lokuslarını artırarak, süt evresindeki mısırların DNA metilasyon paternleri ve seviyeleri üzerinde büyük bir etkiye sahip olduğunu göstermişlerdir. MSAP tekniğinde

sülfürün, metilasyondan daha fazla DNA demetilasyonunu tetiklediğini ve yaprak dokusu örneklerinde kontrol ve klordan daha fazla olduğu belirtilmiştir (Zenda *et al.* 2018).

Karan *et al.* (2012), NaCl stresi altında dört farklı çeltik genotipinin metilasyon seviyelerini MSAP tekniği ile incelemişlerdir. Araştırma sonucunda tuzluluğa hassas IR29 ve Geumgangbyeon genotiplerinde metilasyon seviyesinin sırasıyla %7,6 ve %14,1 oranında azaldığını, tuzluluğa dayanıklı Nipponbare ve Pokkali genotiplerinde ise %11,2 ve %8,1 oranında arttığını gözlemlemişlerdir.

Karan *et al.* (2012), yaptıkları çalışmada tuz stresinin derecesine göre farklılık gösteren dört genotipte, DNA metilasyonunun kapsamı ve paternleri üzerindeki etkisini MSAP tekniği ile değerlendirmişlerdir. DNA metilasyonunun miktarı, kökle kıyaslandığında sürgünlerde tam metillenmiş lokusların varlığı, hemi-metillenmiş lokuslardan daha fazla olduğu gözlemlenmiştir.

Wang *et al.* (2016), pamuk bitkisinde tuz stresinin etkisini araştırdıkları bir çalışmada, hibrit çeşit (CCRI29) ile birlikte her iki ebeveynine 100 mL NaCl solüsyonu uygulaması yapmışlardır. Metilasyon seviyesi değişimini tespit etmek amaçlı gerçekleştirdikleri çalışmada MSAP analizi sonucunda tuzluluk şartlarındaki hibrit çeşitte ebeveynlere göre belirgin seviyede bir metilasyon artışı olduğu tespit edilmiştir.

Biyotik ve abiyotik stres şartlarına bitkilerin yanıtının anlaşılması için hasarla ilgili moleküler kalıplar (DAMP'ler) üzerinde çalışılmıştır. Yapılan çalışmada, bir DAMP olan DNA'nın muhtemel rolünün, marulda CpG DNA metilasyonundaki ve savunmaya bağlı tepkilerdeki değişimleri analiz edilerek değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Sonuçlar, DNA'nın bitkilerde bir DAMP olarak hareket ettiğini, CpG DNA metilasyon seviyelerini değiştirdiğini aynı zamanda strese karşı savunma tepkileriyle ilişkili ikincil metabolitlerin üretimini arttırdığını göstermiştir (Vega Muñoz *et al.* 2018).

Normal gelişim süreçleri ve fonksiyonlarının yanı sıra, bitkiler, çeşitli çevresel streslerle başa çıkmak için karmaşık gen düzenleme mekanizmaları geliştirmiştir. İklim

uyarlamaları da dâhil olmak üzere, strese cevap olarak gen ekspresyonunun düzenlenmesinde DNA metilasyonu, kromatin düzenlenmesi ve küçük RNA bazlı mekanizmalarında rol oynadığı ileri sürülmüştür (Sahu *et al.* 2013).

Zhao *et al.* (2018), MEL uygulanmış ve tuz stresine maruz kalmış kanolada stres toleransı için iki önemli strateji olarak; *NHX* geni aracılı Na^+ birikimi ve *SOS* geni aracılı Na^+ akışı olduğunu bildirmişlerdir.

Na^+ sensörlerinden olan plazma membran Na^+/H^+ antiporteri *SOS* genleri duruma bağlı olarak doğrudan sentezlenir. *SOS* yolu 3 bileşikten oluşur; Ca^{+2} sensörü olarak aktive gösteren *SOS3*, bir serin/treonin protein kinazı olan *SOS2* ve bir plazma membran Na^+/H^+ antiporteri olan *SOS1* geni şeklinde tanımlanmaktadır (Silva and Geros 2009).

Shi *et al.* (2000), yaptıkları bir çalışmada *Arabidopsis thaliana*'da *SOS1* lokusunun Na^+/K^+ homeostazı için önemli ve *SOS1* mutasyonunun bitkileri yüksek Na^+ ve düşük K^+ ortamları tarafından büyüme inhibisyonuna daha duyarlı hale getirdiği vurgulanmıştır. Ayrıca bitkilerin NaCl stresine cevap olarak *SOS1* geninin aşırı ifade olduğunu bildirmişlerdir.

Shi *et al.* (2002), yaptıkları farklı bir çalışmada ise *NHX1* geninin, *Arabidopsis*'te tuz stresinde önemli fizyolojik fonksiyonlara sahip olduğunu açıklamışlardır. *NHX1* geninin, vakuol içerisinde hem Na^+ hem de K^+ bağlı taşımaya aracılık ettiğini, Na^+/H^+ antiport görevini üstlendiğini ve vakuol pH'sını düzenlediğini ortaya koymuşlardır.

Yang *et al.* (2009), tuz stresine maruz bırakılan transgenik *Arabidopsis*'te farklı *SOS* genleri ve *AtNHX1*'in (*Arabidopsis* Na^+/H^+ antiporteri) aşırı ifade edildiğini belirlemişlerdir.

Tuz stresinin etkilerini azaltmak için bitkilerin Na^+ ve K^+ iyonları arasında bir denge sağlamaları gerekir. Yüksek afiniteli potasyum taşıyıcı HKT'ler, K^+ alımı yoluyla Na^+ toksisitesinin azaltılmasında anahtar rol oynamaktadır (Han *et al.* 2018).

Ahmad *et al.* (2016), tüm canlı organizmalar için önemli bir katyonik besin maddesi ve bitki fizyolojisinin birçok alanında rol alan K^+ alım bileşenlerinden biri olan *AKT1* geninin etkisini değerlendirmek için çeltikte yaptıkları *AKT1* aşırı ifadesinin, özellikle kökte ozmotik ve kuraklık stres toleransını artırdığını bildirmişlerdir.

DNA metilasyonu, gen ifadesini değiştirerek hücre fonksiyonlarını etkileyen, bir metil grubunun kovalent bağlanan DNA metiltransferaz (DNMT) katalizinde, bir CpG dinükleotidindeki sitozinin 5-karbonundan yapıya eklenmesini ifade eden, epigenetik bir olaydır (Anonim 2018).

MEL bitki biyostimülasyonu için büyük bir potansiyele sahiptir. Bitki fizyolojisindeki rolü yoğun olarak araştırılmış ve bitki stres savunmasında işlevi önemle vurgulanmıştır. Yapılan bir araştırmada, mısır (*Zea mays* L.) tohumları suyla hidrolize edilmiş ve MEL (50-500 μ M) uygulanmış kontrollü tohum varyantları karşılaştırılmıştır. Araştırma, sadece hidropirim ile ilişkili MEL varlığında ifade edilen proteinleri tanımlamaya yardımcı olmuştur. MEL ile muamele edilmiş tohumlarda, antioksidatif, detoksifiye edici ve anti-stres proteinleri sentezlenmiştir. Bu sonuçlar, MEL'in bitki stres savunmasında nasıl rol oynadığını ve daha yüksek MEL içeriğine sahip bitkilerin neden stres toleransı için daha fazla kapasite sergilediğini açıklamıştır (Kołodziejczyk *et al.* 2016).

Li *et al.* (2012), MEL'in çeşitli bitki türlerinde bir bitki büyüme düzenleyicisi olarak etkilerini inceledikleri bir çalışmada, MEL'in (0,1 μ M) uygulaması, yüksek tuzluluktan kaynaklanan büyüme inhibisyonunu önemli ölçüde azalttığını bildirmişlerdir. MEL, bitkilerin fotosentetik kapasitelerinin devamlılığını sağladığı ve hidrojen peroksit (H_2O_2)'i doğrudan uzaklaştırarak; askorbat peroksidaz, katalaz ve peroksidaz dâhil antioksidan enzimlerin aktivitelerini artırarak ROT'un neden olduğu oksidatif hasarı da azalttığını göstermişlerdir.

Chen *et al.* (2017), bermuda çiminde düşük K^+ stresine karşı MEL etkisini incelemişlerdir. Araştırmada, MEL uygulamasının bitki büyümesini ve gelişimini desteklerken stres toleransını da artırdığını gözlemlemişlerdir. Ayrıca, MEL'in, düşük K^+

stresi altındaki bitkide fotosistem II (PSII) aktivitesinin korunmasında önemli bir etken olduğu ortaya konulmuştur.

Chen *et al.* (2018), yapılan bu çalışmada tuz stresi altındaki mısıra eksojen olarak uygulanan MEL'in, bitkinin antioksidan savunma sistemini ve fotosentetik özelliklerini nasıl etkilediğini incelemişlerdir. Araştırma sonucu, NaCl stresinin, bitki büyümesinde, klorofil içeriğinde ve fotosistem II'nin (PSII) fotokimyasal aktivitesinde düşüşe yol açtığını göstermiştir. Bununla birlikte, ROT seviyeleri, tuz stresi altında önemli ölçüde artmıştır. Yine aynı çalışmada, MEL uygulamasının ise klorofil içeriğini artırdığını, ROT seviyelerini azalttığını ve mısır fidelerindeki fotosentetik aktiviteyi antioksidan enzimlerin aktivasyonu yoluyla artırdığını gözlenmiştir.

Gao *et al.* (2018), kuraklık stresi altındaki olası antioksidan mekanizmasını araştırmak için MEL'in yulaf üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. 100 mM MEL ön işleminin, H₂O₂ ve süperoksit anyon (O₂⁻) içeriğini azalttığı, %20 PEG-6000 yulaf fidelerinin yapraklarında süperoksit dismutaz (SOD), peroksidaz (POD), katalaz (CAT) ve askorbat peroksidaz (APX) aktivitelerini artırdığını gözlenmiştir. Ayrıca MEL, mitozda aktive olan protein kinazların (MAPK'ler) (Asmap1, Aspk11) ve transkripsiyon faktörü (TF) genlerinin (NAvC hariç, WRKY1, DREB2 ve MYB) ekspresyon seviyelerini artırmıştır. Bu çalışmada MEL'in MAPK'lerin ve TF'lerin ekspresyonunu indükleyebildiğini, strese duyarlı genlerin ekspresyonunu düzenleyebildiğini ve böylece bitkinin toleransını artırdığını gösterilmiştir.

3. MATERİYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1 Kullanılan bitkisel materyal

Araştırmada bitki materyali olarak, İvanka ve Yedikule marul çeşitleri ticari olarak temin edilmiştir.

3.1.2. Kullanılan alet ve cihazlar

Çalışma esnasında aşağıdaki alet ve cihazlar Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışma esnasında aşağıdaki alet ve cihazlar kullanılmıştır.

Malzeme	Markası
Buzdolabı	Arçelik 8190NF
Destile Su Cihazı	GFL 2004
Elektroforez Tankı (Yatay)	OWL B2
Elektrorez Akım Sağlayıcı	OWL OSP300-2Q
Hassas Terazı	Mettler Toledo AL204
Kar Üretme Makinesi	Scotsman, AH 198285
Manyetik Karıştırıcı	Daihan Scientific MSH 20A
pH Metre	InoLab Ph730 wtw Series
Santrifüj	Hettich EBA-20
Jel Görüntüleme Sistemi	DNR Biomagig Systems MiniBis Pro
Mikrodalga Fırın	Arçelik, MD 592
Su Banyosu	Memmer WNB14
Ependorf Tüpler	Ependorf
PCR	Corbett Research CG1-96
Realtim PCR	QIAGEN
Spektrofotometre	Cecil, CE5502
Mikropipet Takımı	Ependorf
Steril Kabin	Esco AC2-4E1
Derin Dondurucu (-86)	Nuarie
Desikatör	ISOLAB
Aeroponic Çelik Propagatörü	X-Stream
İletkenlik ve Tds Ölçer	OHAUS

3.1.3. Kullanılan çözelti ve solüsyonlar

Araştırma sürecinde kullanılan çözeltilerin kimyasal içerikleri aşağıda verilmiştir:

➤ Sterilizasyon işlemleri için kullanılan çözeltiler

- %10'luk NaOCl
- %70'lik Etil alkol

➤ Çimlendirme ortamında kullanılan kimyasallar

Tohum çimlendirilmesi için temel besin ortamı olarak Murashige and Skoog (1938) tuzları kullanılmıştır. MS ortamının içerdiği kimyasallar ve miktarları Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. MS kültür ortamında kullanılan kimyasallar ve miktarlar

KİMYASAL BİLEŞİMİ	Miktarı (mg/l)
İnorganikler	
Makro elementler	
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
CaCl ₂	332,2
MgSO ₄	180,7
KH ₂ PO ₄	170
Mikro Elementler	
Na ₂ EDTA	37,26
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8
MnSO ₄ .H ₂ O	16,9
KI	0,83
H ₃ BO ₃	6,2
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025

➤ **Bitki büyümede kullanılan besin ortamı**

Denemede besi ortamı hazır olarak sağlanan Hoagland ve Arnon (1938) (Sigma H2395-1L) kullanılmıştır. Hoagland ve Arnon (1923) ortamının içerdiği kimyasallar ve miktarları Çizelge 3.3’de verilmiştir.

Çizelge 3.3. Hoagland ve Arnon (H2395) kullanılan kimyasallar ve miktarlar

KİMYASAL BİLEŞİMİ	Miktarı (mg/l)
İnorganikler	
NH ₄ H ₂ PO ₄	115,03
H ₃ BO ₃	2,86
Ca(NO ₃) ₂	656,4
CuSO ₄ •5H ₂ O	0,08
Fe ₂ (C ₄ H ₄ O ₆) ₃	5,32
MgSO ₄	240,76
MgCl ₂ · 4H ₂ O	1,81
MoO ₃	0,016
KNO ₃	606,6
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,22

➤ **Stres ajanı ve iyileştirici olarak kullanılan kimyasallar**

- 150 mM NaCl (ACROS 327300010)
- 0, 50, 100,200 µM MEL (ACROS 125362500)

➤ **mRNA ifade seviyelerinin belirlenmesinde kullanılan kimyasal ve çözeltiler**

mRNA seviyelerinin belirlenmesinde kullanılan kimyasal ve çözeltiler Çizelge 3.4’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.4. mRNA ifade seviyelerinin belirlenmesinde kullanılan kimyasal ve çözeltiler

RNA izolasyonunda kullanılan kimyasal ve çözeltiler
• Sodyum hipoklorit • DEPC • Trizol reagent • Kloroform • Isopropanol • Etil alkol • RNase free water
cDNA sentezi için kullanılan kimyasal ve çözeltiler
• Sodyum hipoklorit • Etil alkol • DEPC • Revertaid first strand cDNA synthetase kit • Oligo (dT) • 5x reaksiyon buffer • Ribolock RNase inhibitör • dNTP mix • Revertaid M-MuLYRT • Nükleaz free water
RT-PCR için kullanılan kimyasal ve çözeltiler
• Sodyum hipoklorit • Etil alkol • DEPC • İleri-geri primer • CYBR Green master mix

➤ **MSAP analizinde için kullanılan çözeltiler;**

MSAP analizinde kullanılan kimyasal ve çözeltiler Çizelge 3.5’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.5. mRNA ifade seviyelerinin belirlenmesinde kullanılan kimyasal ve çözeltiler

DNA izolasyonunda kullanılan kimyasal ve çözeltiler

- Tris-HCL
- EDTA
- NaCl
- TE Buffer
- Sodyum Asetat
- Amonyum Asetat
- Kloroform izoamilalkol
- CTAB
- Sodyum bisülfid
- β-merkaptoetanol
- İzopropanol
- Proteinaz K
- Etil alkol
- Ribonükleaz

MSAP analizinde kullanılan kimyasal ve çözeltiler

- NEB2
- BSA
- ATP
- T4 DNA ligaz
- dNTPs
- PCR Tamponu
- Taq DNA polimeraz

MetaPhor agaroz jel elektroforezi için kullanılan kimyasal ve çözeltiler

- Agaroz
 - MetaPhor agaroz
 - TBE
 - Etidyum Bromür
 - Bromfenol Blue
-

3.2. Yöntem

3.2.1. Bitki çimlendirme ortamlarının hazırlanması

Tohum çimlendirilmesi için temel besin ortamı olarak Murashige and Skoog tuzlarından (M5524) 1L ortam için 2,15 g ve 1,95 g MES hydrate tartılmış 950 ml saf su içerisinde eriyinceye kadar çözdürülmüştür. Çözeltinin PH'sı 5,8'e 1N NaOH ile ayarlanmış ve 2 g/l phytagel içeren erlene eklenmiştir. Solüsyon 105 kPa'da 121 °C'de 20 dk otoklavlanarak steril edilmiş ve otoklavlanan besi yerinin sıcaklığı 40-45 °C'ye düştüğünde petri kaplarına dökülmüştür.

3.2.2. Tohum sterilizasyonu

3.2.2.a. Sterilizasyonda kullanılan solüsyonların hazırlanışı

%6,15'lik NaOCl: Ticari ACROS (219255000) %15'lik NaOCl'den 410 ml alınarak hacim saf su ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır.

%70'lik Etil alkol: ISOLAB (920.026.2500) %100'lük etil alkol'den 70 ml alınmış ve toplam hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır.

3.2.2.b Tohum sterilizasyonun yapılışı

- 1.5 ml santrifüj tüplerine tohumlar (250 mg) eklenip her tüp kurşun kalemle etiketlenmiştir. Etiketlenmiş her tüp, kapağı açık bir desikatöre yerleştirmiştir.
- Desikatör aktif bir çeker ocak içine yerleştirilip valfi kapatılmıştır.
- 250 ml'lik behere (%6,15) NaOCl'den 100 ml eklenerek desikatöre yerleştirilmiştir.
- Hızlı bir şekilde bu solüsyon üzerine 3 ml 12 M hidroklorik asit eklenerek 4 saat süreyle sterilizasyon gerçekleştirilmiştir.

- 4 saat sterilizasyondan sonra çeker ocak içinde desikatör kapağı açılarak NaOCl ortamdan uzaklaştırılmıştır.
- Daha sonra sterilizasyon kapağı açılarak steril edilmiş tohumlar yaklaşık 40 dakika boyunca havalandırılmıştır. Bu süreden sonra, tohumlar çimlenme için hazırlanan besi ortamına aktarılmıştır.

3.2.3. Bitki büyütme besin çözeltisinin hazırlanışı

Denemede besi ortamı hazır olarak sağlanan Hoaglang ve Arnon (1938) (Sigma H2395-1L)'dan 1,6 g tartılmış ve 2 L saf su içerisinde çözdürülerek ½ Hoagland solüsyonu elde edilmiştir.

3.2.4. Tohum çimlendirilmesi, bitkilerin yetiştirilmesi ve kimyasal ajanların uygulanması

3.2.4.a. Stres ajanı ve iyileştirici olarak kullanılan kimyasalların hazırlanışı

Araştırmada tuz stresi oluşturmak için Hoaglang besiyerlerine 1litre için 8,75 g NaCl eklenmiştir.

1mM melatonin stok solüsyonu hazırlamak için 23,228 mg melatonin tartılmış ve 50 ml ethanolde çözdürülmüş ve daha sonra toplam hacim 100 ml'ye tamamlanmıştır. Uygulamada kullanılan melatonin stok solüsyonundan alınan dozlar Çizelge 3.6'da verimiştir.

Çizelge 3.6. MEL çözeltilerinin içeriği

MEL (μ M)	1mM MEL (ml)/100 ml saf su
0	-
50	5 ml
100	10 ml
200	20 ml

3.2.4.b. Tohum çimlendirilmesi, bitkilerin yetiştirilmesi ve kimyasal ajanların uygulanması

Yüzey sterilizasyonu yapılmış tohumlar $\frac{1}{2}$ MS ortam ve %1 (w/v) phytagel içeren petri kaplarına steril şartlarda ekilmiştir. Ekim yapılan petriler, stratifikasyon için 5°C’de 16 saat süreyle büyütme kabininde bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda petriler 20°C’de 16:8 saat ışık: karanlık koşullarda 7 gün süreyle çimlendirilmiştir (Bufalo *et al.* 2012).

Bu süre sonunda meydana gelen normal kök ve gövdeye sahip bitkiler $\frac{1}{2}$ dozda Hoogland solüsyonu (Hoagland and Arnon,1938) içeren (pH=5,5-5,7) hidroponik sisteme alınmış ve 3 hafta süreyle gelişmeleri sağlanmıştır. Gelişmelerini tamamlamış fideler tuz stresine alınmadan 24 saat önce yapraktan sprey şeklinde MEL farklı dozu uygulanarak (0, 50, 100 ve 200 μ M) (Yu *et al.* 2018) NaCl (0 ve 150 mM NaCl) (Zapata *et al.* 2003) içeren Hoogland solüsyonu içeren hidroponik sistemde aynı şartlarda 15 gün süreyle strese maruz bırakılmıştır. Araştırma tam şansa bağlı deneme planına göre 3 tekrarlı olarak ve her tekerrürde 25 bitki olacak şekilde kurulmuştur.

3.2.5. Fizyolojik parametreler

Araştırmada aşağıda verilen fizyolojik parametreler stresin 15. gününde aşağıda ayrıntılı olarak belirtilen yöntemlere göre belirlenmiş ve analiz edilmiştir.

3.2.5.a. Hücre membran hasarı (%)

Hücre membran hasarı Lutts *et al.* (1996)'ya göre yapılmıştır. Yaprak örnekleri (1 cm yaprak diskleri) distile su ile yıkanmış ve içerisinde 15 ml saf su bulunan tüplere aktarılıp 25 °C'de 24 saat bekletilmiştir. Bu süre sonunda EC₁ değeri EC metre ile ölçülmüştür. Ardından örnekler 120 °C'de 20 dk otoklavlanmış, 25°C'ye gelinceye kadar soğutulmuş ve EC₂ değeri EC metre ile ölçülmüştür. Bu değerlerden yararlanarak aşağıdaki formülden hücre membran hasarı belirlenmiştir.

$$\text{Hücre membran hasarı (\%)} = (\text{EC}_1/\text{EC}_2) \times 100$$

3.2.5.b. Nispi su içeriği (%)

Uygulama sonunda her uygulama için her tekerrürden 3 bitkiden alınan yaprak örneklerinin yaş ağırlıkları (YA) (g) belirlenip kapaklı petri kaplarına yerleştirilmiştir. Daha sonra yaprakların turgorlu hale gelmeleri için saf suda 4 saat bekletilmiş ve 4 saat sonra turgor ağırlıkları (TA) (g) belirlenmiştir. Daha sonra 80°C'de etüvde 48 saat süreyle bekletilmiş ve kuru ağırlıkları (KA) (g) belirlenmiştir.

Yaprak nispi su içeriği aşağıdaki formüle göre % olarak hesaplanmıştır (Barr and Weatherley 1962).

$$\text{Nispi su içeriği (\%)}: [(YA - KA) / (TA - KA)] \times 100$$

3.2.5.c. Klorofil miktarı (SPAD)

Her uygulama için her tekerrürde şansa bağlı olarak seçilen 5 bitkinin üst yaprağının orta damarına gelmeyecek şekilde tam orta kısımları SPAD aleti ile (SPAD-502 Chlorophyll Meter; Konica Minolta, Tokyo, Japan) göreceli klorofil miktarı belirlenmiştir.

3.2.5.d. Fizyolojik parametrelere ait verilerin analizi

Fizyolojik parametrelere ait veriler tam şansa bağlı deneme planına göre 2 (genotip) x 2 (NaCl dozu) x 4 (MEL dozu) faktöriyel düzende PROC GLM ile SAS 9.3 programı (SAS Institute 1999) ile varyans analizine tabi tutulmuş ve ortalamalar arasındaki farklılıklar %5 önem seviyesinde Fisher's LSD çoklu karşılaştırma testi ile yapılmıştır.

3.2.6. Moleküler değerlendirmeler

Strese maruz bırakılan bitki örnekleri DNA ve RNA izolasyonu için sıvı azotta bir süre tutularak çalışma yapılacağı güne kadar -80 °C'de bekletilmiştir.

3.2.6.a. Gen ifadesi analizi

➤ RNA İzolasyonu

Maruldan RNA izolasyonu için Trizol reagent (Invitrogene,USA) kullanılmıştır. 100 mg bitki örnekleri sıvı azot yardımıyla toz haline gelinceye kadar ezilip steril ependorf tüplere alınarak sıvı azot içerisine bırakılmıştır. Sıvı azottan alınan tüpler üzerine 1 ml Trizol reaktifi (Invitrogene, USA) eklenmiştir. Örnekler 5 dk oda sıcaklığında bekletilerek nükleoprotein komplekslerinin tamamen ayrışması sağlanmış sonrasında 30 saniye vortekslenmiştir. Her bitki örneğine 0,2 ml kloroform eklenmiştir. Kapaklar iyice kapatılarak 15 saniye elle hızlıca çalkalanmış ve 5 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Sonrasında 4 °C'de 10 dakika 15000 rpm'de santrifüj edilecektir.

Üstteki sıvı faz yeni bir steril ependorf tüpe aktarılıp üzerine isopropanolle eklenerek RNA'nın çökmesi sağlanmıştır. Örnekler -20 °C'de 20 dakika bekletilmiş ve sonrasında 10 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. 15000 rpm'de 4 °C'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Üst faz dökülür. RNA çöktirsinin yıkama işlemi için %75'lik EtOH'dan 1 ml kullanılmıştır. Örnekler vorteks ile karıştırılarak 5 dakika 1000 rpm'de 4 °C'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası üst faz dökülür ve oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. İşlemler sonunda RNA peleti oda sıcaklığında kurumaya bırakılmış ve 30 µl RNase Free

Water ile çözölüp 10 dakika 55-60 °C’de bekletilip kullanılıncaya kadar -80 °C’de saklanmıştır.

Elde edilen RNA’ların miktarlarını belirlemek için Qiagen Nanodrop’da A260/280 O.D. değeriindeki ölçümler alınmıştır. RNA miktarları okunduktan sonra tüm örneklerin miktarları 0,5 µg olacak şekilde ayarlanmıştır.

➤ **cDNA analizi**

cDNA sentezi için üretici firma Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA Sentez Kiti protokolüne göre şu işlemler uygulanmıştır. Steril tüplere hacimleri 0,1 ng-5 µg olacak şekilde toplam RNA konulmuştur. Ardından 1 µl oligo (dT) primer eklenerek toplam hacim 12 µl’ ye tamamlanmıştır. Karışım çok kısa santrifüj edildikten sonra 65 °C’de 5 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda her tüpe, 4 µl 5X Reaksiyon Buffer, 1 µl RevertAid M-MuLV RT, 2 µl 10 mM dNTP Mix ve 1 µl RiboLock RNase Inhibitor eklenerek son hacim 20 µl’ye tamamlanmıştır. Örnekler çok kısa santrifüj edildikten sonra PCR cihazına yerleştirilmiştir. 25 °C’de, 5 dakika, 42 °C’de, 60 dakika ve 70 °C’de 5 dakika tutulmuştur. Elde edilen cDNA’lar RT-PCR’ da kullanılmak üzere -80 °C’de saklanmıştır.

➤ **qRT-PCR analizi**

qRT-PCR işlemini gerçekleştirmek için SYBRGreen/Hi-ROX qPCR Kiti kullanılmıştır. Protokol üretici firmanın talimatları doğrultusunda aşağıdaki gibi yapılmıştır. Stok master mix aşağıda verildiği gibi hazırlanmıştır.

Kullanılan Malzemeler	Miktarlar
SYBR Green/Hi-ROX QPCR Master Mix (2X)	12,5 µl
İleri Primer (0,3 µM)	1,2 µM
Geri Primer (0,3 µM)	1,2 µM
cDNA	5 µl
Steril Su	4,5 µl
Son Hacim	25 µl

Karışım PCR tüplerine aktarılarak ve Qiagen Rotor Gene cihazına yerleştirilmiştir. 95°C’de 10 dk, 40 döngü olacak şekilde 95°C’de 15 sn, primerlerin bağlanma sıcaklıklarına göre de 30 sn, 72°C’de 30 sn tutulmuştur.

➤ Primerlerin Hazırlanması

Lactuca sativa genomunda yapılan biyoinformatik çalışmalar ile ilgili veri tabanlarından yararlanılarak *SOS1*, *SOS2*, *AKT1*, *NHX1* ve *HKT1* genlerine ait yeni bilgiler aday gen için primer tasarımı kullanılmıştır. Diğer bitkilerde bulunan bu seçilen genlerin protein sekansları kullanılarak NCBI-BLAST veritabanı taramaları yapılmış ve EST protein dizileri belirlenmiştir. Birinci aşamada, belirlenen protein dizileri arasından en çok benzerlik gösterenler seçilmiştir. Böylece tarama yapılan EST dizileri ile *Lactuca sativa* proteinlerinin ne oranda benzerlik gösterdiği saptanmıştır. İkinci aşamada ise yüksek oranda benzerlik gösteren dizilerden ileri ve geri yönlerde primer tasarımı yapılmıştır. *SOS1*, *SOS2*, *AKT1*, *NHX1* ve *HKT1* genlerinin ortologları bulunarak tespit edilmiştir. Böylece Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>) yardımıyla primerler tasarlanmıştır. TUB ve UBQ referans genleri için Borowski *et al.* (2014)’ün kullanmış olduğu primerler kullanılmıştır. Hedef genler ile referans genlere ait ileri ve geri primer dizilimleri aşağıda belirtilmiştir (Çizelge 3.7)

Kullanılan primerler firmanın önerdiği miktarda sulandırılarak stok solüsyonu, daha sonra da uygun hesaplamalar ile 1 µM olacak şekilde çalışma solüsyonları hazırlanmıştır.

Çizelge 3.7. Kullanılan primerlerin baz dizilimi ve Tm sıcaklıkları

Primer-GEN	Forward Primer 5'→3'	Tm	Reverse Primer 5'→3'	Tm
<i>SOS1</i>	TGATAATAGCGGCGGAGGAG	54°C	TGGAGGTCGTGTGAAAGAGA	52°C
<i>SOS2</i>	TGCTAGCTATCAAATCAGTGGAG	53°C	CTCCAGCAGCTTTTCGAACA	52°C
<i>AKT1</i>	GGGTTTCAATGTGTGGCGAT	52°C	TCACTCATCCGGTTTGCATC	52°C
<i>NHX1</i>	TCGCGTTATTGCTTGGGAAA	50°C	TACTCTGTTCGGTTGGTGGT	52°C
<i>HKT1</i>	GGAGCCACGGAATCCTATGA	54°C	TGCTGGAGAGATGAGGGAAA	52°C
<i>TUB</i>	TAGGCGTGTGAGTGAGCAGT	54°C	AACCCTCGTACTCTGCCTCTT	54°C
<i>UBQ</i>	AAGACCTACACCAAGCCCAA	52°C	AAGTGAGCCCACACTTAC	48°C

➤ Verilerin değerlendirilmesi ve istatistiksel analizi

Gen ekspresyon analizi sonucunda örneklerin eşik (threshold) değerleri belirlenmiştir. qPCR analiz sonuçlarına göre örneklerin Ct değerlerine ait standart sapmalar Microsoft Excel programı yardımıyla hesaplanmıştır. Standart sapması düşük olan örnekler 3 tekerrür üzerinden değerlendirilmiştir. Marul çeşitlerine ait genlerin ifade oranları Livak ve Schmittgen (2001)'e göre $2^{-\Delta\Delta C_t}$ oransal hesaplama algoritması ile belirlenmiştir. RT-PCR analizinde genlerin ifadesi referans gen ifadesine göre gerçekleştirilmiştir.

3.2.6.b. MSAP analizi

➤ DNA izolasyonunda kullanılan çözeltilerin hazırlanışı

1M Tris-HCl (1000 ml)

121,1 gram Tris-base

700 ml dH₂O

42 ml konsantre HCl (%37,2-12,1 M)

700 ml su içerisine 121,1 gr Tris-base karıştırılmıştır. Üzerine 42 ml konsantre HCl eklenerek toplam hacim 1 litreye tamamlanmış ve otoklavlanmıştır.

0.5 M EDTA PH=0.8 (1000 ml)

136,1 g EDTA

20 g NaOH

800 ml dH₂O

800 ml su içersine 136,1 g EDTA eritilip, üzerine 20 g NaOH eklenerek pH=8.0 olarak ayarlanmıştır. Filtreden geçirilmiş ve otoklavlanmıştır.

5 M NaCl (500 ml)

146,1 g NaCl

450 ml dH₂O

146,1 g NaCl 450 ml suda eritilmiştir. Toplam hacim 500 ml'ye tamamlanıp oda sıcaklığında saklanmıştır (otoklavlanmamıştır).

10X TE Buffer (1000 ml)

100 ml 1 M Tris-HCl pH=8.0

20 ml 0,5 M EDTA

880 ml dH₂O kullanılarak hazırlanmıştır.

1X TE Buffer (1000 ml)

10X TE Buffer'dan 100 ml alınıp 900 ml saf suyla 1000 ml'ye tamamlanmıştır.

(DNA 1X TE'de çözülmüştür)

3 M Sodyum Asetat (Ph= 5,2) (100 ml)

40,8 g Sodyum Asetat (NaOAc.3H₂O) 80 ml ultra saf suda iyice eritilir ve pH= 5,2 oluncaya kadar glasiyel asetik asit (GAA) eklenmiş ve toplam hacim 100 ml'ye tamamlanmıştır.

10 M Amonyum Asetat

77 g Amonyum asetat,

800 ml dH₂O,

77 g Amonyum asetat 800 ml distile su içerisinde çözülmüştür. Distile su kullanarak hacmi 1 litreye tamamlanarak stok hazırlanmış ve +4°C’de muhafaza edilmiştir.

DNA ekstraksiyon tamponu (50 örnek için)

1 g toz CTAB (Setil trimetil amonyum bromür)

0.5 g (%0,1) Sodyum bisüfit (NaHS_3 ve $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ karışımı) (Sigma, 243973)

5 ml Tris-HCl (1 M)

14 ml NaCl (5 M)

2 ml EDTA (0.5 M)

0.1 ml (%0.2) β -merkaptoetanol (v/v)

Kloroform: İzoamil alkol

24: 1 oranında hazır olarak kullanılmıştır (Fluka, 25666).

2-propanol (izopropanol)

Hazır olarak kullanılmıştır (Sigma, I9516).

Proteinaz K

Mililitrede 10 mg olacak şekilde hazırlanmıştır (Sigma, P2308).

Ribonükleaz (RNaz)

Mililitrede 10 mg olacak şekilde hazırlanmıştır (Sigma R6513).

%70’lik Etil Alkol

70 ml saf etil alkolün hacmi steril distile su ile 100 ml’ye tamamlanmıştır.

➤ **DNA izolasyonun yapılışı**

Çalışma anında hazırlanacak olan DNA ekstraksiyon tamponu önceden 65 °C’ye ısıtılan su banyosunda bekletilmiştir. Bitki materyaline ilave edilmeden önce ekstraksiyon

tamponuna %0,2 (v/v) oranında β -merkaptoetanol ilave edilmiştir. Daha sonra sıvı azotta parçalanıp 2ml'lik tüplere alınacak olan 0,3 g bitki materyali üzerine 1000 μ l DNA ekstraksiyon tamponu eklenmiş ve alt üst ederek karıştırılmış ve önceden 65 °C'ye ısıtılmış su banyosunda her 10 dk'da alt üst edilip karıştırılarak 60 dk. bekletilmiştir. Su banyosu aşamasından sonra 10 dakika oda sıcaklığında soğumaya bırakılıp ve bu süre sonunda her örneğe 750 μ l kloroform izoamil alkol eklenip tüm örnekler 15 dk. yavaşça alt üst ederek karıştırılmıştır. 14000 g ve 24 °C'de 20 dk. santrifüjlenirip üst faz yeni bir tüpe aktarılmıştır. Alınan oranda kloroform izoamil eklenmiştir. Tekrar 14000 g ve 4 °C'de 20 dk. santrifüjlenirilmiş üst faz dikkatli bir şekilde yeni bir tüpe aktarılmıştır. Üst faza 2,5 μ l RNaz ve 8 μ l proteinaz K eklenmiş ve 45 dak. 37 °C'de bekletilmiştir. DNA'yı çöktürmek için her tüpe 100 μ l amonyum asetat (10M) , 100 μ l sodyum asetat (3M), ve hacmin iki buçuk katı kadar -20 °C'de muhafaza edilen izopropanol eklenip yavaşça alt üst edilmiş ve bu esnada DNA görülmüştür. 14000 g ve 4 °C'de 20 dk. santrifüj yapıldıktan sonra üst faz atılmış. Tekrar 1 dak. santrifüj yapılarak kağıtta ters çevrilip kurutulmuştur. 37 °C'de 15 dk. kurutulmuş ve üzerine 100 μ l 1X TE eklenmiştir.

Elde edilen örnekler 24 saat +4°C'de dinlendirildikten sonra kullanılıncaya kadar -20°C'de saklanmıştır.

➤ MSAP tekniği

200-400 ng DNA 5U *EcoRI* ve 5U *MspI* ya da *HpaII* ile kesilmiştir. Toplam hacim 30 μ l olacak şekilde reaksiyon ortamına 1X NEB2 ve BSA (75 ng/ μ l) eklenmiştir. DNA fragmentleri *MspI*-*HpaII* (50 pmol) ve *EcoRI* (5 pmol) adaptörlerine 1 mM ATP ve 1 U T4 DNA ligaz kullanılarak 37°C'de 3 saat bekletilerek bağlanacaktır. Örnekler TE_{0.1} tamponu ile son hacmi 200 μ l olacak şekilde seyreltilmiştir. *EcoRI* ve *MspI*/*HpaII* adaptörlerinin sekansları Vos *et al.* ve Xiong *et al.* tarafından önerilen sekans dizileri ile aynı seçilmiştir.

Ön amplifikasyon basamağı; 4 μ l yukarıda verilen ürün, 2,5 pmol her bir primer (E01 ve HM0), 200 μ M dNTPs, 1X PCR tamponu ve 0,5 U Taq DNA Polimeraz içeren ve

toplamda 20 µl son hacme sahip bir karışım kullanılarak yapılmıştır. Sırasıyla 65 °C’de ve 95 °C’de ikişer dakikalık ön uygulamanın ardından 20 döngülük amplifikasyon uygulaması aşağıdaki gibi yapılmıştır.

- Denatürasyon: 94 °C’de 20 saniye
- Bağlanma: 56 °C’de 30 saniye
- Uzama: 72 °C’de 2 dakika
- Sonlandırma basamağı: 72 °C’de 2 dakika ve 60 °C’de 30 dakika

Sonlandırma basamağının ardından PCR ürünü 1:10 oranında TE_{0.1} tamponu ile seyreltilmiştir. Seçici amplifikasyonlar ise belirlenen primer kombinasyonlarının kullanılmasıyla yapılmıştır. Bu reaksiyonlar, toplam hacmi 20 µl olan ve 4 µl ön amplifikasyon karışımı, 1,5 pmol hem 6-FAM hem de JOE floresan boya ile işaretlenmiş EcoRI primeri, 5 pmol MspI-HpaII primeri, 200 µM dNTPs, 1X PCR tamponu ve 0,5 U Taq DNA polimeraz içeren karışım ile gerçekleştirilmiştir. Uygulamada Touch Down PCR tekniğinden yararlanılmıştır. Örnekler Methafor agaroz jelde görüntülenmiştir.

MSAP tekniğinde Ding *et al.* (2019)’un kullanmış olduğu primerler kullanılmıştır. primerler firmanın önerdiği miktarda sulandırılarak stok solüsyonu, daha sonra da uygun hesaplamalar ile 1 µM olacak şekilde çalışma solüsyonları hazırlanmıştır. Çalışmada kullanılan primerlerin baz dizileri Çizelge 3.8’de verilmiştir.

Çizelge 3.8. Kullanılan primer ve adaptörlerin baz dizilimi

	Primer	5'→3'
	Eco RI primer +1 (50 ng/μL)	GACTGCGTACCAATTCG
	Hpa II– Msp I primer +1 (50 ng/μL)	GATGAGTCTCGATCGGT
A	EcoRI primer +3 (12 ng/μL)	GACTGCGTACCAATTCATG
B		GACTGCGTACCAATTCACC
C		GACTGCGTACCAATTCACG
D		GACTGCGTACCAATTCAGA
E		GACTGCGTACCAATTCATC
A	HpaII- MspI primer +3 (50 ng/μL):	ATCATGAGTCCTGCTCGGTCG
B		ATCATGAGTCCTGCTCGGTTC
C		ATCATGAGTCCTGCTCGGTTG
D		ATCATGAGTCCTGCTCGGTGA
E		GATGAGTCTCGATCGGTAC
	HpaII–MspI adapter	GACGATGAGTCTCGAT CGATCGAGACTCAT
	EcoRI-adapter	CTCGTAGACTGCGTACC AATTGGTACGCAGTC

➤ **MetPhor agaroz jel elektroforezi**

Kullanılan Malzemeler;

- ✓ 4,5 g metpahor agaroz
- ✓ 1,5 g agaroz
- ✓ 250 ml soğutulmuş 1X TBE (Tris-base buffer)

➤ **PCR ve elektroforez işlemleri için kullanılan çözeltiler**

Etidyum Bromür Çözeltisi

500 ml 0,5 X TBE tamponu içerisine 300 ml etidyum bromür ilave edilerek hazırlanmış ve karanlık ortamda oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

Loading Buffer Çözeltisi

0,25 g bromfenol blue ve 30 ml gliserol'ün toplam hacminin 100 ml'ye tamamlanmasıyla hazırlanmıştır. Çözelti otoklavda steril edildikten sonra +4°C'de muhafaza edilmiştir.

10X TBE tamponu

108 g Tris-base

55 g Borik asit

40 ml 0,5 M EDTA

700 ml dH₂O

700 ml distile su içerisinde 108 g Tris-base, 55 g Borik asit ve 40 ml 0,5 M EDTA çözülmüştür. Toplam hacim 1000 ml'ye tamamlanmış ve otoklavlanmıştır.

0,5X TBE tamponu

Bu araştırmada kullanılan TBE tamponu 10X TBE olarak hazırlanmış ve seyreltilerek (50 ml 10X TBE Tamponu + 950 ml saf su) 0,5X TBE tamponu hazırlanmıştır.

Jelin Hazırlanışı

2000 ml' lik beher içerisine 250 ml soğutulmuş 1X TBE ilave edilerek manyetik karıştırıcı üzerine konulur. 1,5 g agaroz ilave edilerek çözünmesi sağlanır. Agaroz çözüldükten sonra 4,5 g metpahor agaroz yavaş yavaş behere eklenir ve karıştırılır. Daha sonra solüsyon, agarozun tamamen erimesini sağlamak için mikrodalgaya alınır. Agaroz çözeltisinin erime/çözünme sırasında köpüklenmesini önlemeye yardımcı olmak için:

- A. Beher mikrodalga fırında orta güçte 1 dakika ısıtıldı.
- B. Çözeltiyi mikrodalgadan çıkarıldı.
- C. Solüsyonun 15 dakika boyunca soğumasını beklendi.

Çözelti kaynayana kadar mikrodalgada yüksek güçte tekrar ısıtılır. Kaynama noktasında tüm parçacıklar çözünene kadar bekletilir. Çözünmeden sonra çözelti 50°C - 60°C'ye kadar soğutulur.

Jel tankının hazırlanışı

Taraklar tanka yerleştirmiş 40-50 dk jel donana kadar bekletilmiştir. Soğuyan jel içerisine 5µl EtBr eklenmiştir. Daha sonra Jel tanka dökülmüş ve jelin donması beklenilmiştir. Jel donduktan sonra taraklar çıkarılmıştır.

Not: Jel tabakası cihaza yerleştirildikten sonra tanka jelin üstünü kapatacak şelikde 1X TBE eklenir. Elektrik akımının düz bir şekilde olması için jelin kuyucuklarında hiç bir hava kabarcığı kalmaması gerekmektedir. Cihazı çalıştırmadan önce bu hava kabarcıklarının tamamen temizlenmesi gerekmektedir.

Not: 8 µl nükleik asit, 3 µl Brom Fenol Blue ile birlikte pipetaj yapılarak kuyucuklara yüklenmiş ve Jel 120 V'da 120 dk yürütülmüştür.

➤ MSAP verilerinin değerlendirilmesi

MSAP analizi sonucunda primerlerin toplam, tam ve hemi-metilasyon sınıfları ve oranları Microsoft Excel programı yardımıyla hesaplanmıştır. Marul çeşitlerine ait DNA metilasyon oranları ve sınıfları Tang *et al.* 2014'e göre belirlenmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Çalışmamızda, İvanka ve Yedikule marul genotiplerinde 150 mM NaCl ve farklı konsantrasyonlarda (0, 50, 100, 200 μ M) uygulanan MEL uygulamalarının yaprak dokusundaki hücre membran hasarına (%), nispi su içeriğine (%), klorofil miktarına (SPAD) etkisi ile tuzluluk stresi ile ilişkili olduğu bilinen genlerin (*SOS1*, *SOS2*, *AKT1*, *NHX1* ve *HKT1*) ifadesi üzerine olan etkileri belirlenerek aşağıda belirtilen analiz sonuçlarına ulaşılmıştır.

4.1. Hücre Membran Hasarı (%)

Hücre membran hasarı oranı (%) üzerine genotipin etkisinin önemli ($p < 0,05$), uygulamanın ve bunların (GxU) interaksiyonlarının etkisinin ise çok önemli ($p < 0,01$) olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.1).

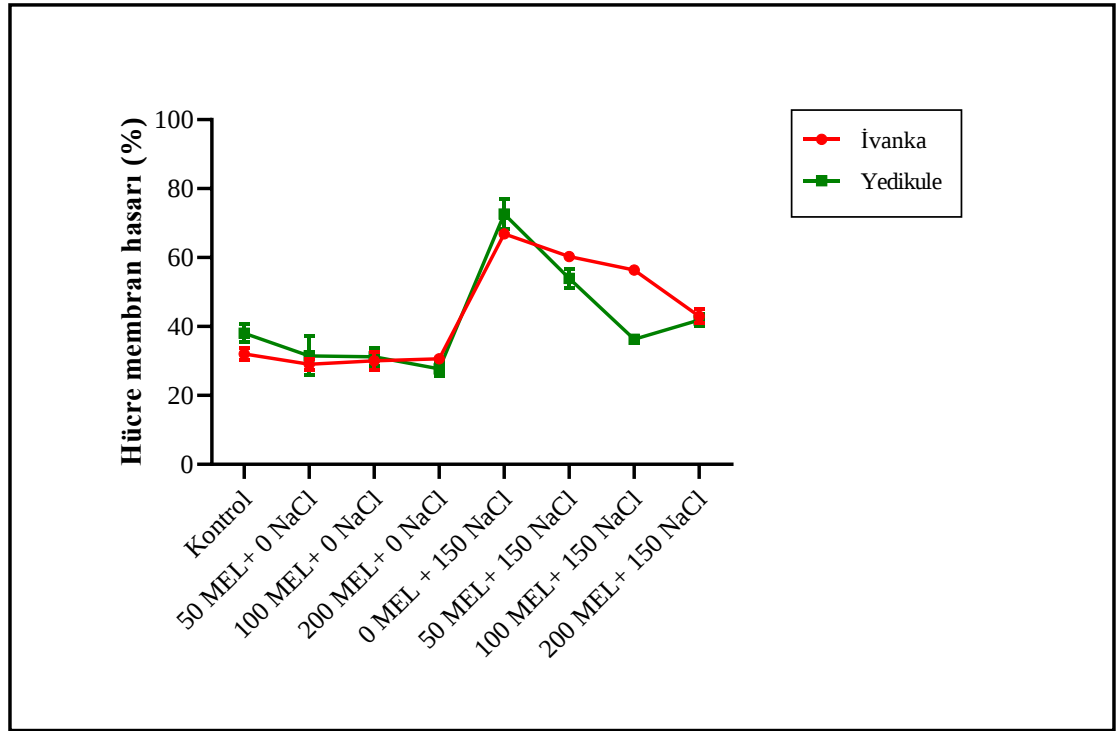
Çizelge 4.1. Uygulamalara göre genotiplerin hücre membran hasarı (%)

Uygulama	Yedikule	İvanka	Ortalama
Kontrol	38,08 ^c	32,03 ^e	35,06^e
50 μ M Mel	31,49 ^{de}	29,00 ^f	30,25^f
100 μ M Mel	31,24 ^{de}	30,02 ^{ef}	30,63^f
200 μ M Mel	27,72 ^e	30,61 ^{ef}	29,17^f
150 mM NaCl + 0 μ M Mel	72,64 ^a	66,84 ^a	69,74^a
150 mM NaCl + 50 μ M Mel	53,94 ^b	60,31 ^b	57,12^b
150 mM NaCl + 100 μ M Mel	36,25 ^{cd}	56,35 ^c	46,30^c
150 mM NaCl + 200 μ M Mel	41,88 ^c	42,97 ^d	42,43^d
Ortalama	41,66^B	43,52^A	42,59
F Değeri (Genotip) (G)	-	-	6.67*
F Değeri (Uygulama) (U)	66.34**	301.94**	205.63**
F Değeri (GxU)	-	-	17.35**
Varyasyon Katsayısı (%)	7.61	3.55	5.86

¹: Aynı sütunda ve satırda aynı harf ile işaretli ortalamalar birbirinden farklıdır. * ve ** ile işaretli F değerleri 0,05 ve 0,01 ihtimal düzeyinde önemlidir.

Genotipin ana etkisi değerlendirildiğinde, uygulamaların ortalamalarına göre İvanka genotipinin hücre membran hasar oranı (%32,03), Yedikule genotipinden (%38,08) daha düşük olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.1). Uygulamanın ana etkisi karşılaştırıldığında ise uygulamalara göre membran hasar oranı, %29,17 ile %69,74 arasında değişmiştir. Kontrole göre MEL uygulamasının tek başına etkileri incelendiğinde MEL'deki konsantrasyon artışı membran hasar oranını dikkate değer oranda azaltmıştır (Çizelge 4.1). Tuz stresi (%69,74) kontrole (%35,06) göre hücre membran hasarını artırmış ve tuz stresinde uygulanan MEL'in ise tuz stresine göre konsantrasyon artışına bağlı olarak hücre membran hasarını engellediği belirlenmiştir (Çizelge 4.1).

Genotiplerin hücre membran hasar oranı uygulamalara göre değişim göstermesi genotip x uygulama interaksyonunun çok önemli ($p<0,01$) olmasına neden olmuştur (Çizelge 4.1). Her iki genotipte de tek başına MEL uygulaması kontrole göre konsantrasyon artışına bağlı olarak hücre membran oranında azalmalara neden olmuştur. Her iki genotipte de tuz stresinde kontrole göre hücre membran hasar oranında artış görülmüştür. Diğer taraftan her iki genotipte de tuz stresinde uygulanan MEL konsantrasyon artışına paralel olarak tuzluluk stresindeki hücre membran hasar oranındaki artışı engellediği belirlenmiştir (Çizelge 4.1 ve Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Uygulamalara göre çeşitlerin hücre membran hasarı oranları (%)

4.2. Nispi Su İçeriği (%)

Nispi su içeriği değeri üzerine genotipin, uygulamanın etkisinin çok önemli ($p<0,01$), uygulamanın ve bunların (GxU) interaksiyonlarının etkisinin ise önemli ($p<0,05$) olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. Uygulamalara göre genotiplerin Nisbi su içeriği

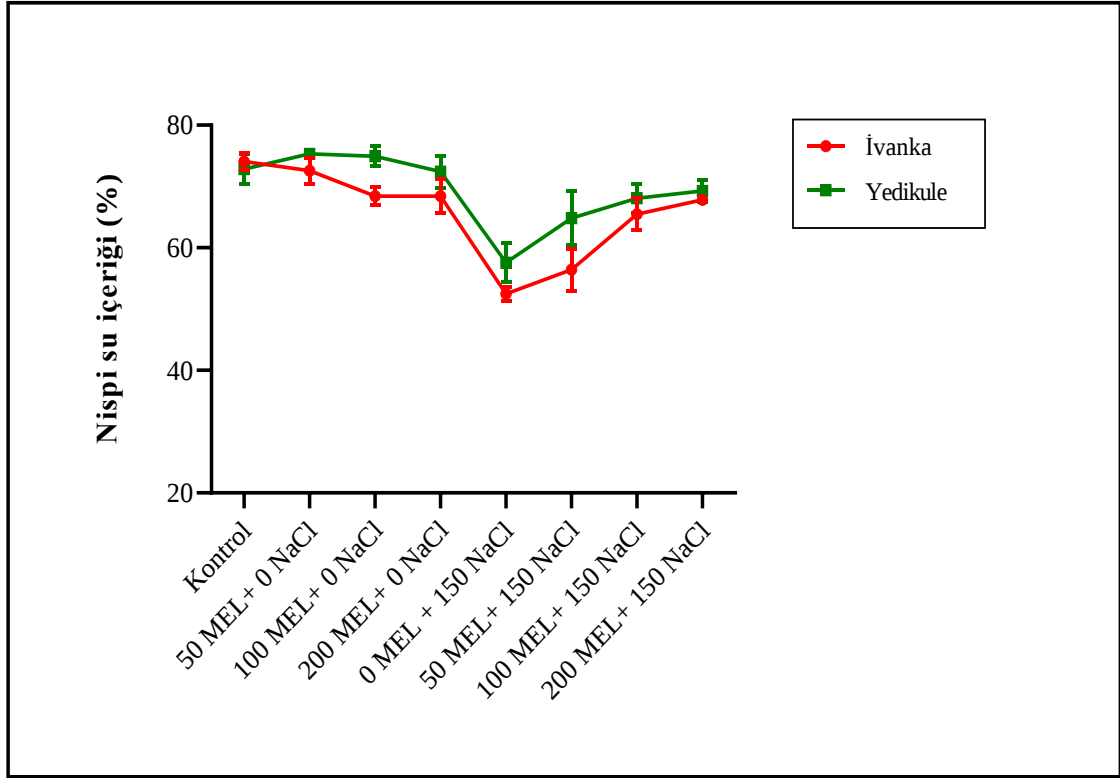
Uygulama	Yedikule	İvanka	Ortalama
Kontrol	72,84 ^{ab}	74,08 ^a	73,46^a
50 µM Mel	75,33 ^a	72,60 ^a	73,97^a
100 µM Mel	74,93 ^a	68,40 ^b	71,66^{ab}
200 µM Mel	72,43 ^{ab}	68,43 ^b	70,43^{bc}
150 mM NaCl + 0 µM Mel	57,56 ^d	52,48 ^d	55,02^f
150 mM NaCl + 50 µM Mel	64,84 ^c	56,43 ^c	60,63^e
150 mM NaCl + 100 µM Mel	68,09 ^{bc}	65,49 ^b	66,79^d
150 mM NaCl + 200 µM Mel	69,30 ^{bc}	67,84 ^b	68,57^{dc}
Ortalama	69,41^A	65,72^B	67,57
F Değeri (Genotip) (G)	-	-	28.84 ^{**}
F Değeri (Uygulama) (U)	15.72 ^{**}	37.25 ^{**}	46.37 ^{**}
F Değeri (GxU)	-	-	2.40 [*]
Varyasyon Katsayısı (%)	3.75	3.25	3.53

¹: 1:Aynı sütunda ve satırda aynı harf ile işaretli ortalamalar birbirinden farklıdır. * ve ** ile işaretli F değerleri 0,05 ve 0,01 ihtimal düzeyinde önemlidir.

Genotipin ana etkisi değerlendirildiğinde, uygulamaların ortalamalarına göre İvanka genotipinin nispi su içeriğinin (%74,08), Yedikule genotipinden (%72,84) daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.2). Uygulamanın ana etkisi karşılaştırıldığında ise uygulamaların nispi su içeriği %55,02 ile %73,97 arasında değişmiştir. Kontrole göre 50 µM MEL uygulamasının azda olsa nispi su içeriğini artırdığı ancak aralarındaki farkın önemli olmadığı belirlenmiştir. Diğer MEL konsantrasyonlarında ise kontrole göre nispi su içeriğinde azalma gözlenmiştir (Çizelge 4.2). Tuz stresinin (%55,02) kontrole (%73,46) göre nispi su içeriğini azalttığı ve tuz stresinde uygulanan MEL'in ise tuz stresine göre konsantrasyon artışı ile birlikte nispi su içeriğini artırdığı belirlenmiştir (Çizelge 4.2)

Genotiplerin MEL uygulamalarına göre nispi su içeriği değerleri farklılık göstermiş bu da genotip x uygulama interaksyonunun önemli olmasına neden olmuştur ($p<0,05$) (Çizelge 4.2). İvanka genotipinde tek başına MEL'in tüm konsantrasyonlarında kontrole göre nispi su içeriğinde azalışa neden olmuştur. Yedikule genotipinde ise 50 µM ve 100 µM MEL kontrole göre daha yüksek nispi su içeriği belirlenirken 200 µM MEL'de daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Yine her iki genotipte de tuz stresinde kontrole göre nispi

su içeriğinde azalış görülmüş bu azalış İvanka genotipinde daha fazla olmuştur (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Uygulamalara göre genotiplerin nispi su içerikleri (%)

Diğer taraftan her iki genotipte de tuz stresinde uygulanan MEL, konsantrasyon artışına paralel olarak tuzluluk stresindeki nispi su içeriğindeki azalışı engellediği belirlenmiştir (Çizege 4.2 ve Şekil 4.2).

4.3. Klorofil miktarı (SPAD)

Çizelge 4.3 incelendiğinde SPAD değeri üzerine genotipin etkisinin önemli ($p < 0,05$) olduğu; genotipin, uygulamanın ve bunların (GxU) etkisinin çok önemli ($p < 0,01$) olduğu görülmektedir.

Çizelge 4.3. Uygulamalara göre genotiplerin SPAD değerleri

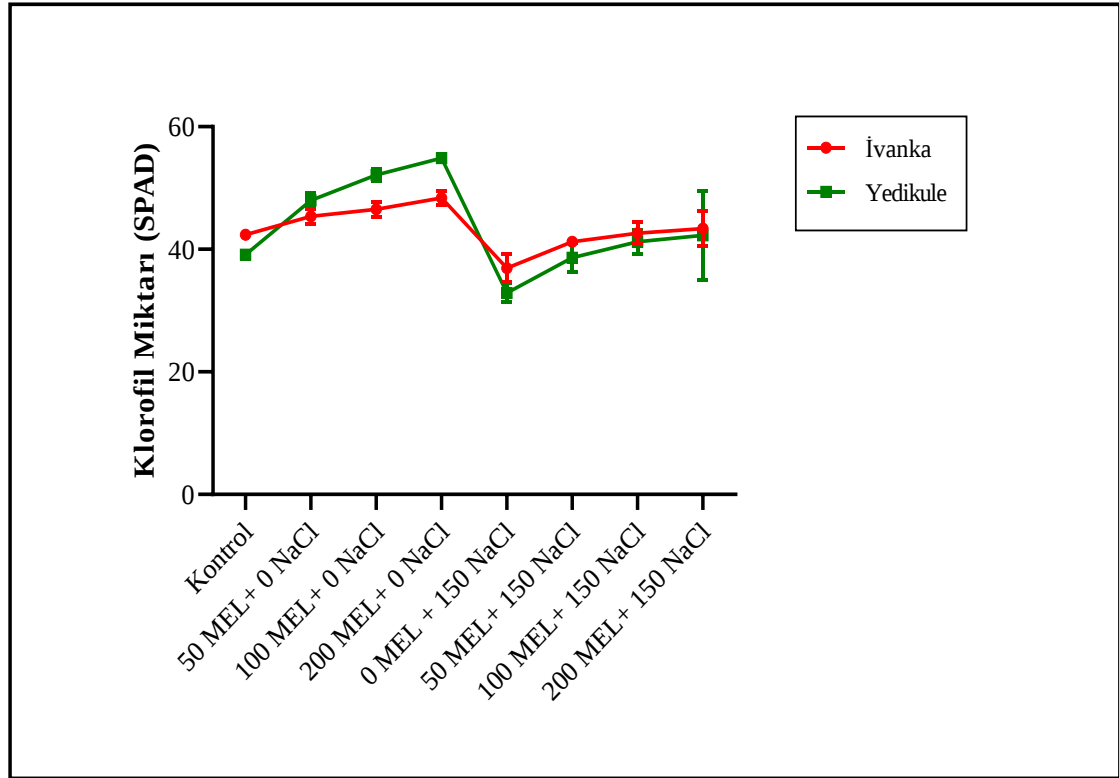
Uygulama	Yedikule	İvanka	Ortalama
Kontrol	39,10 ^c	42,40 ^{bc}	40,75^c
50 µM Mel	47,97 ^b	45,37 ^{ab}	46,67^b
100 µM Mel	52,10 ^{ab}	46,53 ^a	49,32^{ab}
200 µM Mel	54,87 ^a	48,37 ^a	51,62^a
150 mM NaCl + 0 µM Mel	32,87 ^d	36,93 ^d	34,90^d
150 mM NaCl + 50 µM Mel	38,63 ^c	41,20 ^c	39,92^c
150 mM NaCl + 100 µM Mel	41,23 ^c	42,63 ^{bc}	41,93^c
150 mM NaCl + 200 µM Mel	42,27 ^c	43,37 ^{bc}	42,82^c
Ortalama	43,63^A	43,35^A	43,49
F Değeri (Genotip) (G)	-	-	0.16 ^{öd}
F Değeri (Uygulama) (U)	19.13 ^{**}	13.43 ^{**}	31.12 ^{**}
F Değeri (GxU)	-	-	4.38 ^{**}
Varyasyon Katsayısı (%)	6.73	3.83	5.49

¹: Aynı sütunda ve satırda aynı harf ile işaretli ortalamalar birbirinden farklıdır. ^{öd} ve ^{**} ile işaretli F değerleri 0,05 düzeyinde önemsiz ve 0,01 ihtimal düzeyinde önemlidir.

Genotipin ana etkisi değerlendirildiğinde, MEL uygulamalarının ortalamalarına göre Yedikule genotipinin SPAD değeri (43,63), İvanka genotipinden (43,35) daha yüksek olduğu belirlenmiş ancak aralarındaki farkın önemsiz ($p < 0,05$) olduğu görülmüştür. Diğer taraftan uygulamanın ana etkisi karşılaştırıldığında ise uygulamalara ait SPAD değeri, 34,90 ile 51,62 arasında değişmiştir. Kontrole göre MEL uygulamalarının tek başına etkileri incelendiğinde MEL'deki konsantrasyon artışına paralel olarak SPAD değerinde dikkate değer artış gözlenmiştir. Yine tuz stresinin kontrole (40,75) göre SPAD değerini (34,90) azalttığı ve tuz stresinde uygulanan MEL'in ise tuz stresine göre konsantrasyon artışına bağlı olarak SPAD değerlerinde artışa neden olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.3).

Genotiplerin SPAD değeri, uygulamalara göre değişim göstermiş bu da genotip x uygulama interaksyonunun çok önemli olmasına neden olmuştur ($p < 0,01$) (Çizelge 4.3). Her iki genotipte de tek başına uygulanan MEL, kontrole göre konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak SPAD değerinde artışa neden olmuştur. Her iki genotipte de tuz stresinde SPAD değerinde kontrole göre azalma belirlenmiştir. Yine her iki genotipte de tuz

stresinde uygulanan MEL, konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak tuz stresinde elde edilen SPAD değerlerine göre artışa neden olmuştur (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Uygulamalara göre çeşitlerin SPAD değerlerine etkisi

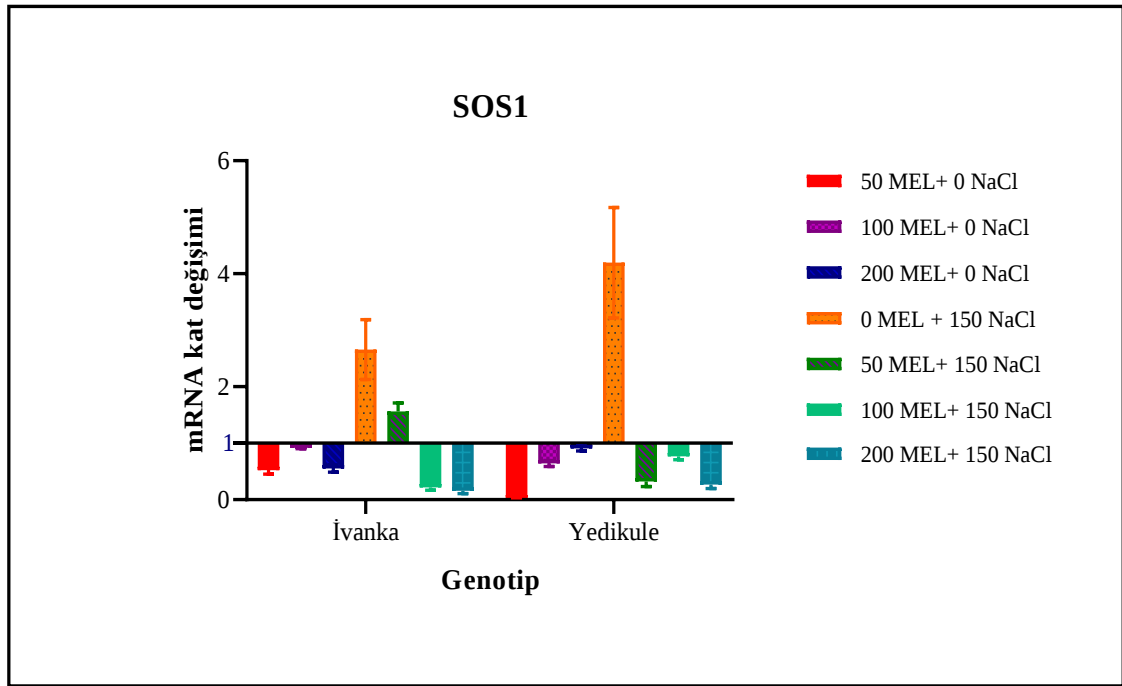
Sonuç olarak, iki genotipte de stressiz şartlarda uygulanan MEL'in SPAD değeri üzerine önemli bir etkisi olmuş ve MEL tuzluluk stresindeki SPAD değerindeki azalışı engellemiştir (Çizelge 4.3 ve Şekil 4.3).

4.4. mRNA İfade Analiz Sonuçları

Araştırmada incelenen *SOS1*, *SOS2*, *AKT1*, *NHX1* ve *HKT1* genlerinin mRNA seviyelerine ait sonuçlar aşağıda sırasıyla açıklanmıştır.

SOS1 gen ifade analiz sonuçlarına göre hem Yedikule hem de İvanka genotiplerinde tek başına MEL uygulamalarında *SOS1* geninin doz artışına bağlı olarak downregüle olduğu

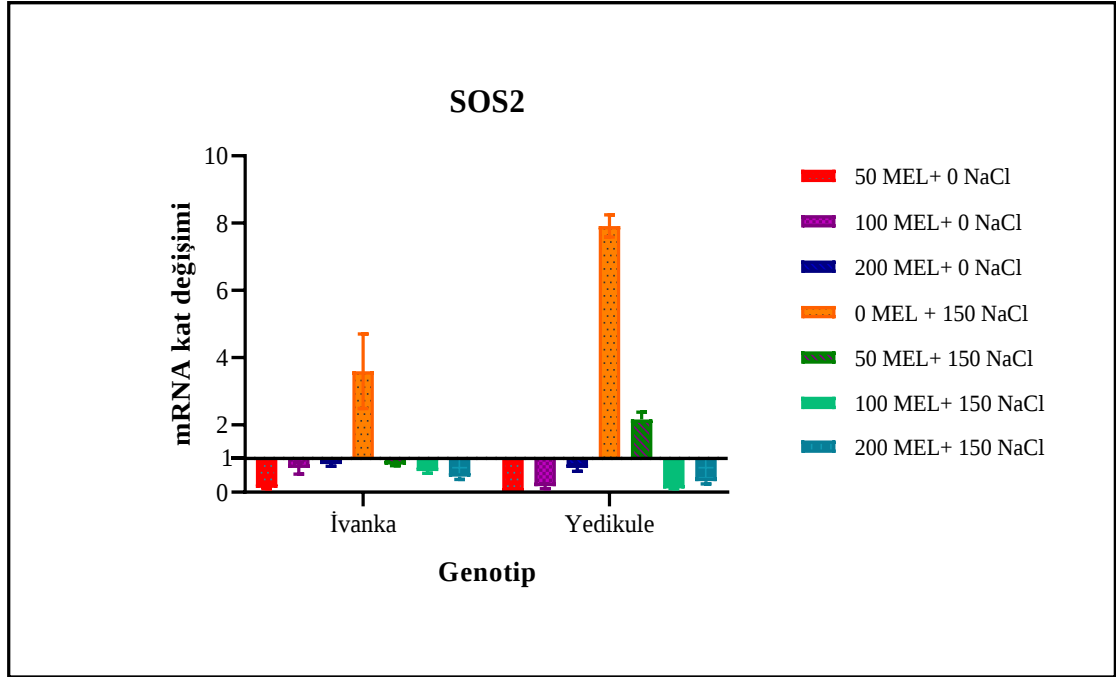
belirlenmiştir (Şekil 4.4). Bununla birlikte, İvanka'da hem tek başına NaCl uygulamasında hem de NaCl stresi altında 50 μ M MEL uygulamalarında bu genin upregüle olduğu tespit edilmiştir. Yedikule genotipinde ise tek başına NaCl uygulamasında upregülasyon meydana gelirken NaCl stresi altında uygulanan tüm MEL konstrasyonlarında downregülasyon meydana gelmiştir. *SOS1* geninin en yüksek upregülasyon oranı (5,18) 0 MEL + 150 NaCl uygulaması ile Yedikule genotipinde belirlenirken, en düşük downregülasyon oranı tek başına 50 Mel NaCl uygulaması ile Yedikule'nin yaprak dokusunda belirlenmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Tuzluluk stresi ve MEL uygulaması altındaki genotiplerin yapraklarındaki *SOS1* geninin ifade değişimleri ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)

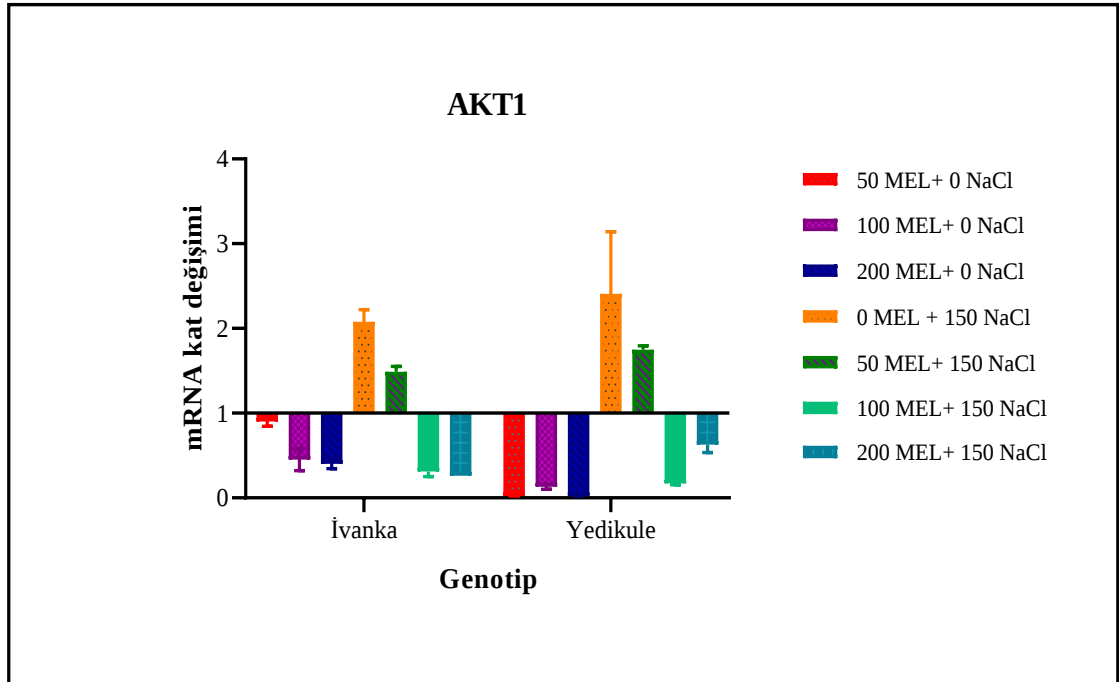
SOS2 geni ifade analiz sonuçlarına göre iki genotipte tek başına MEL uygulamalarında *SOS2* geninin downregüle olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.5). Hem tek başına Mel uygulamasında hem de NaCl stresi altında MEL uygulamalarında İvanka'da *SOS2* gen ifadesi downregüle iken Yedikule'de bu uygulamalardan 50 Mel+ 150 NaCl'de genin upregüle olduğu tespit edilmiştir. *SOS2* geninin en yüksek upregülasyon oranı (8,25) 0 Mel + 150 NaCl uygulaması ile Yedikule genotipinde belirlenirken en düşük

downregölasyon oranı (0.01) 50 Mel +150 NaCl uygulaması ile Yedikule genotipinde belirlenmiştir (Şekil 4.5).



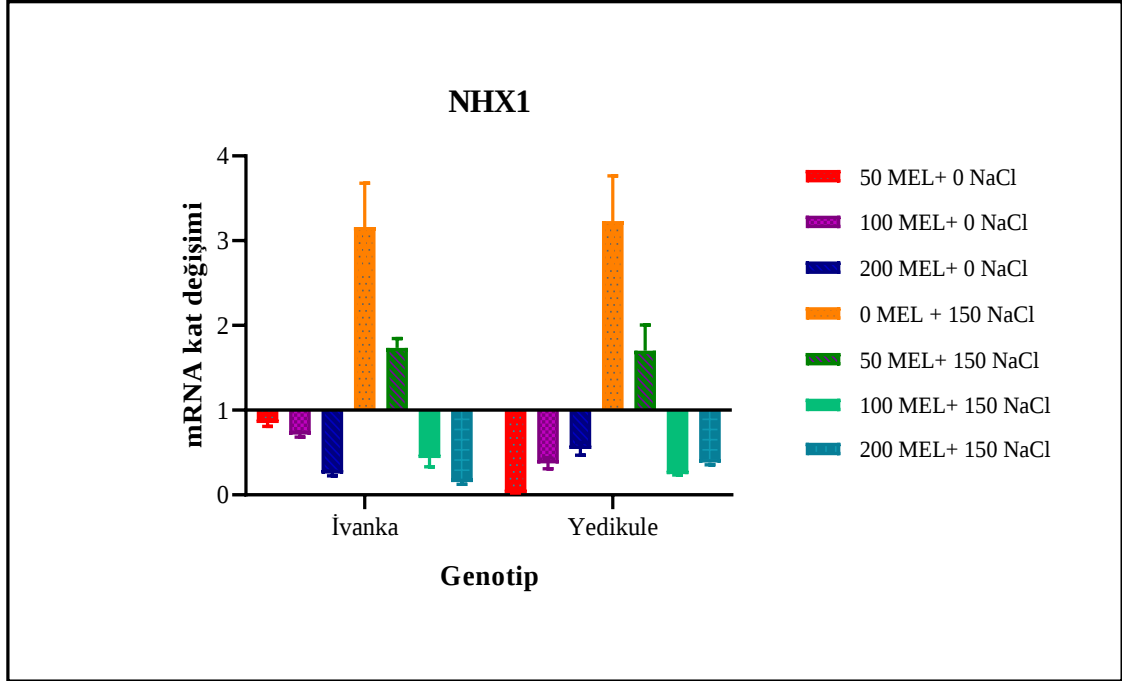
Şekil 4.5. Tuzluluk stresi ve MEL uygulaması altındaki genotiplerin yapraklarındaki *SOS2* geninin ifade değışimleri ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)

Çalışmamızda, tek başına MEL uygulamasının iki genotipte de *AKT1* geninin downregölasyonuna neden olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.6). Bununla birlikte hem tek başına NaCl uygulamasında hem de NaCl stresi altında 50 μ M MEL uygulamalarında iki genotipte de *AKT1* gen ifadesi upregölü olduğu belirlenmiştir. *AKT1* geninin en yüksek upregölasyon oranı (3.24) 0 Mel + 150 NaCl uygulaması ile en düşük downregölasyon oranı ise (0,01) ile 200 Mel + 150 NaCl uygulaması ile Yedikule genotipinde belirlenmiştir (Şekil 4.6).



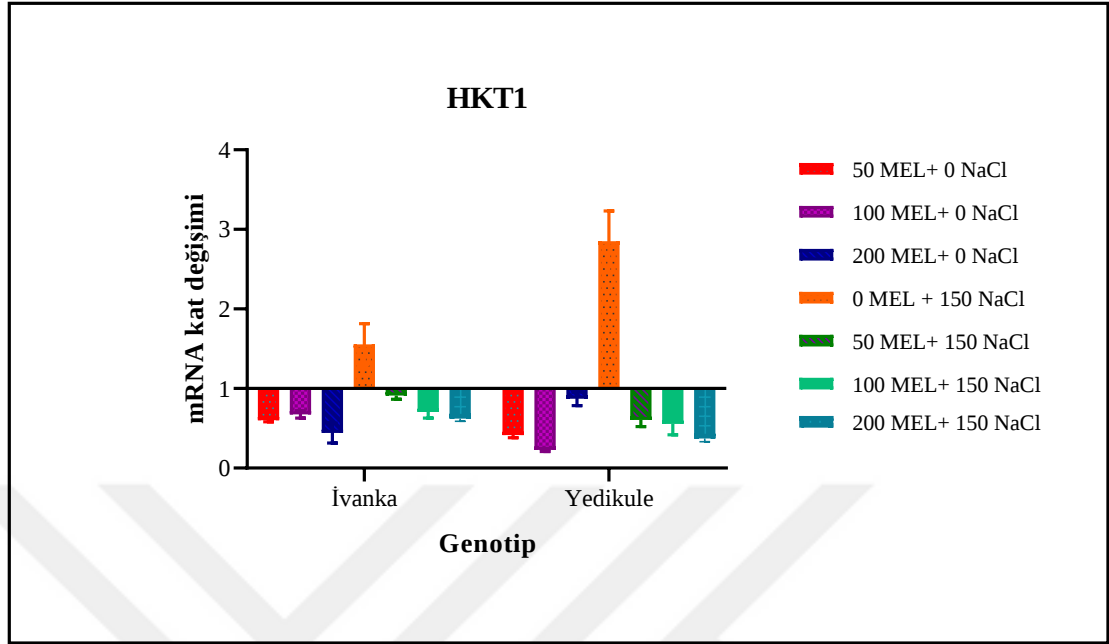
Şekil 4.6. Tuzluluk stresi ve MEL uygulaması altındaki genotiplerin yapraklarındaki *AKT1* geninin ifade değişimleri ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)

Çalışmamızda ifade oranını değerlendirdiğimiz bir diğer gen olan *NHX1* geninin, hem tek başına NaCl uygulamasında hem de NaCl stresi altında 50 MEL uygulamalarında her iki genotipte de upregüle olduğu belirlenmiştir. *NHX1* geninin en yüksek upregülasyon oranı (3,83) 0 Mel + 150 NaCl uygulaması ile en düşük downregülasyon oranı ise (0,013) ile 50 Mel + 150 NaCl uygulaması ile Yedikule genotipinde belirlenmiştir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. Tuzluluk stresi ve MEL uygulaması altındaki genotiplerin yapraklardaki *NHX1* geninin ifade değişimleri ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)

HKT1 geninin yaprak dokularında iki genotipte tek başına MEL uygulamalarında ve NaCl stresi altında MEL uygulamalarında downregüle olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.8). Diğer taraftan NaCl stresi altında her iki genotipte *HKT1* geninin upregüle olduğu gözlenmiştir. *HKT1* geninin en yüksek upregülasyon oranı (3,23) 0 MEL + 150 NaCl uygulaması ile Yedikule genotipinde belirlenirken en düşük downregülasyon oranı (0,20) ile 100 MEL + 150 NaCl uygulaması ile Yedikule genotipinde olmuştur (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. Tuzluluk stresi ve MEL uygulaması altındaki genotiplerin yapraklardaki *HKT1* geninin ifade değişimleri ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)

4.5. MSAP Analizleri ve % Polimorfizm

MEL ve NaCl konsantrasyonları, İvanka ve Yedikule marul çeşitlerine uygulanarak bitki genomları üzerine epigenetiksel değişiklikleri test etmek amacıyla 5 adet primer MSAP analizinde kullanılmıştır. MSAP ile yapılan bu teknikte bantlar dört sınıfa ayrılır: her iki enzim kombinasyonu için bantların varlığını belirten, metillenmemiş bölgeler olan tip I; sadece yarı-metillenmiş bir bant olan EcoRI / HpaII için bantların mevcudiyeti ile gösterilen tip II, EcoRI / MspI için bantların mevcudiyeti ile gösterilen tip III, ve her iki enzim kombinasyonu için bir bandın yokluğu ile gösterilen tip IV (Wang *et al.* 2011).

Bu çalışmada, yukarıda açıklanan sınıflandırmaya göre, III ve IV bant tipleri tam metilasyonu temsil etmektedir (Çizelge 4.4). İvanka genotipinde metillenmiş bantların toplam yüzdesi (tip II + III + IV) ile ölçüldüğünde, genel DNA metilasyon seviyesi kontrolde %62 iken NaCl stresine maruz bırakılmış bitkilerde %53,7'dir. Kontrolle karşılaştırıldığında tek başına MEL uygulamalarında DNA metilasyon oranının konsantrasyon artışına bağlı olarak azaldığı gözlenmiştir. NaCl stresi altında MEL uygulamalarında ise 50, 100 ve 200 μ M MEL uygulamalarında DNA metilasyon

seviyesinde sırasıyla %3,7, %2,7, ve %0,9 oranında azalma meydana geldiği görülmüştür. Kontrolde %18,5 hemi-metillenmiş DNA bandı (tip II) varken ve NaCl stresi uygulanmış bitkilerde toplam bantların %19,4'ünü oluşturan tip II bandın varlığı gözlenmiştir. Bu bulgu, hemi-metillenmiş bölgelerin %0,9 oranında arttığını göstermiştir. Kontrol ve NaCl stresi uygulanan gruplarda sırasıyla (%43,5) ve (%34,3) tam metillenmiş DNA bandı (tip III + IV) gözlemlendi; bu, sırasıyla tam metillenmiş DNA seviyesinin %9,2 oranında azaldığını göstermiştir (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4. İvanka genotipinde MEL ve NaCl stresi altında DNA metilasyon seviyeleri

Primerler	Sınıflar	0 µM Mel		50 µM Mel		100 µM Mel		200 µM Mel	
		0 mM NaCl	150 mM NaCl	0 mM NaCl	150 mM NaCl	0 mM NaCl	150 mM NaCl	0 mM NaCl	150 mM NaCl
A	Class I	9	7	8	8	7	7	4	6
	Class II	2	5	2	2	4	4	2	4
	Class III	2	3	2	2	4	3	7	2
	Class IV	5	3	6	6	3	4	5	6
B	Class I	9	9	8	9	9	8	9	10
	Class II	5	5	7	6	5	7	8	6
	Class III	5	5	5	4	5	5	3	4
	Class IV	6	6	5	6	6	5	5	5
C	Class I	8	15	12	12	12	10	14	12
	Class II	4	3	4	4	4	3	4	4
	Class III	5	4	4	3	2	3	2	4
	Class IV	6	1	3	4	5	7	3	3
D	Class I	9	12	10	11	9	12	10	6
	Class II	4	6	4	5	8	5	6	6
	Class III	7	2	4	4	4	3	3	7
	Class IV	5	5	7	5	4	5	6	6
E	Class I	6	7	4	5	6	7	7	8
	Class II	5	2	4	3	4	4	3	3
	Class III	2	4	5	5	2	3	4	2
	Class IV	4	4	4	4	5	3	3	4
Toplam bant sayısı		108	108	108	108	108	108	108	108
<i>Hemi metilasyon oranı (%)</i>		18,5	19,4	19,4	18,5	23,1	21,3	21,3	21,3
<i>Tam metilasyon oranı (%)</i>		43,5	34,3	41,7	39,8	37,0	38,0	38,0	39,8
<i>Toplam metilasyon oranı (%)</i>		62,0	53,7	61,1	58,3	60,2	59,3	59,3	61,1

1 veya 0 puan, sırasıyla grupların varlığını veya yokluğunu gösterir.

Toplam metillenmiş bant oranı = $[(II + III + IV) / (I + II + III + IV)] \times 100$

Tamamen metillenmiş bant oranı = $[(III + IV) / (I + II + III + IV)] \times 100$

Hemi-metillenmiş bant oranı = $[(II) / (I + II + III + IV)] \times 100$

Tip I, metillenmemiş bantlardır; Tip II, hemi-metillenmiş bantlardır ve III + IV tipleri tamamen metillenmiş bantlardır.

Yedikule genotipinde metillenmiş bantların toplam yüzdesi ile ölçüldüğünde, genel DNA metilasyon seviyesi kontrolde %54,2 iken NaCl stresine maruz bırakılmış bitkilerde %48,6'dır. Kontrolle karşılaştırıldığında tek başına MEL uygulamalarında konsantrasyon artışına bağlı olarak DNA metilasyon oranının azaldığı gözlenmiştir. NaCl stresi altında MEL uygulamalarında ise 50,100 ve 200 µM MEL uygulamalarında DNA metilasyon seviyesinde sırasıyla %3,7, %2,8 ve %0,9 oranlarında azalma meydana geldiği görülmüştür. Kontrolde %14 hemi-metillenmiş DNA bandı varken ve bu oran NaCl stresi uygulanmış bitkilerde toplam bantların %16,8'ini oluşturmuştur. Bu bulgu, hemi-metillenmiş bölgelerin %2,8 oranında arttığını göstermiştir. Kontrol ve NaCl stresi uygulanan gruplarda sırasıyla (%40,2) ve (%31,8) tam metillenmiş DNA bandı gözlendi; bu, sırasıyla tam metillenmiş DNA seviyesinin %8,4 oranında azaldığını göstermiştir (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5. Yedikule genotipinde MEL ve NaCl stresi altında DNA metilasyon seviyeleri

Primerler	Sınıflar	0 µM Mel		50 µM Mel		100 µM Mel		200 µM Mel	
		0 mM NaCl	150 mM NaCl	0 mM NaCl	150 mM NaCl	0 mM NaCl	150 mM NaCl	0 mM NaCl	150 mM NaCl
A	Class I	5	7	4	6	5	5	6	2
	Class II	2	3	2	3	5	5	2	2
	Class III	6	5	5	4	4	4	4	7
	Class IV	4	2	6	4	3	3	5	6
B	Class I	13	14	18	17	17	17	18	19
	Class II	2	5	4	4	4	6	4	5
	Class III	4	4	3	4	4	3	4	4
	Class IV	11	7	5	5	5	4	4	2
C	Class I	12	11	10	9	11	13	9	10
	Class II	3	4	3	6	2	2	6	4
	Class III	2	2	2	2	4	2	2	3
	Class IV	2	2	4	2	2	2	2	2
D	Class I	10	10	9	10	9	10	9	10
	Class II	5	4	5	5	5	4	5	4
	Class III	2	3	4	3	2	4	4	4
	Class IV	4	4	3	3	5	3	3	3
E	Class I	9	13	9	11	9	7	10	9
	Class II	3	2	4	2	4	4	5	3
	Class III	5	2	4	3	4	5	3	4
	Class IV	3	3	3	4	3	4	2	4
	Toplam bant sayısı	107	107	107	107	107	107	107	107
<i>Hemi metilasyon oranı (%)</i>		14,0	16,8	16,8	18,7	18,7	19,6	20,6	16,8
<i>Tam metilasyon oranı (%)</i>		40,2	31,8	36,4	31,8	33,6	31,8	30,8	36,4
<i>Toplam metilasyon oranı (%)</i>		54,2	48,6	53,3	50,5	52,3	51,4	51,4	53,3

1 veya 0 puan, sırasıyla grupların varlığını veya yokluğunu gösterir.

Toplam metillenmiş bant oranı = $[(II + III + IV) / (I + II + III + IV)] \times 100$

Tamamen metillenmiş bant oranı = $[(III + IV) / (I + II + III + IV)] \times 100$

Hemi-metillenmiş bant oranı = $[(II) / (I + II + III + IV)] \times 100$

Tip I, metillenmemiş bantlardır; Tip II, hemi-metillenmiş bantlardır ve III + IV tipleri tamamen metillenmiş bantlardır.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Toprak tuzluluğu, insan nüfusunun artması ile artan tarım üretim talebini tehlikeye atan ve tarımsal ürünlerin üretimini sınırlandıran abiyotik bir stres faktörüdür. Tuz stresi hücre bölünmesinin azalması, membran hasarı, metabolik süreçlerin modifikasyonu, oksidatif stres, fizyolojik kuraklık, besinsel bozukluklar, iyon toksisitesi gibi pekçok yolla bitkileri etkilemektedir. Tuzluluk stresinin osmotik etkileri tuz uygulamasından sonra hemen gözlemlenmektedir (Izadi Darbandi and Bahmani 2011; Roy and Sengupta 2014; Bahmani *et al.* 2015).

Stres etmenlerinden en önemlisi olan topraktaki tuz yoğunluğunun bitkilerde büyüme ve gelişmeyi, ürünün niteliğini ve niceliğini olumsuz yönde etkilediği bilinmektedir. Bu durum çeşitli ülkelerde özellikle de yarı kurak ve kurak bölgelerde yetiştirilen kültür bitkilerinde görülmektedir (Kalaji and Pietkiewicz 1993). “Tuz stresi” farklı tuzların toprak veya suda bitkinin gelişmesini engelleyebilecek konsantrasyonlarda olması olarak tanımlanır ve çok geniş alanların tarım yapılamaz hale gelmesine neden olabilir. Bu tuzlar genel olarak sülfatlar, klorürler, boratlar, karbonatlar ve bikarbonatlardır. Ancak doğada en sık rastlanılanı sodyum klorürdür (Deveci ve Tuğcu 2017).

Abiyotik stres faktörlerinin ilk belirtisi, hücre membranlarının hasar görmesiyle ortaya çıkmaktadır (Holmberg and Bülow 1998). Bulgularımızda, her iki genotipte de tuz stresine bağlı olarak hücre membran hasarının meydana geldiği ve kontrole kıyasla oldukça yüksek değerlere (İvanka’da 66,84; Yedikule’de 72,64) ulaştığı gözlemlenmiştir. Tuzluluğun membranlarda oluşturduğu bu hasarın, apoplastta biriken yüksek konsantrasyonda ki Na^+ iyonlarının hücre membranının yapısında bulunan pektin gibi yapısal elementlerin iyonik bağlarını bozarak veya apoplastik enzimleri olumsuz yönde etkileyerek membranın temel fonksiyonlarını bozması ile ilgili olduğu düşünülmektedir (Çulha ve Çakırlar 2011). Bulgularımıza benzer olarak tuzluluğun membran yapısında neden olduğu değişimlerle ilgili bir çalışmada domuz ayrığında 200 mM NaCl uygulamasının plazma membranında birtakım kıvrılmalara ve bozulmalara sebep olduğu Gupta (2007) tarafından ortaya konmuştur.

Tuz stresinden etkilenen ilk kısım olan plazma membranının geçirgenliği, farklı genotiplere ait hücrelerde değişiklik göstermektedir. Tuzlu ortam şartlarında, tuza duyarlı genotiplerde hücre membran hasarının daha çok olduğu tespit edilmiştir (Mansour and Salama 2004).

Köklerde tuz miktarının artmasıyla birlikte ilk olarak osmotik stres oluşmaktadır. Oluşan bu stres, kullanılabilir su miktarının azalmasına sebep olur ve bu olay “fizyolojik kuraklık” olarak adlandırılır (Tuteja 2007). Nispi su içeriğinin azalması, hücre genişlemesinin azalmasına, sürgün gelişiminin yavaşlamasına ve stomaların kapanmasına neden olur (Hu and Schmidhalter 2005). Tuz stresinin nispi su içeriğinde meydana getirdiği muhtemel etkilerini belirlediğimiz çalışmamızda, kontrole kıyasla tuz uygulaması yapılan örneklerde nispi su içeriğinin oldukça düştüğü ve İvanka’da nispi su içeriğinin (52,48) Yedikule’ye (57,56) kıyasla daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Bu durumun, tuz stresinin neden olduğu osmotik stresin etkisiyle kullanılabilir su miktarının azalmasıyla bağlantılı olduğu düşünülmektedir. NaCl stresine maruz bırakılan ayçiçeğinde nispi su içeriğinin %14 azaldığı bildirilmiştir (Naz *et al.* 2015). Şeker pancarında yapılan bir çalışmada, NaCl’nin 4 farklı konsantrasyonun (0, 4,7, 9,4 ve 14,1 dSm⁻¹) doz artışına bağlı olarak hücre membran hasarında artışa ve nispi su içeriğinde azalmaya neden olduğu bildirilmiştir (Jamil *et al.* 2012). Çalışmamızın sonuçları bu araştırmalarla paralellik göstermektedir.

Ayrıca tuz stresi bitkilerde fotosentez etkinliğinde azalmaya neden olmakta ve bitki yapraklarında toplam klorofil içeriği tuz stresi altında genellikle azalmaktadır (Fedina *et al.* 2003; Sayed 2003; Khan 2003). Nitekim çalışmamızda tuz stresi altında her iki genotipte de klorofil değerindeki düşüş bunu desteklemektedir. Çeltikte yapılan bir çalışmada, tuzun (200 mM NaCl) yapraklardaki klorofil b içeriğini %41, klorofil a içeriğini ise %33 oranında azalttığı belirlenmiştir (Amirjani 2011). Çeltikte yapılan başka bir çalışmada ise 100 mM NaCl uygulaması yapılan bitkilerde kontrole kıyaslandığında klorofil a, b ve karotenoid içeriklerinde sırasıyla %30, %45 ve %36 azalma gözlenmiştir (Chutipaijit *et al.* 2011). Diğer taraftan tuz stresi altında büyütülen mısır fidelerinde toplam klorofil, klorofil-a ve klorofil-b içeriği önemli ölçüde azalmıştır (Ganieva *et al.*

1997). Bacha *et al.* (2017) 3 farklı NaCl konsantrasyonunda iki hafta boyunca domates fidelerini büyütmüş ve klorofil içeriğinin azaldığını bildirmişlerdir. Noreen *et al.* (2012) ayçiçeğinde NaCl stresi, büyümeyi, klorofil pigmentlerini, nispi su içeriğini ve bazı minerallerin içeriğini olumsuz yönde etkilerken yaprak ve kök Na^+ içeriğini olumlu yönde etkilediğini bildirmişlerdir.

Tuzluluk toleransındaki en önemli mekanizma iyonları hücre dışına aktarma ve Na^+ 'un seçimli alınımı ile sitozollere Na^+ iyonlarının girişinin sınırlandırılması şeklinde olduğu bildirilmiştir. Bu mekanizma SOS yoluyla gerçekleşmektedir. SOS yolu kök-toprak arasında Na^+ ve K^+ dengesinin ve köklerden gövdeye uzun mesafeli Na^+ iletiminin düzenlenmesini kapsamaktadır. SOS yolu proteinden 3 anahtar bileşikten oluşur; Ca^{+2} sensörü olarak aktive gösteren SOS3, bir serin/treonin protein kinazı olan SOS2 ve bir plazma membran Na^+/H^+ antiporteri olan SOS1 geni şeklinde tanımlanmaktadır (Silva and Geros 2009). Yapılan bir çalışmada Tuz stresi uygulanan yabancı tiplerin yanı sıra osmotik SOS1 mutantlarında da iyonik denge bozulmuş ve tuz stresine karşı aşırı duyarlılık sergilemişlerdir. Böylece SOS genlerinin tuz toleransında fonksiyon gösterdiği genetik olarak doğrulanmıştır (Zhu *et al.* 1998).

SOS yolunun en önemli proteini SOS1'dir. Bu nedenle tuzluluk toleransı ile ilgili yapılan çalışmalarda SOS1 özellikle incelenmiştir (Davenport *et al.* 2005; Olias *et al.* 2009; Oh *et al.* 2009). SOS1 bitkilerin sitoplazmaya giren Na^+ iyonlarına karşı korunmasında çok önemli bir bileşen olarak bilinmektedir. Genellikle, SOS1 geninin ekspresyonu, tuz stresi altındaki bitkilerde up-regüle şeklinde düzenlenir (Shi *et al.* 2009). Çalışmamızda NaCl stresinde Yedikule ve İvanka genotipinde SOS1 geninin upregüle olduğu belirlenmiştir. *Arabidopsis*'te strese bağlı olarak SOS1 mRNA stabilitesinde ROT'ların aracılık ettiği ve SOS1'in oksidatif strese toleransta pozitif rol oynadığı bildirilmiştir (Kim *et al.* 2009). Ekmeklik buğdayda tuzluluk stresinde yaprak ve kök dokularının her ikisinde de SOS1 geninin ifadesinin toleranslı genotiplerde upregüle, duyarlı genotiplerde ise downregüle olduğu belirlenmiştir (Nardemir 2017). Bununla birlikte pek çok çalışmada da SOS1 geninin kök dokularında ifadesinin fazla olduğu rapor edilmiştir (Sathee *et al.* 2015). Yang *et al.* (2009) transgenik *Arabidopsis*'te SOS1 geninin gövdeye kıyasla özellikle

köklerde aşırı ifade edildiği ve tuz toleransını güçlendirdiğini belirlemişlerdir. Wang *et al.* (2018) 4 farklı pamuk çeşidinde tuz stresi altında *SOS1* geninin aşırı ifade edildiği bildirmişlerdir.

Çalışmamızda NaCl stresinde Yedikule ve İvanka genotipinde *SOS2* geninin upregüle olduğu belirlenmiştir. *Arabidopsis*'te köklerde *SOS2*'nin mRNA seviyesi, tuz stresine cevapta genin upregüle olduğunu göstermiştir (Liu *et al.* 2000). Barajas Lopez *et al.* (2018) *Arabidopsis*'te *SOS2* geninin aşırı ifadesi sonucu GRIK1 genini aktive ederek tuz toleransında etkili olduğunu bildirmişlerdir. Assem *et al.* (2017) sorgumda tuz stresi altında *SOS2* geninin aşırı ifadesinin farklı ökaryotik hücrelerde tuz toleransını geliştirmeye aracılık edebileceğini ortaya koymuştur.

K^+ , membran potansiyeli ve turgorun korunması, enzim aktivasyonu ve ozmotik basıncın düzenlenmesi için gerekli bir makro besindir. K^+ için yüksek afiniteye sahip, fakat aynı zamanda Na^+ için düşük afiniteye sahip olan iyon taşıma sistemleri arasında *AKT1* geni, K^+ 'nın hücre içine alınmasını sağlar (Li *et al.* 2012). Çalışmamızda *AKT1* geninin yaprak dokusunda NaCl uygulamalarında upregüle olduğu belirlenmiştir. Wang *et al.* (2018) 4 farklı pamuk çeşidinde tuz stresi altında *AKT1* geninin aşırı ifade edildiği bildirmişlerdir. Li *et al.* (2012), *Malus hupehensis*'de NaCl stresi altında *NHX1* ve *AKT1* genlerinin aşırı ifade olduğunu bildirmişlerdir.

Toprak çözeltisinde bulunan NaCl'ye doğrudan maruz kalan kökten Na^+ 'nın girişi pasif olarak gerçekleşir. Bu pasif giriş, kolaylaştırılmış difüzyon veya iyon kanalı şeklindeki taşıyıcılarla HKT (yüksek afiniteli K^+ kanalları), LCT (düşük afiniteli katyon kanalları) ve NSCC (seçici olmayan katyon kanalları) ile sağlanır. Kökte, Na^+ 'nın ksilemden köke geri yüklenmesi Na^+ 'ya karşı seçici olmayan uniportlar (HKT ve Nax) aracılığıyla gerçekleştirilir (Apse and Blumwald 2007). Berthomieu *et al.* (2003)'nin *Arabidopsis* ile yaptıkları çalışmada, Na^+ 'nın sürgünden floeme aktarılacak köke geri gönderilmesine, *HKT1* geninin ürünü olan Na^+ taşıyıcılarının aracılık ettiği belirtilmiştir. Çalışmamızda *HKT1* geninin NaCl stresinde Yedikule ve İvanka genotipinde upregüle olduğu belirlenmiştir. Wang *et al.* (2018) 4 farklı pamuk çeşidinde tuz stresi altında *HKT1* geninin

aşırı ifade edildiği rapor edilmiştir. Zhang *et al.* (2018) mısır'ın tuz toleransını geliştirmede *HKT1*'in önemli bir gen olduğunu bildirmişlerdir. Ali *et al.* (2019) transgenik tütün bitkisini tuz stresi altında yetiştirmiş ve *HKT1* geninin aşırı ifade edildiğini rapor etmişlerdir. *HKT1* geninin aşırı ekspresyonunun; klorofil, kök, SOD, CAT, POD'un aktivitesini arttırdığını, MDA ve prolin içeriğini azalttığını bildirmişlerdir. Ek olarak Na^+ toksisitesini azaltırken K^+ dengesinin korunmasına yardımcı olduğunu ayrıca tuz stresi altında tütün verimliliğini maksimuma çıkarmak için olası bir mekanizma olduğunu bildirmişlerdir.

Bitkide köke giriş yapan Na^+ 'nın bir kısmı sürgüne doğru taşınırken, bir kısmı geçilen hücrelerin vakuollerinde vakuol tipi Na^+/H^+ taşıyıcıları (NHX) aracılığı ile depolanarak sürgüne taşınan Na^+ miktarını azaltır. Yaprakta biriken fazla Na^+ , *SOS1* geni ile ksileme geri alınır veya floem döngüsüne katılarak köke geri gönderilebileceği gibi NHX aracılığıyla vakuolde biriktirilerek de azaltılır (Botella vd 2005). Çalışmamızda *NHX1* geninin yaprak dokusunda NaCl uygulamalarında upregüle olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte, bu gen ailesinin bitkilere uygulanan abiyotik streslere cevabın genellikle yapraklarda gerçekleştiği ve upregülasyon oluşturduğu bilinmektedir (Wang *et al.* 2018). Dolayısıyla çalışmamız daha önce yapılan çalışmalar ile desteklenmektedir. Wang *et al.* (2018) 4 farklı pamuk çeşitinde tuz stresi altında *NHX1* geninin aşırı ifade edildiği bildirilmiştir. Abdelaziz *et al.* (2019) 200 mM NaCl'ye maruz bırakılan domatestte yaprak ve kök dokularında transgenik *NHX1* geninin aşırı ifade edildiğini bildirmişlerdir. Krishnamurthy *et al.* (2019) *NHX1* geninin aşırı ifadesinin çeltik ve *Arabidopsis*'te tuz toleransını arttırdığı belirtmişlerdir.

DNA metilasyonu/demetilasyonu gibi epigenetik mekanizmaların gen ifade seviyelerinde önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir (Iqbal *et al.* 2011). Yüksek oranda DNA metillendiğinde gen aktivitesinin azaldığı, metilasyondaki bir azalmanın gen aktivitesini arttırdığını bildirilmiştir. Metilasyon seviyesi, bitkinin strese cevap verme yeteneğine büyük ölçüde katkıda bulunmaktadır. Ayrıca değişken olan metilasyon durumunun bitkiyi strese sokarak veya şok geçirmesine sebep olarak hücre fizyolojisini etkilemesinin genetik varyasyona sebep olduğu ifade edilmiştir (Korkmaz ve Çölgeçen 2013; Joel

2013). DNA metilasyon mekanizması, bitkilerin toprak verimliliği değişikliklerini ve abiyotik stresleri içeren çeşitli ipuçlarına tepki vermesinin başka bir yoludur ve mekanizma bazı fizyolojik, biyokimyasal veya adaptasyon süreçlerini anlamak için kullanılmaktadır (Zenda *et al.* 2018). Bu çalışmada, toplam genomik metilasyon seviyesinin nispeten yüksek olduğu (kontrol ve NaCl stresi altında bitkilerde sırasıyla İvanka genotipinde %62, %53,7 ve Yedikule genotipinde %54,2, %48,6) görülmüştür (Çizelge 4.4 ve Çizelge 4.5). NaCl stresi altında genotiplerde DNA metilasyon seviyesinin %8,3 ve %5,6 olarak azaldığı, tam metillenmiş DNA seviyelerinde ise sırasıyla İvanka ve Yedikule genotiplerinde %9,2, %8,4 oranında bir azalma meydana geldiği gözlenmiştir. Metile sitozinlerin, bitkilerde genellikle %20'den fazla olduğu ve metilasyon durumunun çeşitli bitki ve dokular arasında farklılık gösterdiği bildirilmiştir (Gruenbaum *et al.* 1981; Yaish 2013). *Arabidopsis*'te metilasyon seviyesi yaklaşık %20'dir (Zhang *et al.* 2006). Karan *et al.* (2012), tuzluluğa hassas IR29 ve Geumgangbyeon çeltik genotiplerinde metilasyon seviyesinin NaCl stresi altında sırasıyla %7,6 ve %14,1 oranında azaldığını gözlemlemişlerdir. Wang *et al.* (2011), kuraklık stresi uygulanmış çeltikte normal şartlarda %24,55 olan metilasyon seviyesinin kuraklık stresi altında %13,52'ye düştüğünü belirtmişlerdir. Tüm MSAP çalışmaları, NaCl stresinin her genotipte spesifik şekilde gen ekspresyonunun düzenlenmesinde önemli bir rolü olabileceğini öne sürmektedir (Zhang *et al.* 2006; Wang *et al.* 2010; Wang *et al.* 2011)

Stres toleransını artırmak ve yaprak ömrünü uzatmak, tuz stresine karşı enzimlerin aktivitesini artırmak, fotosentez etkinliğini geliştirmek ve stresi tolere etmek için gen ifadesini düzenlemek gibi alternatif bir strateji önemli tarımsal uygulamalara yol açabilir (Ke *et al.* 2018). Bu stratejilerden birisi olan ve tuz toleransını arttırmakta kullanılan MEL, son yıllarda dikkat çekmiştir (Fan *et al.* 2018).

MEL, bitkilerde biyotik-abiyotik strese karşı bitki biyostimülatörü olarak hareket etme becerisinin yanında, bitki büyümesinde (köklenme, yaprak yaşlanma, fotosentetik verim ve biyokütle verimi) ve bitki vejetatif gelişim süreçlerinde (çiçeklenme süreçlerinde potansiyel bir düzenleyici, meyve ve tohumların oluşumu ve olgunlaşması) de rol oynamaktadır (Arnao *et al.* 2018; Fan *et al.* 2018). Çalışmamızda tek başına MEL

uygulamalarının İvanka ve Yedikule genotiplerinde hücre membran hasarında dikkate değer bir azalış meydana getirirken NaCl stresi altında ise yine konsantrasyon artışına bağlı olarak hücre membran hasarını engellediği belirlenmiştir (Şekil 4.1). Stres altında MEL'in hücre membran hasarını tamamen engellediği bildirilmiştir (Zhang *et al.* 2014). Çalışmamızda her iki genotipte de MEL'in kontrolle karşılaştırıldığında nispi su içeriğinde artışa neden olduğu belirlenmiştir. Ayrıca MEL uygulamalarının yine doza bağlı olarak stresin neden olduğu düşüşü engellediği ve özellikle 200 μ M MEL uygulamasının tuzun oluşturduğu etkiyi hafiflettiği tespit edilmiştir (Şekil 4.2). Hücre membran hasarı düşük olan genotiplerin nispi su içeriğinin yüksek olduğu bilinmektedir (Jamil *et al.* 2012). Yüksek MEL konsantrasyonları hücrelerdeki ROT'u ciddi şekilde azaltabilir, böylece ROT bağımlı sinyal iletimini etkiler ve hücrede meydana gelebilecek hasarları inhibe eder (Afreen *et al.* 2006).

Çalışmamızda her iki genotipte de NaCl stresi altında MEL uygulamalarında ise SPAD değerlerinde kademeli bir artışın görüldüğü ve tuzun etkisinin azaltıldığı belirlenmiştir (Şekil 4.3). MEL'in arpa yapraklarında klorofil miktarındaki azalmalara karşı koruyucu bir etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Arnao and Hernández-Ruiz, 2009). MEL'in oksidatif strese karşı bitkide klorofil miktarını koruduğu ve bitkilerdeki fotosentez oranını hızlandırdığı bildirilmiştir (Yakupoglu vd. 2017).

MEL uygulamaları sonrasında çeşitli abiyotik streslere maruz kalan bitkilerde ROT miktarında azalma ve aminoasit, organik asit ve şeker içeriklerinde ise artışlar olduğu görülmüştür (Shi *et al.* 2015). Wei *et al.* (2015), soya fasulyesi tohumlarına MEL uygulamalarının fidelerin tuz stresine karşı toleranslarını artırdığını bildirmişlerdir. Mevcut araştırmalar, MEL'in ayçiçeğinde tuz stresi sırasında kök gelişimini düzenlediğini göstermektedir (Yakupoglu vd 2018; Fan *et al.* 2018). Mukherjee *et al.* (2014), ekzojen MEL uygulamasının tek başına ve 120 mM NaCl stresi altında ayçiçeği fidelerinin büyümesi üzerindeki rolünü kanıtlanmıştır. Wang *et al.* (2013, 2014), elma yapraklarına MEL uygulaması sonucunda başta klorofil parçalanmasına neden olan enzimlerin üretilmesini kontrol eden genler olmak üzere yaşlanma ile ilgili birçok spesifik genin ifade seviyesinin azaldığını bildirmişlerdir. Tüm bu araştırmalar, MEL'in

antioksidan olarak özellikle savunma sistemini uyardığı ve bunu da stres altında görev yapan ya da aktif hale gelen bazı genlerin ifade seviyelerini değiştirerek gerçekleştirdiğini ortaya koymuştur. Bir biyostimülatör olarak MEL, stres yanıtında rol alan redoks ağı genlerinin ekspresyonunu değiştirir ve fotosentez ile ilgili parametreleri optimize ederek yaşlanma genlerini baskılar (Arnao and Hernández-Ruiz 2014). MEL'in bitkilerde çeşitli genlerin ekspresyonunun belirlenmesi üzerine literatürde çok fazla çalışmaya rastlanmamakla birlikte, yaptığımız çalışmada tek başına uygulanan MEL'in her iki genotipte, *SOS1*, *SOS2*, *AKT1*, *NHX1* ve *HKT1* genlerinin downregülasyonuna yol açtığı belirlenmiştir. Her iki genotipte de NaCl stresi altında uygulanan MEL'in bu genlerin ifade seviyesinde tuzun sebep olduğu artışta konsantrasyona bağlı olarak değişimlere neden olduğu belirlenmiştir. Li *et al.* (2012), *Malus hupehensis*'de NaCl stresi altında *NHX1* ve *AKT1* genlerinin aşırı ifade olduğunu ve MEL uygulaması ile gen ekspresyonunun değiştiğini kaydetmişlerdir. MEL'in yapraklarda iyon homeostazının korunmasına yardımcı olduğu, böylece yüksek stres koşullarından kaynaklanan hasarı büyük ölçüde onardığı bildirmişlerdir. Stres altında hücre ölümüne neden olan genlerin çoğunlukla MEL tedavisi ile down-regüle olduğu bildirilmiştir (Weeda *et al.* 2014). MEL'in stres altında hücre ölümünü engellemesinin başlıca nedeninin antioksidan özelliğe sahip olması olduğu düşünülmektedir (Zhang *et al.* 2014)

Oldukça fazla tür ve çeşit zenginliğine sahip olan marul, dünyada olduğu kadar ülkemizde de geniş alanlarda yetiştirilmekte ve büyük ekonomik öneme sahip türler arasında yer almaktadır. Marul, tür ve çeşitlerinde abiyotik stres koşullarına tolerans ile ilgili çalışmalar yapılmış olsa da bu çalışmalar genellikle tarla, sera ya da saksı denemeleri şeklinde yürütülmüştür. Marul türlerinde tuzluluğa toleranslılık ve hassasiyet konusunda birçok morfolojik değerlendirme ve fizyolojik düzeyde çalışmalar yapılmıştır. Ancak, moleküler düzeyde DNA esaslı genetik ve epigenetik değişimlerin tespiti konusunda çok az çalışmaya rastlanılmıştır.

Gerçekleştirilen bu çalışma ile NaCl uygulamaları ve antagonist olarak düşünülen MEL uygulamaları sonucunda marul fidelerinin genomunda DNA metilasyonu yönünden herhangi bir değişiklik meydana gelip gelmeyeceği moleküler düzeyde tespit edilmeye

çalışılmıştır. İvanka ve Yedikule marul çeşitlerinde farklı NaCl ve MEL konsantrasyonları uygulanmıştır. Her konsantrasyon için ortalamalar alınmıştır. Çalışmada kullanılan EcoRI/MspI enzimi metilasyonun olduğu yerden kesim yapması ve EcoRI/HpaII enziminin ise metilasyonun gerçekleşmediği zaman kesim yapması bilgisine dayanarak alınan sonuçlar değerlendirilmiştir. Tek başına NaCl uygulamasında İvanka genotipinde %34,3 oranında metilasyon oluşurken; tek başına MEL uygulamasında en düşük dozda %41,7 en yüksek dozda ise %38 metilasyon gözlenmiştir (Çizelge 4.4). Tek başına NaCl uygulamasında Yedikule genotipinde %31,8 oranında metilasyon oluşurken, tek başına MEL uygulamasında en düşük dozda %36,4 en yüksek dozda ise %30,8 metilasyon gözlenmiştir (Çizelge 4.5). Diğer taraftan, MEL uygulamasının özellikle yüksek tuz konsantrasyonlarında tuzun olumsuz etkisini azalttığı belirlenmiştir.

5.1. Sonuç ve Öneriler

Bu araştırmadan elde edilen sonuçlar ve daha sonra yapılacak çalışmalara yönelik öneriler şu şekilde sıralanabilir.

1. NaCl stresinin klorofil miktarı ve nispi su içeriğini azalttığı, hücre membran hasarını ve *SOS1*, *SOS2*, *AKT1*, *NHX1* ve *HKT1* genlerinin mRNA ifade seviyelerini arttırdığı ve DNA metilasyon seviyesinde azalmalara yol açtığı belirlenmiştir.
2. Araştırmada incelenen tüm özelliklerde NaCl stresine bağlı olarak meydana gelen bu olumsuzluklar melatonin uygulamasıyla iyileşme göstermiştir.
3. Melatonin NaCl stresi altında yetiştirilen bitkilerde NaCl'nin olumsuz etkilerini önlemek amacıyla kullanılması önerilebilir.

KAYNAKLAR

- Abdelaziz, M. E., Abdelsattar, M., Abdeldaym, E. A., Atia, M. A., Mahmoud, A. W. M., Saad, M. M., & Hirt, H. (2019). Piriformospora indica alters Na⁺/K⁺ homeostasis, antioxidant enzymes and LeNHX1 expression of greenhouse tomato grown under salt stress. *Scientia Horticulturae*, 256, 108532.
- Abid, G., Muhoviski, Y., Jacquemin, J. M., Mingeot, D., Sassi, K., Toussaint, A., & Baudoin, J. P. (2011). Changes in DNA-methylation during zygotic embryogenesis in interspecific hybrids of beans (*Phaseolus* spp.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 105(3), 383-393.
- Afreen, F., Zobayed, S. M., & Kozai, T. (2006). Melatonin in *Glycyrrhiza uralensis*: response of plant roots to spectral quality of light and UV- B radiation. *Journal of pineal research*, 41(2), 108-115.
- Ahmad, I., Mian, A., & Maathuis, F. J. (2016). Overexpression of the rice AKT1 potassium channel affects potassium nutrition and rice drought tolerance. *Journal of experimental botany*, 67(9), 2689-2698.
- Ali, A., Maggio, A., Bressan, R. A., & Yun, D. J. (2019). Role and functional differences of HKT1-type transporters in plants under salt stress. *International journal of molecular sciences*, 20(5), 1059.
- Al-Lawati, A., Al-Bahry, S., Victor, R., Al-Lawati, A.H., Yaish, M.W., 2016. Salt stress alters DNA methylation levels in alfalfa (*Medicago* spp). *Genet Mol Res.* Feb 26;15(1):15018299.
- Allegra, M., Reiter, R. J., Tan, D. X., Gentile, C., Tesoriere, L., & Livrea, M. A. (2003). The chemistry of melatonin's interaction with reactive species. *Journal of pineal research*, 34(1), 1-10.
- Amirjani, M. R. (2011). Effect of salinity stress on growth, sugar content, pigments and enzyme activity of rice. *International Journal of Botany*, 7(1), 73-81.
- Anonim, 2018a. DNA Metilasyonu. http://yunus.hacettepe.edu.tr/~mergen/sunu/s_metil.pdf. Erişim Tarihi: 08.11.2018
- Anonim, 2018b. Marul Yetiştiriciliği. <https://arastirma.tarimorman.gov.tr/alata/Belgeler/Diger-belgeler/MarulYeti%C5%9Ftiricili%C4%9FiNDenli.pdf> . Erişim Tarihi: 27.12.2018
- Anonymous, 2018c. Lettuce. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize> . Erişim Tarihi: 26.10.2018.
- Apse, M.P. ve Blumwald, E., 2007. Na⁺ Transport in Plants, *FEBS Letters*, 581, 2247-2254.
- Armas, I., Pogrebnyak, N., Raskin, I., 2017. A rapid and efficient in vitro regeneration system for lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Plant Methods*, 13(58).
- Arnao, M. B., Hernández-Ruiz, J., 2018. Melatonin and Its Relationship to Plant Hormones. *Annals of Botany*, 121, 195–207.
- Assem, S. K., Hussein, E. H., El-Assal, S. S., & Basry, M. A. (2017). Isolation of glyoxalase II (gly II) and salt overly sensitive (SOS2) alleles from Egyptian sorghum and enhancing salt stress tolerance in yeast. *BIOSCIENCE RESEARCH*, 14(3), 498-503.

- Bacha, H., Tekaya, M., Drine, S., Guasmi, F., Touil, L., Enneb, H., ... & Ferchichi, A. (2017). Impact of salt stress on morpho-physiological and biochemical parameters of *Solanum lycopersicum* cv. Microtom leaves. *South African Journal of Botany*, 108, 364-369.
- Bahmani, K., Noori, S.A S., Darbandi, A.I. and Akbari, A., 2015. Molecular mechanisms of plant salinity tolerance: a review. *Australian Journal of Crop Science*, 9(4), 321-336
- Barajas- Lopez, J. D. D., Moreno, J. R., Gamez- Arjona, F. M., Pardo, J. M., Punkkinen, M., Zhu, J. K., ... & Fujii, H. (2018). Upstream kinases of plant Sn RK s are involved in salt stress tolerance. *The Plant Journal*, 93(1), 107-118.
- Barassi, C. A., Ayrault, G., Creus, C. M., Sueldo, R. J., & Sobrero, M. T. (2006). Seed inoculation with *Azospirillum* mitigates NaCl effects on lettuce. *Scientia Horticulturae*, 109(1), 8-14.
- Bartha, C., Fodorpataki, L., Martinez-Ballesta, M., Popescu, O., Carvajal, M., 2015. Sodium accumulation contributes to salt stress tolerance in lettuce cultivars. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 88, 42-48.
- Bassing, C. H., Swat, W., & Alt, F. W. (2002). The mechanism and regulation of chromosomal V (D) J recombination. *Cell*, 109(2), S45-S55.
- Bayraklı, F., 1998. Toprak Kimyası. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, 214s, 1. Baskı, Samsun.
- Berthomieu, P., Conéjéro, G., Nublat, A., Brackenbury, W.J., Lambert, C., Savio, C., Uozumi, N., Oiki, S., Yamada, K., Cellier, F., Gosti, F., Simonneau, T., Essah, P.A., Tester, M., Véry, A-A., Sentenac, H. ve Casse, F., 2003. Functional Analysis of AtHKT1 in Arabidopsis Shows that Na⁺ Recirculation by the Phloem is Crucial for Salt Tolerance, *The EMBO Journal*, 22(9), 2004-2014.
- Bijeh, K. M. H. (2012). Studying the effects of different levels of salinity which caused by NaCl on early growth and germination of *Lactuca Sativa* L. seedling. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*, 8(1).
- Borowski, J. M., Galli, V., da Silva Messias, R., Perin, E. C., Buss, J. H., e Silva, S. D. D. A., & Rombaldi, C. V. (2014). Selection of candidate reference genes for real-time PCR studies in lettuce under abiotic stresses. *Planta*, 239(6), 1187-1200.
- Botella, M.A., Rosado, A., Bressan, R.A. ve Hasegawa, P.M., 2005. Plant Adaptive Responses to Salinity Stress, *Plant Abiotic Stress*, Blackwell Publishing Ltd., 270p.
- Boyko, A., Kathiria, P., Zemp, F. J., Yao, Y., Pogribny, I., & Kovalchuk, I. (2007). Transgenerational changes in the genome stability and methylation in pathogen-infected plants: (Virus-induced plant genome instability). *Nucleic acids research*, 35(5), 1714-1725.
- Bybordi, A. (2010). The influence of salt stress on seed germination, growth and yield of canola cultivars. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 38(1), 128-133.
- Caldwell, C. R., & Britz, S. J. (2006). Effect of supplemental ultraviolet radiation on the carotenoid and chlorophyll composition of green house-grown leaf lettuce (*Lactuca sativa* L.) cultivars. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(6-7), 637-644.
- Cardinali DP, Pevet P 1998. Basic Aspects of Melatonin Action. *Sleep Medicine Reviews*, 2: 175–190.

- Chen, L., Fan, J., Hu, Z., Huang, X., Amombo, E., Liu, A., ... & Fu, J. (2017). Melatonin is involved in regulation of Bermudagrass growth and development and response to low K⁺ stress. *Frontiers in plant science*, 8, 2038.
- Chen, Y. E., Mao, J. J., Sun, L. Q., Huang, B., Ding, C. B., Gu, Y., ... & Yuan, M. (2018). Exogenous melatonin enhances salt stress tolerance in maize seedlings by improving antioxidant and photosynthetic capacity. *Physiologia plantarum*, 164(3), 349-363.
- Chen, Z. J., & Ni, Z. (2006). Mechanisms of genomic rearrangements and gene expression changes in plant polyploids. *Bioessays*, 28(3), 240-252.
- Choi, C. S., & Sano, H. (2007). Abiotic-stress induces demethylation and transcriptional activation of a gene encoding a glycerophosphodiesterase-like protein in tobacco plants. *Molecular Genetics and Genomics*, 277(5), 589-600.
- Chutipaijit, S., Cha-um, S., & Sompornpailin, K. (2011). High contents of proline and anthocyanin increase protective response to salinity in 'Oryza sativa' L. spp. 'indica'. *Australian Journal of Crop Science*, 5(10), 1191.
- Chwialkowska, K., Korotko, U., Kosinska, J., Szarejko, I., & Kwasniewski, M. (2017). Methylation sensitive amplification polymorphism sequencing (MSAP-Seq)—A method for high-throughput analysis of differentially methylated CCGG sites in plants with large genomes. *Frontiers in Plant Science*, 8, 2056.
- Cuartero, J., & Fernández-Muñoz, R. (1998). Tomato and salinity. *Scientia horticulturae*, 78(1-4), 83-125.
- Çulha, Ş., & Çakırlar, H. (2011). Tuzluluğun Bitkiler Üzerine Etkileri ve Tuz Tolerans Mekanizmaları (021002)(11-34). Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi, 11(2).
- Daiya, K. S., Sharma, H. K., Chawan, D. D., & Sen, D. N. (1980). Effect of salt solutions of different osmotic potential on seed germination and seedling growth in some *Cassia* species. *Folia Geobotanica et Phytotaxonomica*, 15(2), 149-153.
- Davenport, R., James, R.A., Zakrisson-Plogander, A., Tester, M. and Munns, R., 2005. Control of sodium transport in durum wheat. *Plant Physiol*, 137, 807–818.
- Demirkıran, A., Maraklı, S., Temel, A. and Gozukırmızı, N., 2013. Genetic and epigenetic effect of salinity on in vitro growth of barley. *Genetics and Molecular Biology*, 36(4), 566-570.
- Ding, G. H., Guo, D. D., Guan, Y., Chi, C. Y., & Liu, B. D. (2019). Changes of DNA methylation of *Isoetes sinensis* under Pb and Cd stress. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(4), 3428-3435.
- Du, W. X., Avena-Bustillos, R. J., Breksa III, A. P., & McHugh, T. H. (2014). UV-B light as a factor affecting total soluble phenolic contents of various whole and fresh-cut specialty crops. *Postharvest Biology and Technology*, 93, 72-82.
- Erdal, İ., Türkmen, Ö., & Yıldız, M. (2000). Tuz stresi altında yetiştirilen hıyar (*Cucumis sativus* L.) fidelerinin gelişimi ve kimi besin maddeleri içeriğindeki değişimler üzerine potasyumlu gübrelemenin etkisi. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi, 10(1), 25-29.
- Fan, J., Xie, Y., Zhang, Z., Chen, L., 2018. Melatonin: A Multifunctional Factor in Plants. *International Journal Of Moleculer Sciences*, 19, 1528.
- Fedina, I.S., Grigorova, I.D. and Georgieva, K.M., 2003. Response of barley seedlings to UV–B radiation as affected by NaCl. *Journal of Plant Physiology* 160, 205–208.

- Feng, X., Wang, M., Zhao, Y., Han, P., & Dai, Y. (2014). Melatonin from different fruit sources, functional roles, and analytical methods. *Trends in Food Science & Technology*, 37(1), 21-31.
- Fernández, J. A., Niñirola, D., Ochoa, J., Orsini, F., Pennisi, G., Gianquinto, G., & Egea-Gilabert, C. (2016). Root adaptation and ion selectivity affects the nutritional value of salt-stressed hydroponically grown baby-leaf *Nasturtium officinale* and *Lactuca sativa*. *Agricultural and Food Science*, 25(4), 230-239
- Finnegan EJ, Genger RK, Kovac K, Peacock WJ, Dennis ES (1998). DNA methylation and the promotion of flowering by vernalization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 5824-5829.
- Flowers, T.J., 2004. Improving crop salt tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 55(396), 307-319.
- Foolad, M. R., & Lin, G. Y. (1997). Genetic potential for salt tolerance during germination in *Lycopersicon* species. *HortScience*, 32(2), 296-300
- Foolad, M. R., & Lin, G. Y. (1998). Genetic analysis of low-temperature tolerance during germination in tomato, *Lycopersicon esculentum* Mill. *Plant breeding*, 117(2), 171-176.
- Ganieva, R., Allakhverdiev, S., Bayramova, S., & Nafisi, S. (1997). Effect of polystimuline-K on maize (*Zea mays* L.) seedlings pigment apparatus formation on the sodium chloride salinity. *Turkish Journal of Botany*, 21(5), 253-257.
- Gao, W., Zhang, Y., Feng, Z., Bai, Q., He, J., & Wang, Y. (2018). Effects of melatonin on antioxidant capacity in naked oat seedlings under drought stress. *Molecules*, 23(7), 1580.
- Ghogdi, E.A., Izadi-Darbandi, A. and Borzouei, A., 2012. Effects of salinity on some physiological traits in wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. *Indian Journal of Science and Technology*, 5(1), 1901-1906.
- Greenway, H., & Munns, R. (1980). Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes. *Annual review of plant physiology*, 31(1), 149-190.
- Gruenbaum, Y., Cedar, H., & Razin, A. (1981). Restriction enzyme digestion of hemimethylated DNA. *Nucleic acids research*, 9(11), 2509-2515.
- Guevara, M.A., María, N., Sáez-Laguna, E., Vélez, M., Cervera, M.T., Cabezas, J.A., 2017. Analysis of DNA Cytosine Methylation Patterns Using Methylation-Sensitive Amplification Polymorphism (MSAP). *Plant Epigenetics*, Kovalchuk, I. Springer, New York, 99-112.
- Gupta, S.D., 2007. Plasma membrane ultrastructure in embryogenic cultures of orchardgrass during NaCl stress. *Biologia Plantarum*, 51(4), 759-763.
- Habu Y, Kakutani T, Paszkowski J (2001). Epigenetic developmental mechanisms in plants: molecules and targets of plant epigenetic regulation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 11: 215-220.
- Han, Y., Yin, S., Huang, L., Wu, X., Zeng, J., Liu, X., ... & Zhang, G. (2018). A Sodium Transporter HvHKT1; 1 Confers Salt Tolerance in Barley via Regulating Tissue and Cell Ion Homeostasis. *Plant and Cell Physiology*.
- Hasanuzzaman, M., Fujita, M., Islam, M. N., Ahamed, K. U., & Nahar, K. (2009). Performance of four irrigated rice varieties under different levels of salinity stress. *International Journal of Integrative Biology*, 6(2), 85-90.

- Hniličková, H., Hnilička, F., Orsák, M., & Hejnák, V. (2019). Effect of salt stress on growth, electrolyte leakage, Na⁺ and K⁺ content in selected plant species. *Plant, Soil and Environment*, 65(2), 90-96.
- Hoffman, G. J., Rawlins, S. L., Oster, J. D., Jobes, J. A., & Merrill, S. D. (1979). Leaching requirement for salinity control I. Wheat, sorghum, and lettuce. *Agricultural Water Management*, 2(3), 177-192.
- Holmberg, N. and Bülow, L., 1998. Improving stress tolerance in plants by gene transfer. *Trends in Plant Science*, 3(2), 61-6.
- Hu, Y. and Schmidhalter, U., 2005. Drought and Salinity: A Comparison of Their Effects on Mineral Nutrition of Plants, *Journal of Plant Nutrient and Soil Science*, 168, 541-549.
- Iqbal, K., Jin, S. G., Pfeifer, G. P., & Szabó, P. E. (2011). Reprogramming of the paternal genome upon fertilization involves genome-wide oxidation of 5-methylcytosine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(9), 3642-3647.
- Izadi Darbandi, A. and Bahmani, K., 2011. Principal of Fennel cultivation and breeding. Tehran, Tamadon Pars.
- İzmirli, M. (2013). Epigenetik Mekanizmalar ve Kanser Tedavisinde Epigenetik Yaklaşımlar. *Van Tıp Dergisi*, 20(1), 48-51.
- Jamil, M., Ashraf, M., Rehman, S., Ahmad, M. and Rha, E. S., 2012. Salinity induced changes in cell membrane stability, protein and RNA contents. *African Journal of Biotechnology*, 11(24), 6476-6483.
- Janas, K. M., & Posmyk, M. M. (2013). Melatonin, an underestimated natural substance with great potential for agricultural application. *Acta physiologiae plantarum*, 35(12), 3285-3292.
- Joel, A. J. (2013). Epigenetic responses to drought stress in rice (*Oryza sativa* L.). *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 19(3), 379-387.
- Kacar, B., Katkat, V., Öztürk, Ş., 2013. Stres Fizyolojisi. Bitki Fizyolojisi, Ed: Karataş, M. Ankara, 485-524.
- Kahn, N.A., 2003. NaCl-inhibited chlorophyll synthesis and associated changes in ethylene evolution and antioxidative enzyme activities in wheat. *Biology of Plants* 47, 437-440.
- Kalaji, M. H., & Pietkiewicz, S. (1993). Salinity effects on plant growth and other physiological processes. *Acta Physiologiae Plantarum*, 15(2).
- Kanber, R., Kırdar, C., & Tekinel, O. (1992). Sulama suyu niteliği ve sulamada tuzluluk sorunları. *ÇÜ Ziraat Fakültesi Genel Yayın*, 21.
- Karadayı, G., 2017. Tuzluluğa Dayanıklı ve Toleranslı Buğday Genotiplerinde Bazı Moleküler Özellikler Arasındaki İlişkilerin Belirlenmesi. Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi.
- Karan, R., DeLeon, T., Biradar, H., & Subudhi, P. K. (2012). Salt stress induced variation in DNA methylation pattern and its influence on gene expression in contrasting rice genotypes. *PloS one*, 7(6), e40203.
- Ke, Q., Ye, J., Wang, B., Ren, J., Yin, L., Deng, X., & Wang, S. (2018). Melatonin mitigates salt stress in wheat seedlings by modulating polyamine metabolism. *Frontiers in plant science*, 9, 914.
- Khodarahmpour, Z., Ifar, M., & Motamedi, M. (2012). Effects of NaCl salinity on maize (*Zea mays* L.) at germination and early seedling stage. *African Journal of Biotechnology*, 11(2), 298-304.

- Kim, M.C., Chung, W.S., Yun, D. and Cho, M.J., 2009. Calcium and calmodulin-mediated regulation of gene expression in plants. *Molecular Plant*, 2, 13-21.
- Kołodziejczyk, I., Dzitko, K., Szewczyk, R., & Posmyk, M. M. (2016). Exogenous melatonin expediently modifies proteome of maize (*Zea mays* L.) embryo during seed germination. *Acta Physiologiae Plantarum*, 38(6), 146.
- Korkmaz¹, Y., & Çölgeçen., 2013. H. Bitki Doku Kültürü Çalışmalarında Somaklonal Varyasyon.
- Kotuby, J., Koenig, R., and Kitchen, B., 1997. Salinity and Plant Tolerance. Utah State University Extension. A.G-SO-03:8.
- Kovar, A., Koukalova, B., Bezde, M., & Opatrn, Z. (1997). Hypermethylation of tobacco heterochromatic loci in response to osmotic stress. *Theoretical and Applied Genetics*, 95(1-2), 301-306.
- Kress C, Thomassin H, Grange T (2001). Local DNA demethylation in vertebrates: how could it be performed and targeted? *FEBS Lett*. 494: 135-140.
- Krishnamurthy, P., Vishal, B., Khoo, K., Rajappa, S., Loh, C. S., & Kumar, P. P. (2019). Expression of AoNHX1 increases salt tolerance of rice and Arabidopsis, and bHLH transcription factors regulate AtNHX1 and AtNHX6 in Arabidopsis. *Plant cell reports*, 38(10), 1299-1315.
- Kumar, S., Sehgal, S. K., Kumar, U., Prasad, P. V., Joshi, A. K., & Gill, B. S. (2012). Genomic characterization of drought tolerance-related traits in spring wheat. *Euphytica*, 186(1), 265-276.
- Lee, M-J., Son, J.E., Oh, M-M., 2013. Growth and phenolic compounds of *Lactuca sativa* L. grown in a closed-type plant production system with UV-A, -B, or -C lamp. *Research Article*, (94), 197-204
- Li, C., Wang, P., Wei, Z., Liang, D., Liu, C., Yin, L., & Ma, F. (2012). The mitigation effects of exogenous melatonin on salinity-induced stress in *Malus hupehensis*. *Journal of pineal research*, 53(3), 298-306.
- Liu, J., Ishitani, M., Halfter, U., Kim, C.S. and Zhu J.K., 2000. The *Arabidopsis thaliana* SOS2 gene encodes a protein kinase that is required for salt tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 97, 3730–3734.
- Lombardi, T., & Lupi, B. (2006). Effect of salinity on the germination and growth of *Hordeum secalinum* Schreber (Poaceae) in relation to the seeds after-ripening time. *Atti Soc tosc Sci nat Mem Serie B*, 113, 37-42.
- Mansour, M.F. and Salama, K.H., 2004. Cellular basis of salinity tolerance in plants. *Environmental and Experimental Botany*, 52(2), 113-122.
- Michalowsky, L. A., & Jones, P. A. (1989). DNA methylation and differentiation. *Environmental health perspectives*, 80, 189-197.
- Mirouze, M., & Paszkowski, J. (2011). Epigenetic contribution to stress adaptation in plants. *Current opinion in plant biology*, 14(3), 267-274.
- Mohammadi, P., & Khoshgoftarmanesh, A. H. (2014). The effectiveness of synthetic zinc (Zn)-amino chelates in supplying Zn and alleviating salt-induced damages on hydroponically grown lettuce. *Scientia Horticulturae*, 172, 117-123.
- Mohebodini, M., Mokhtar, J. J., Mahboudi, F., & Alizadeh, H. (2011). Effects of genotype, explant age and growth regulators on callus induction and direct shoot regeneration of Lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Australian Journal of Crop Science*, 5(1), 92.

- Moraes, G. P., Benitez, L. C., Do Amaral, M. N., Vighi, I. L., Auler, P. A., Da Maia, L. C., ... & Braga, E. J. B. (2015). Evaluation of reference genes for RT-qPCR studies in the leaves of rice seedlings under salt stress. *Genet Mol Res*, 14, 2384-2398.
- Mota-Cadenas, C., Alcaraz-López, C., Martínez-Ballesta, M. C., & Carvajal, M. (2010). How salinity affects CO₂ fixation by horticultural crops. *HortScience*, 45(12), 1798-1803.
- Mukherjee, S., David, A., Yadav, S., Baluška, F., & Bhatla, S. C. (2014). Salt stress-induced seedling growth inhibition coincides with differential distribution of serotonin and melatonin in sunflower seedling roots and cotyledons. *Physiologia plantarum*, 152(4), 714-728.
- Munns, R. and Tester, M., 2008. Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 651-681.
- Munns, R., 2005. Genes and salt tolerance: bringing them together. *New Phytologist*, 167, 645-663.
- Nahar, K., & Hasanuzzaman, M. (2009). Germination, growth, nodulation and yield performance of three mungbean varieties under different levels of salinity stress. *Green Farming*, 2(12), 825-829.
- Naz, R., & Bano, A. (2015). Molecular and physiological responses of sunflower (*Helianthus annuus* L.) to PGPR and SA under salt stress. *Pak. J. Bot*, 47(1), 35-42.
- Neumann, P. (1997). Salinity resistance and plant growth revisited. *Plant, Cell & Environment*, 20(9), 1193-1198.
- Noreen, S., Ashraf, M., & Akram, N. A. (2012). Does exogenous application of salicylic acid improve growth and some key physiological attributes in sunflower plants subjected to salt stress?. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 84(2), 169.
- Oh, D.H., Leidi, E., Zhang, Q., Hwang, S.M., Li, Y.Z., Quintero, F.J., Jiang, X.Y., D'Urzo, M.P., Lee, S.Y. and Zhao, Y.X., 2009. Loss of halophytism by interference with SOS1 expression. *Plant Physiol*, 151, 210-222.
- Olias, R., Eljakaoui, Z., Li, J., Marín- Manzano, M.C., Pardo, J.M. and Belver, A., 2009. The plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter SOS1 is essential for salt tolerance in tomato and affects the partitioning of Na⁺ between plant organs. *Plant Cell Environ*, 32, 904-916.
- Peirce, L.C., 1987. *Vegetables (Characteristics, Production, Marketing)*. John Wiley and Sons Inc. USA. 433 p.
- Pérez-López, U., Miranda-Apodaca, J., Muñoz-Rueda, A., & Mena-Petite, A. (2013). Lettuce production and antioxidant capacity are differentially modified by salt stress and light intensity under ambient and elevated CO₂. *Journal of plant physiology*, 170(17), 1517-1525.
- Qados, A. M. A. (2011). Effect of salt stress on plant growth and metabolism of bean plant *Vicia faba* (L.). *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 10(1), 7-15.
- Reiter, R. J., Tan, D. X., Manchester, L. C., Simopoulos, A. P., Maldonado, M. D., Flores, L. J., & Terron, M. P. (2007). Melatonin in edible plants (phytomelatonin): identification, concentrations, bioavailability and proposed functions. *World review of nutrition and dietetics*, 97, 211-230.

- Rodriguez, C., Mayo, J. C., Sainz, R. M., Antolín, I., Herrera, F., Martín, V., & Reiter, R. J. (2004). Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *Journal of pineal research*, 36(1), 1-9.
- Rouphael, Y., Colla, G., Bernardo, L., Kane, D., Trevisan, M., & Lucini, L. (2016). Zinc excess triggered polyamines accumulation in lettuce root metabolome, as compared to osmotic stress under high salinity. *Frontiers in plant science*, 7, 842.
- Roy, S.J., Tucker, E.J. and Tester, M., 2011. Genetic analysis of abiotic stress tolerance in crops. *Current Opinion in Plant Biology*, 14(3), 232-239.
- Sahu, P. P., Pandey, G., Sharma, N., Puranik, S., Muthamilarasan, M., & Prasad, M. (2013). Epigenetic mechanisms of plant stress responses and adaptation. *Plant cell reports*, 32(8), 1151-1159.
- Sathee, L., Sairam, R.K., Chinnusamy, V. and Jha, S.K. 2015. Differential transcript abundance of salt overly sensitive (SOS) pathway genes is a determinant of salinity stress tolerance of wheat. *Acta Physiol Plant*, 37, 169.
- Sayed, O.H., 2003. Chlorophyll fluorescence as a tool in cereal crop research. *Photosynthetica* 41, 321–330.
- Schrader, S. E. (2017). Salinity Tolerance of Lettuce Cultivars in Controlled Environment.
- Sgamma, T., Pape, J., Massiah, A., & Jackson, S. (2016). Selection of reference genes for diurnal and developmental time-course real-time PCR expression analyses in lettuce. *Plant Methods*, 12(1), 21
- Shannon, M. C., Grieve, C. M., Lesch, S. M., & Draper, J. H. (2000). Analysis of salt tolerance in nine leafy vegetables irrigated with saline drainage water. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 125(5), 658-664.
- Shi, H., & Zhu, J. K. (2002). Regulation of expression of the vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter gene AtNHX1 by salt stress and abscisic acid. *Plant molecular biology*, 50(3), 543-550.
- Shannon, M. C., McCreight, J. D., & Draper, J. H. (1983). Screening tests for salt tolerance in lettuce. *Journal American Society for Horticultural Science*.
- Shi, H., Ishitani, M., Kim, C., & Zhu, J. K. (2000). The Arabidopsis thaliana salt tolerance gene SOS1 encodes a putative Na⁺/H⁺ antiporter. *Proceedings of the national academy of sciences*, 97(12), 6896-6901.
- Shi, H., Jiang, C., Ye, T., Tan, D. X., Reiter, R. J., Zhang, H., ... & Chan, Z. (2014). Comparative physiological, metabolomic, and transcriptomic analyses reveal mechanisms of improved abiotic stress resistance in bermudagrass [*Cynodon dactylon* (L). Pers.] by exogenous melatonin. *Journal of experimental botany*, 66(3), 681-694.
- Silva, P., & Gerós, H. (2009). Regulation by salt of vacuolar H⁺-ATPase and H⁺-pyrophosphatase activities and Na⁺/H⁺ exchange. *Plant signaling & behavior*, 4(8), 718-726.
- Sing, A.K and Dubey, R.S., 1995. Changes in chlorophyll a and b contents and activities of photosystems 1 and 2 in rice seedlings induced by NaCl. *Photosynthetica* (Czech Republic).
- Tang, X. M., Tao, X., Wang, Y., Ma, D. W., Li, D., Yang, H., & Ma, X. R. (2014). Analysis of DNA methylation of perennial ryegrass under drought using the methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP) technique. *Molecular Genetics and Genomics*, 289(6), 1075-1084.

- Teixeira, A., Morfim, M. P., de Cordova, C. A., Charão, C. C., de Lima, V. R., & Creczynski-Pasa, T. B. (2003). Melatonin protects against pro-oxidant enzymes and reduces lipid peroxidation in distinct membranes induced by the hydroxyl and ascorbyl radicals and by peroxynitrite. *Journal of pineal research*, 35(4), 262-268.
- Tuğcu, D., 2016. Değişik vejetasyon dönemlerine kadar uygulanan farklı tuz konsantrasyonlarının yaprak lahanada meydana getirdiği fizyolojik, morfolojik ve kimyasal değişikliklerin belirlenmesi. Namık Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Yüksek lisans tezi.
- Tuteja, N., 2007. Mechanisms of High Salinity Tolerance in Plants, *Methods in Enzymology*, 428, 419-438.
- Vega-Muñoz, I., Feregrino-Pérez, A. A., Torres-Pacheco, I., & Guevara-González, R. G. (2018). Exogenous fragmented DNA acts as a damage-associated molecular pattern (DAMP) inducing changes in CpG DNA methylation and defence-related responses in *Lactuca sativa*. *Functional Plant Biology*.
- Vural, H., Eşiyok D. ve Duman İ., 2000. Kültür Sebzeleri (Sebze Yetiştirme). Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü, Bornova-İzmir, 440 s.
- Wada, Y., Miyamoto, K., Kusano, T., & Sano, H. (2004). Association between up-regulation of stress-responsive genes and hypomethylation of genomic DNA in tobacco plants. *Molecular Genetics and Genomics*, 271(6), 658-666.
- Wang, B.H., Zhang, M., Fu, R., Qian, X.W., Rong, P., Zhang, Y., Jiang, P., Wang, J.J., Lu, X.K., Wang, D.L., Ye, W., Zhu, X., 2016. Epigenetic mechanisms of salt tolerance and heterosis in Upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) revealed by methylation-sensitive amplified polymorphism analysis. *Euphytica*. 208:477–491.
- Wang, P., Sun, X., Li, C., Wei, Z., Liang, D., & Ma, F. (2013). Long-term exogenous application of melatonin delays drought-induced leaf senescence in apple. *Journal of Pineal Research*, 54(3), 292-302.
- Wang, P., Sun, X., Xie, Y., Li, M., Chen, W., Zhang, S., ... & Ma, F. (2014). Melatonin regulates proteomic changes during leaf senescence in *Malus hupehensis*. *Journal of Pineal Research*, 57(3), 291-307.
- Wang, W. S., Pan, Y. J., Zhao, X. Q., Dwivedi, D., Zhu, L. H., Ali, J., ... & Li, Z. K. (2010). Drought-induced site-specific DNA methylation and its association with drought tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of experimental botany*, 62(6), 1951-1960.
- Wang, W., Zhao, X., Pan, Y., Zhu, L., Fu, B., & Li, Z. (2011). DNA methylation changes detected by methylation-sensitive amplified polymorphism in two contrasting rice genotypes under salt stress. *Journal of Genetics and Genomics*, 38(9), 419-424.
- Weeda, S., Zhang, N., Zhao, X., Ndip, G., Guo, Y., Buck, G. A., ... & Ren, S. (2014). Arabidopsis transcriptome analysis reveals key roles of melatonin in plant defense systems. *PloS one*, 9(3), e93462.
- Wei, J. Y., Li, W. M., Zhou, L. L., Lu, Q. N., & He, W. (2015). Melatonin induces apoptosis of colorectal cancer cells through HDAC 4 nuclear import mediated by C a MKII inactivation. *Journal of pineal research*, 58(4), 429-438.
- Xiong, L., Schumaker, K.S. and Zhu, J.K., 2002. Cell signaling during cold, drought, and salt stress. *Plant Cell*, 14, 165–183.
- Xu, C., Mou, B., 2015. Evaluation of Lettuce Genotypes for Salinity Tolerance. *Hort Science*, 50(10), 1441-1446.

- Yaish, M. W. (2013). DNA methylation-associated epigenetic changes in stress tolerance of plants. In *Molecular stress physiology of plants* (pp. 427-440). Springer, India.
- Yaish, M. W., Peng, M., & Rothstein, S. J. (2014). Global DNA methylation analysis using methyl-sensitive amplification polymorphism (MSAP). In *Arabidopsis protocols* (pp. 285-298). Humana Press, Totowa, NJ.
- Yakupoglu, T., Gundogan, R., Dindaroglu, T., & Kara, Z. (2017). Effects of land conversion from native shrub to pistachio orchard on soil erodibility in an arid region. *Environmental monitoring and assessment*, 189(11), 588.
- Yakupoglu, T., Rızaoğlu, T., Dindaroglu, T., Sesveren, S., Kara, Z., & Gündoğan, R. (2018). *Eurasian Journal of Soil Science*. *Eurasian Journal of Soil Science*, 7(1), 1-8.
- Yang, Q., Chen, Z. Z., Zhou, X. F., Yin, H. B., Li, X., Xin, X. F., . & Gong, Z. (2009). Overexpression of SOS (Salt Overly Sensitive) genes increases salt tolerance in transgenic Arabidopsis. *Molecular Plant*, 2(1), 22-31.
- Yang, Q., Chen, Z.Z., Zhou, X.F., Yin, H.B., Li, X., Xin, X.F., Hong, X.H., Zhu, J.K. and Gong, Z., 2009. Overexpression of SOS (Salt Overly Sensitive) genes increases salt tolerance in transgenic Arabidopsis. *Molecular Plant*, 2, 22–31.
- Yıldız, M., Terzi, H., & Akçalı, N. (2014). Tuz Stresi Altındaki Bitkilerin Metabolik Yollarındaki Proteom Değişimleri. *Bitlis Eren Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 3(1).
- Yılmaz, E., Tuna, A. L., & Bürün, B., 2011. Bitkilerin Tuz Stresi Etkilerine Karşı Gelistirdikleri Tolerans Stratejileri-Tolerance Strategies Developed By Plants To The Effects Of Salt Stress. *Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 7(1), 47-66.
- Yu, Y., Wang, A., Li, X., Kou, M., Wang, W., Chen, X., & Sun, J. (2018). Melatonin-Stimulated Triacylglycerol Breakdown and Energy Turnover under Salinity Stress Contributes to the Maintenance of Plasma Membrane H⁺-ATPase Activity and K⁺/Na⁺ Homeostasis in Sweet Potato. *Frontiers in plant science*, 9, 256.
- Zapata, P. J., Serrano, M., Pretel, M. T., Amorós, A., & Botella, M. A. (2003). Changes in ethylene evolution and polyamine profiles of seedlings of nine cultivars of *Lactuca sativa* L. in response to salt stress during germination. *Plant Science*, 164(4), 557-563.
- Zapata, P. J., Serrano, M., Pretel, M. T., Amorós, A., & Botella, M. Á. (2004). Polyamines and ethylene changes during germination of different plant species under salinity. *Plant Science*, 167(4), 781-788.
- Zenda, T., Liu, S., Yao, D., & Duan, H. (2018). Analysis of sulphur and chlorine induced DNA cytosine methylation alterations in fresh corn (*Zea mays* L. *saccharata* and *rugosa*) leaf tissues by methylation sensitive amplification polymorphism (MSAP) approach. *Genes & genomics*, 40(9), 913-925.
- Zhang, H. H., Xu, N., Wu, X., Wang, J., Ma, S., Li, X., & Sun, G. (2018). Effects of four types of sodium salt stress on plant growth and photosynthetic apparatus in sorghum leaves. *Journal of Plant Interactions*, 13(1), 506-513.
- Zhang, J.L., Flowers, T.J. and Wang, S.M., 2010. Mechanisms of sodium uptake by roots of higher plants. *Plant Soil*, 326, 45–60.
- Zhang, M., Cao, Y., Wang, Z., Wang, Z. Q., Shi, J., Liang, X., ... & Jiang, C. (2018). A retrotransposon in an HKT1 family sodium transporter causes variation of leaf Na⁺ exclusion and salt tolerance in maize. *new phytologist*, 217(3), 1161-1176

- Zhang, N., Sun, Q., Zhang, H., Cao, Y., Weeda, S., Ren, S., & Guo, Y. D. (2014). Roles of melatonin in abiotic stress resistance in plants. *Journal of experimental botany*, 66(3), 647-656.
- Zhang, X., Yazaki, J., Sundaresan, A., Cokus, S., Chan, S. W. L., Chen, H., ... & Ecker, J. R. (2006). Genome-wide high-resolution mapping and functional analysis of DNA methylation in *Arabidopsis*. *Cell*, 126(6), 1189-1201.
- Zhao, G., Zhao, Y., Yu, X., Kiprotich, F., Han, H., Guan, R., ... & Shen, W. (2018). Nitric Oxide Is Required for Melatonin-Enhanced Tolerance against Salinity Stress in Rapeseed (*Brassica napus* L.) Seedlings. *International journal of molecular sciences*, 19(7), 1912.
- Zhu, J.K., Liu, J. and Xiong L., 1998. Genetic analysis of salt tolerance in *Arabidopsis*. Evidence for a critical role of potassium nutrition. *Plant Cell*, 10, 1181–1191.



ÖZGEÇMİŞ

06.05.1993 tarihinde Erzurum ilinde doğdu. İlkokulu İbn-i Sina ilköğretim okulunda bitirdi. Lise öğrenimini Yıldızkent İ.M.K.B Anadolu Lisesinde tamamladıktan sonra 2012 yılında Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji bölümünde lisans eğitimine başladı. 2016 yılında 3,10 agno ile bu bölümden mezun olarak aynı yıl Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Bitkisel Biyoteknoloji bilim dalında yüksek lisansa başladı ve halen aynı bilim dalında eğitimine devam etmektedir.