

Araştırma Makalesi

IN VITRO KOŞULLARINDA NaCl STRESİNİN DOMATES ÇEŞİTLERİNİN ÇİMLENMESİ ÜZERİNE FİZYOLOJİK ve BİYOKİMYASAL ETKİLERİSema KARAKAŞ^{1*}, Mehmet Ali ÇULLU¹, Murat DİKİLİTAŞ²**ÖZET**

Bu çalışmada *in vitro* koşullarda Petri kaplarında farklı dozlarda uygulanan NaCl (0-, 50-, 100-, 150-, 200-, 250- ve 300 mM) stresinin domates çeşitlerinin (Ayaş, H2274, Falkon, SC2121, Rio Grande) çimlenmesi üzerine olan etkileri fizyolojik ve biyokimyasal parametreler ile incelenmiştir. Çimlenen tohumların iki hafta sonunda çimlenme yüzdesi, radikul ve hipokotil uzunluğu, yaş ağırlık, çimlenme ve vigor indeksleri artan tuz stresi ile negatif bir ilişki gösterirken ($P<0.01$), çeşitler arasında farklılıklar görülmüştür. Çimlenme oranları yüksek olan çeşitlerin (SC2121, Falkon ve Ayaş) radikul ve hipokotil uzunluğu, yaş ağırlığı, çimlenme oranı düşük olan çeşitlerden (Rio Grande ve H2274) daha yüksek bulunmuş, bu durum çimlenme ve vigor indeks sonuçları ile de teyit edilmiştir.

Genel olarak, 50 mM NaCl stresi bütün çeşitlerde prolin sentezini ve antioksidant enzim CAT (E.C. 1.11.1.6) ve POX (E.C.1.11.1.7) aktivitelerini artırırken, tuz konsantrasyonundaki (100 mM NaCl) artış, hassas olarak gözlenen çeşitlerde (Rio Grande ve H2274) daha yüksek metabolit sentezlenmesine yol açmış, ancak 150 mM NaCl seviyesinde bu metabolitlerin seviyesinde düşüş görülmüştür. Buna karşılık dayanıklı olarak gözlenen çeşitlerde ise enzim artışı istatistiki açıdan 50 mM NaCl seviyesinde farklı bulunmasa bile artan tuz konsantrasyonu ile göreceli olarak artmıştır. Çeşitler protein içerikleri bakımından incelendiğinde, tuza dayanıklılık gösteren çeşitlerin (SC2121, Falkon ve Ayaş) protein içeriği 100 mM NaCl seviyesine kadar farklılık göstermezken diğer çeşitlerin (Rio Grande ve H2274) 50 mM ve üstü tuz konsantrasyonlarında, protein içeriğinde önemli düşüş kaydedilmiştir ($P<0.01$).

Anahtar Kelimeler: Domates, NaCl, Çimlenme, Tohum

PHYSIOLOGICAL and BIOCHEMICAL EFFECTS OF NaCl STRESS on GERMINATION of TOMATO CULTIVARS in IN VITRO CONDITIONS**ABSTRACT**

In this study, differing concentrations of NaCl (0-, 50-, 100-, 150-, 200-, 250- ve 300 mM) stress on germination of various tomato cultivars (Ayaş, H2274, Falkon, SC2121, Rio Grande) were investigated using physiological and biochemical parameters. Germination percentage, radicul and hypocotyl length, fresh weight, germination and vigor index values decreased with the increase of NaCl stress ($P<0.01$), differences were evident between the cultivars. Radicul, hypocotyl length and fresh weight values were higher in cultivars with high germination ratios (SC2121, Falkon ve Ayaş) than those (Rio Grande ve H2274) of cultivars with low germination values. This case was also supported with germination and vigor index results.

In general, 50 mM NaCl stress increased proline and antioxidant enzyme CAT (E.C. 1.11.1.6) and POX (E.C.1.11.1.7) synthesis in all cultivars, further increase in salt concentrations (100 mM NaCl) resulted in higher metabolite synthesis in susceptible cultivars (Rio Grande ve H2274). However, the metabolites at 150 mM NaCl level decreased. On the other hand, increase in enzymatic synthesis in salt resistant cultivars correlated with increase of NaCl in a step-wise manner although the increase in metabolites were not significantly different from that of 50 mM NaCl level. When cultivars were examined in protein contents, salt resistant cultivars (SC2121, Falkon ve Ayaş) had similar protein levels up to 100 mM NaCl concentrations while Rio Grande and H2274 showed decline in protein contents after 50 mM NaCl level ($P<0.01$).

Key Words: Tomato, NaCl, Germination, Seed

*Sorumlu Yazar: skarakas@harran.edu.tr

¹Harran Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Toprak Bilimi ve Bitki Besleme Bölümü, Şanlıurfa.

²Harran Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Şanlıurfa.

GİRİŞ

Tarımsal alanların en önemli ve yıkıcı stresi olarak kabul edilen tuz stresi, kuraklık ve sulanan tarım arazilerinin artması ile ciddi artış göstermiş, tarımsal ürün kayıplarının en önemli sorunlarından biri haline gelmiştir (Mengel ve ark., 2001; Dikilitaş ve Karakaş, 2010; Dikilitaş ve Karakaş, 2012). Tuz stresi, toprak solusyonunda oluşturduğu osmotik etki, iyon toksisitesi ve diğer elementler ile girdiği rekabet ile bitkilerde oksidatif strese neden olarak bitkilerin büyüme ve gelişmesini sınırlandırmaktadır (Okhovatian-Ardakani ve ark., 2010). Çimlenme aşamasında tuz stresi oksidatif stresi tetikleyerek dokularda reaktif oksijen türlerinin (H_2O_2 , O_2^- , O^- , OH^-) oluşumuna neden olarak membran geçirgenliğinin artışıyla önemli rol oynamakta olup, bu aşamada çözünebilir madde miktarı (proteinler, şeker, amino asit ve renk maddeleri) hücre dışına kaybedildiğinden, çimlenme hızı ve gücü yavaşlamakta, dolayısı ile çimlenme süresi hem uzamakta hem de çimlenen tohumların vigor indeks değerleri düşmektedir (Khan ve Panda, 2008). Bitkiler üzerinde tuzluluğun zararlı etkileri verimlilikte azalma veya bitki ölümü olarak tüm bitki seviyesinde gözlenebilmektedir (Murphy ve ark., 2003; Mensah ve ark., 2006). Tuz stresi yoğunluk ve süresine bağlı olarak bitkilerde büyüme, gelişme, çimlenme, hücre bölünmesi, fotosentez gibi bir çok biyolojik olaylara da etki etmektedir (Bressan, 2008).

Domates (*Lycopersicon esculentum*) orta derecede tuza dayanıklı bir bitki olup (Ayers ve Westcot, 1985), tuzlu koşullarda özellikle 8 dS m^{-1} 'den yüksek tuz içeren ortamlarda çimlenme hızı ve yüzdesi ciddi olarak düşmektedir (Cuartero ve Fernandez-Munoz, 1999). Vejetatif gelişme döneminde ise verimde azalma olmaksızın 2.5 dS m^{-1} seviyesinde tuza tolerans göstermektedir (Maas, 1986). Domates için 2.5 dS m^{-1} olan eşik tuzluluk düzeyinin bir birim artışı verimde % 9.9 azalmaya neden olduğu saptanmış, artan tuz konsantrasyonunda domates bitkilerinin kök, gövde ve yaprak kuru ağırlığında azalmaların olduğu tespit edilmiştir (Hoffman ve ark., 1992). Tuz konsantrasyonundaki artış, su ve iyon alımını etkileyerek bitki köklerinde büyüme, fizyolojik ve morfolojik değişimlere sebep olduğu ortaya konmuştur (Hajer ve ark., 2006).

Çimlenme aşamasında ise tuzun etkisi daha belirgin olarak ortaya çıkmakta, çok daha düşük yoğunluktaki tuz konsantrasyonu, çimlenen tohumlarda toksik etki yapmaktadır. Bu aşamada oluşan tepki, türler hatta çeşitler arasında farklı seviyelerde ölçüldüğünden, tuza

dayanıklı ve hassas türleri bu aşamada tespit etmek mümkün olabilmektedir (Dikilitaş, 2003). Çimlenme değerleri ile tuz konsantrasyonları arasındaki ilişkiler probit analiz yöntemine göre yapılmış (Carlson ve ark., 1983) ve tohumların IC_{50} değerleri her bir çeşit için hesaplanmıştır. Probit analiz yöntemi doğrusal ilişki (linear) göstermeyen değişkenler arasındaki regresyonu belirleyen bir yöntemdir. Bu yöntem ile artan tuz konsantrasyonuna karşı, doğrusal olarak azalma göstermeyen yani binominal parabol şeklinde azalma gösteren domates tohumlarının %50'sinin engellendiği tuz konsantrasyonu net bir şekilde belirlenmiştir. Beş farklı domates çeşidinin (SC2121, Falkon, Ayaş, H2274 ve Rio Grande) çimlenme aşamasında fizyolojik ve biyokimyasal tepkileri farklı konsantrasyonlardaki NaCl koşullarında test edilmiş, çeşitlerin tuza dayanıklılık sınırları probit analizi ile belirlenerek elde edilen sonucun biyokimyasal veriler ile karşılaştırılması yapılmıştır. Böylece domates çeşitlerinin farklı tuz konsantrasyonlarına tepkilerini belirlemek ve sınıflandırmak için probit analiz yöntemi ile elde edilen sonuçların güvenilirliği diğer parametreler ile kıyaslanarak bundan sonraki çalışmalarda daha az parametre ile çeşitlerin tepkilerinin değerlendirilmesi hedeflenmiştir.

MATERYAL ve YÖNTEM

Tohumların çimlenmesi

In vitro koşullarda Petri kaplarında beş farklı domates çeşidi tohumları (SC2121, Falkon, Ayaş, H-2274 ve Rio Grande) farklı NaCl (0-, 50-, 100-, 150-, 200-, 250- 300 mM) konsantrasyonlarında her bir Petri kabında 20 adet tohum olacak şekilde 3 tekerrürlü olarak muamele edilmiştir. Çalışmada toplam 105 Petri kullanılmış ve her bir Petri kabı steril edildikten sonra içine su absorbe eden filtre kağıdı yerleştirilmiştir. Petri kaplarındaki domates tohumları 5 ml'lik ilgili tuz solusyonu ile doyurularak, kaplar su kaybının engellenmesi için Parafilm ile sarılmış ve çimlenme periyodu boyunca iki hafta süre ile inkübatör ortamında (24 ± 1 °C) izlenmiştir. Tüm Petri kapları günlük olarak kontrol edilmiş, domates çeşitlerinin günlük çimlenen tohum sayısı belirlenerek çimlenme indeksi tepit edilmiştir. İkinci hafta sonunda ise çimlenen tohumların radikül ve hipokotil uzunluğu (cm), yaş ağırlığı (g) ve çimlenme yüzdesi belirlenmiştir. Tohumların çimlenme indeksi Pujol ve ark. (2000)'na göre, vigor indeksi Hu ve ark. (2005)'na göre hesaplanmıştır. Çimlenme yüzdesi (i), vigor indeksi (ii) ve çimlenme indeksi (iii) aşağıda verilen formüllere göre hesaplanmıştır.

- (i) *Çimlenme yüzdesi (%) = (Çimlenen tohum sayısı/toplam tohum sayısı)x100*
- (ii) *Vigor indeks = Çimlenme yüzdesi x [(radikül uzunluğu + hipokotil uzunluğu)]*
- (iii) *Çimlenme indeksi = Σ (t gününde çimlenen tohum sayısı/ilgili t günü)*

Çeşitler arasında karşılaştırmanın sağlıklı yapılabilmesi için standard hata değerleri de hesaba katılmıştır. IC₅₀ değerleri quadratik analiz yöntemi ile manual olarak hesaplanmış ve elde edilen sonuçlar Statplus 2009 Professional software programı ile de karşılaştırılmıştır. Buna göre IC₅₀ değerleri;

$Y = ax + b$ Tipik bir linear regresyon formülü

$Y = ax^2 + bx + c$ Tipik bir quadratik analiz formülü

$$IC_{50} = \frac{-b - \sqrt{b^2 - 4a(c - 50)}}{2a}$$

$$\text{Standart Hata (IC}_{50}) = \frac{SE\left(\frac{y}{IC_{50}}\right)}{(b + 2aIC_{50})}$$

formülleri ile hesaplanmıştır.

Biyokimyasal parametreler

Prolin analizi

Prolin tayini için bitki ekstraktı ve metodu Bates ve ark. (1973)'na göre yapılmıştır. Acid-ninhydrin karışımı renk maddesi olarak kullanılmıştır. Buna göre, 1.25 g ninhydrin 30 ml glacial asetik asit ve 20 ml 6 M fosforik asit içinde çözülerek reaksiyona girecek karışım hazırlanmış, 0.1 g taze bitki materyali sıvı azot içinde parçalanarak % 3'lük 4 ml sulfosalisilik asit içinde homojenize edilmiştir. Ekstrakt daha sonra filtre kağıdından geçirilerek elde edilen 2 ml'lik karışım, 2 ml'lik asit-ninhidrin çözeltisi ile karıştırılarak 100 °C de 1 saat kaynatılmış ve reaksiyon buz içinde sonlandırılmıştır. Reaksiyon karışımına 5 ml toluen ilave edilerek vortex ile 30 saniye karıştırılmış, iki faz oluşması için bir süre bekletilmiştir. Üst faz mikropipet yardımı ile alınarak absorbans değerleri UV-visible spektrofotometrede (UV

1700, Shimadzu) 515 nm'de saf toluen kontrolüne karşı okunmuştur. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan L-prolin standardı ile örneklerin prolin miktarları belirlenmiştir. Sonuçlar µmol g⁻¹ taze ağırlık olarak ifade edilmiştir.

Peroksidaz enzim analizi (POX, E.C.1.11.1.7)

Peroksidaz ölçümü Cvikorova ve ark. (1994) yöntemine göre yapılmıştır. Yaklaşık olarak 0.1 g bitki materyali 5 ml 50 mM Na-fosfat tampon çözeltisi içinde homojenize edildikten sonra, 100 µl ekstrakt, 3 ml reaksiyon karışımına (13 mM guaiacol, 5 mM H₂O₂ ve 50 mM Na-fosfat, pH 6.5) eklenmiştir. Reaksiyon H₂O₂ ilavesi ile başlatılmış, 25 °C de 2 dakika ara ile 4. dakikaya kadar 470 nm'de UV-visible spektrofotometre (UV 1700, Shimadzu) yardımı ile okunmuştur. Guaiacol'un oksidasyonundan dolayı oluşan artan absorbans değerleri peroksidaz için spesifik bulunan enzim tüketme katsayısı (26.2 mM⁻¹ cm⁻¹) hesaba katılarak ünite mg⁻¹ protein olarak ifade edilmiştir.

Katalaz enzim analizi (CAT, E.C. 1.11.1.6)

Katalaz enzimi *in vitro* ortamda bulunan H₂O₂ tüketiminin 240 nm'de UV spektrofotometre (UV-1700, Shimadzu) ile ölçülmüştür. Reaksiyon karışımı, ilk olarak 0.1 ml enzim ekstraktı ve 2.8 ml 4 mM Na₂EDTA içeren 50 mM Na-fosfat tampon çözeltisi (pH 7.4)'nden oluşmuş ve 0.1 ml 20 mM H₂O₂ ilave edilmesi ile reaksiyon başlatılmıştır. H₂O₂ kullanılmayan karışım kontrol olarak kullanılmıştır. Üç dakika boyunca 1 er dakika ara ile ölçülen absorbans değerleri kaydedilmiş ve sonuçlar enzim tüketim katsayısı (39.4 mM⁻¹ cm⁻¹) yardımı ile hesaplanarak ünite mg⁻¹ protein olarak ifade edilmiştir (Aebi, 1984).

Protein tayini

Örneklerin protein miktarı Coomassie Brilliant Blue G250 method ile 595 nm dalga boyunda UV-visible spektrofotometrede (UV 1700, Shimadzu) ölçülmesi ile belirlenmiştir (Bradford, 1976).

İstatistik analizi

Veriler aritmetik ortalama ± standart hata olarak ifade edilmiştir. Gruplar arası karşılaştırma SPSS programı (Version 11.0) kullanarak tek yönlü varyans analiz yöntemi ve Duncan çoklu karşılaştırma testi kullanarak analiz edilmiştir. P değerinin 0.01 den küçük olduğu durumlar istatistik olarak önemli kabul edilmiştir.

ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA**Tohumların çimlenme ve gelişim durumları**

Domates çeşitlerinden SC2121, Falkon ve Ayaş çeşitleri 50 mM NaCl konsantrasyonunda, çimlenme bakımından kontrol grubundan istatistiksel olarak farklı bulunmamış, Rio Grande ve H2274 çeşitleri ise test edilen bütün NaCl konsantrasyonlarında hassasiyet göstermişlerdir ($P<0.01$). Dört domates çeşidinde 200 mM tuz seviyesinde nispeten çimlenme görülürken H2274 domates çeşidinde hiç çimlenme olmamıştır. Çimlenme açısından H2274 en hassas çeşit olarak bulunmuştur.

Çimlenen tohumlarda radikül ve hipokotil uzunluğu, yaş ağırlığı, çimlenme yüzdesi, vigor indeksi ve çimlenme indeksi değerleri incelendiğinde, artan tuz stresinin çeşitler üzerine olan etkisi anlamlı bulunmuştur

($P<0.01$). Çimlenme oranları yüksek olan çeşitlerin (SC2121, Falkon, Ayaş) radikül ve hipokotil uzunluğu, yaş ağırlık gibi özelliklerinin çimlenme oranı düşük olan çeşitlerden (Rio Grande ve H2274) daha yüksek olduğu görülmüştür. SC2121, Falkon ve Ayaş çeşitleri çimlenme yüzdesi baz alındığında Rio Grande ve H2274'den daha yüksek performans göstermesine rağmen, yaş ağırlık, radikül ve hipokotil uzunluğu ve vigor indeksi değerleri göz önüne alındığında 50 mM NaCl ve üstü dozlarda negatif olarak etkilenmiş, kontrol grubundan istatistiki olarak farklılık göstermiştir. Ancak, SC2121, Falkon, Ayaş çeşitleri yine de tuz stresi altında diğer çeşitlerden daha iyi performans sergilemişlerdir. Farklı NaCl konsantrasyonlarının domates çeşitleri üzerindeki fizyolojik etkileri Çizelge 1'de verilmiştir.

Çizelge 1. Domates çeşitlerinin farklı NaCl konsantrasyonlarında çimlenme aşamasında gösterdikleri fizyolojik gelişim durumları.

Domates çeşidi	NaCl (mM)	Çimlenme oranı (%)	Çimlenen tohum sayısı (adet)	Çimlenme indeksi	Radikül uzunluk (cm)	Hipokotil uzunluk (cm)	Yaş ağırlık (g)	Vigor indeksi
SC2121	0	93.3 ± 3.3a	18.6 ± 0.6a	18.8 ± 0.3a	6.4 ± 0.5a	6.5 ± 1.0a	0.8 ± 0.0a	1212.4 ± 148ε
	50	81.6 ± 1.6a	16.3 ± 0.3a	16.2 ± 0.4b	4.9 ± 0.1b	4.9 ± 0.2b	0.7 ± 0.1b	809.8 ± 39b
	100	58.3 ± 4.4b	11.6 ± 0.8b	11.6 ± 0.4c	3.0 ± 0.1c	3.0 ± 0.1c	0.6 ± 0.0c	354.9 ± 35c
	150	31.6 ± 4.4c	6.3 ± 0.8c	5.4 ± 0.4d	1.1 ± 0.2d	1.1 ± 0.1d	0.3 ± 0.0d	74.4 ± 21d
	200	13.3 ± 1.6d	2.6 ± 0.3d	1.7 ± 0.2e	0.3 ± 0.1e	0.2 ± 0.1d	0.1 ± 0.0e	5.8 ± 1.9d
	250	0.0 ± 0.0e	0.0 ± 0.0e	0.0 ± 0.0f	0.0 ± 0.0e	0.0 ± 0.0d	0.0 ± 0.0e	0.0 ± 0.0d
	300	0.0 ± 0.0e	0.0 ± 0.0e	0.0 ± 0.0f	0.0 ± 0.0e	0.0 ± 0.0d	0.0 ± 0.0e	0.0 ± 0.0d
Falkon	0	93.3 ± 1.6a	18.6 ± 0.3a	16.8 ± 0.1a	4.5 ± 0.1a	4.1 ± 0.4a	0.8 ± 0.0a	808.3 ± 64a
	50	81.6 ± 4.4a	16.3 ± 0.9a	13.4 ± 0.1b	4.3 ± 0.0b	3.4 ± 0.2b	0.6 ± 0.0b	669.2 ± 25b
	100	58.3 ± 4.4b	11.6 ± 0.9b	8.2 ± 0.3c	2.9 ± 0.3c	2.7 ± 0.2c	0.4 ± 0.0c	336.7 ± 50c
	150	31.6 ± 1.6c	6.3 ± 0.3c	3.8 ± 0.2d	1.1 ± 0.0d	1.3 ± 0.2d	0.3 ± 0.0d	76.1 ± 5.1d
	200	10.0 ± 0.0d	2.0 ± 0.0d	1.1 ± 0.1e	0.2 ± 0.0e	0.1 ± 0.0e	0.1 ± 0.0e	2.7 ± 0.3d
	250	0.0 ± 0.0e	0.0 ± 0.0e	0.0 ± 0.0f	0.0 ± 0.0e	0.0 ± 0.0e	0.0 ± 0.0f	0.0 ± 0.0d
	300	0.0 ± 0.0e	0.0 ± 0.0e	0.0 ± 0.0f	0.0 ± 0.0e	0.0 ± 0.0e	0.0 ± 0.0f	0.0 ± 0.0d
Ayaş	0	91.6 ± 1.6 a	18.3 ± 0.3a	16.5 ± 0.3a	6.1 ± 0.0 a	5.3 ± 0.2 a	0.7 ± 0.0a	1042.6 ± 20ε
	50	80.0 ± 5.0 a	16.0 ± 1.0a	14.6 ± 0.8b	5.0 ± 0.2 b	4.4 ± 0.3 b	0.6 ± 0.0b	753.5 ± 17b
	100	66.6 ± 1.6 b	13.3 ± 0.3b	8.2 ± 0.3c	4.0 ± 0.1 c	4.3 ± 0.1b	0.5 ± 0.1c	552.6 ± 19c
	150	20.0 ± 2.8 c	4.0 ± 0.6c	2.9 ± 0.3d	0.2 ± 0.0 d	0.6 ± 0.1 c	0.2 ± 0.0d	15.4 ± 3.2d
	200	12.7 ± 0.0d	2.5 ± 0.0d	1.4 ± 0.2e	0.2 ± 0.0d	0.2 ± 0.0cd	0.1 ± 0.0e	4.0 ± 0.0d
	250	0.0 ± 0.0e	0.0 ± 0.0e	0.0 ± 0.0f	0.0 ± 0.0e	0.0 ± 0.0d	0.0 ± 0.0f	0.0 ± 0.0d
	300	0.0 ± 0.0e	0.0 ± 0.0e	0.0 ± 0.0f	0.0 ± 0.0e	0.0 ± 0.0d	0.0 ± 0.0f	0.0 ± 0.0d
Rio Grande	0	90.0 ± 2.9a	18.0 ± 0.6a	16.9 ± 0.7a	4.5 ± 0.3a	4.1 ± 0.2a	0.5 ± 0.0a	772.4 ± 42a
	50	76.6 ± 1.6b	15.3 ± 0.3b	12.6 ± 0.4b	4.4 ± 0.1b	3.5 ± 0.3b	0.5 ± 0.0b	622.0 ± 31b
	100	61.6 ± 3.3c	12.3 ± 0.6c	12.1 ± 0.9b	4.1 ± 0.3b	3.3 ± 0.3b	0.4 ± 0.0b	459.8 ± 55c
	150	15.0 ± 0.0d	3.0 ± 0.0d	3.4 ± 0.1c	0.1 ± 0.0c	0.1 ± 0.0c	0.1 ± 0.0c	3.5 ± 0.5d
	200	11.6 ± 3.3d	2.3 ± 0.6d	2.4 ± 0.7c	0.1 ± 0.0c	0.1 ± 0.0c	0.0 ± 0.0d	2.3 ± 0.6d
	250	0.0 ± 0.0e	0.0 ± 0.0e	0.0 ± 0.0d	0.0 ± 0.0c	0.0 ± 0.0c	0.0 ± 0.0d	0.0 ± 0.0d
	300	0.0 ± 0.0e	0.0 ± 0.0e	0.0 ± 0.0d	0.0 ± 0.0c	0.0 ± 0.0c	0.0 ± 0.0d	0.0 ± 0.0d
H-2274	0	83.3 ± 3.3a	16.6 ± 0.6a	12.85 ± 0.4a	4.4 ± 0.0a	3.8 ± 0.2a	0.6 ± 0.0a	692.6 ± 38a
	50	65.0 ± 5.8b	13.0 ± 1.2b	9.95 ± 0.6b	4.0 ± 0.3b	3.3 ± 0.1b	0.5 ± 0.0b	514.7 ± 71b
	100	35.0 ± 5.0c	7.0 ± 1.0c	3.92 ± 0.3c	3.5 ± 0.3b	2.8 ± 0.2c	0.4 ± 0.0c	223.3 ± 46c
	150	15.0 ± 0.0d	3.0 ± 0.0d	1.58 ± 0.1d	0.1 ± 0.0c	0.1 ± 0.0d	0.0 ± 0.0d	3.0 ± 0.0d
	200	0.0 ± 0.0e	0.0 ± 0.0e	0.00 ± 0.0e	0.0 ± 0.0c	0.0 ± 0.0e	0.0 ± 0.0e	0.0 ± 0.0d
	250	0.0 ± 0.0e	0.0 ± 0.0e	0.00 ± 0.0e	0.0 ± 0.0c	0.0 ± 0.0e	0.0 ± 0.0e	0.0 ± 0.0d
	300	0.0 ± 0.0e	0.0 ± 0.0e	0.00 ± 0.0e	0.0 ± 0.0c	0.0 ± 0.0e	0.0 ± 0.0e	0.0 ± 0.0d

*Aynı sütündeki birbirinden farklı harflerle gösterilen ortalama değerler ($P<0.01$) önem düzeyinde farklı bulunmuştur. Sonuçlar ortalama (±) standart hata olarak verilmiştir, n=3.

Tuz stresi altındaki tohumların %50'sini engelleyen tuz konsantrasyonu (IC_{50}); SC2121, Falkon ve Ayaş çeşitlerinde sırası ile 123.14-, 121.04-, 121.74 mM NaCl; Rio Grande ve H2274 çeşitlerinde ise 115.96- ve 94.37 mM NaCl olarak bulunmuştur. SC2121 domates çeşidi diğer çeşitlere kıyasla daha iyi performans sergilemiş olması, vigor indeks kriteri göz önüne alındığında ise hafif tuzlu koşullarda iyi bir performans sergilemesi, bu çeşidin tuza olan toleransının daha yüksek olduğunu göstermiştir, Çizelge 2.

Çizelge 2. Domates tohumlarının çimlenmesinin %50'sini engelleyen tuz konsantrasyon (IC_{50}) değerleri

Domates çeşitleri	IC_{50} değerleri
SC2121	123.14
Falkon	121.04
Ayaş	121.74
Rio Grande	115.96
H-2274	94.37

Prolin içerikleri ve antioksidant enzim aktiviteleri

Çimlenen tohumların prolin içeriği, CAT ve POX antioksidant enzim aktiviteleri ve protein miktarları incelendiğinde, artan NaCl konsantrasyonu tüm domates çeşitlerinde kontrole göre artış göstermiş olup, bu artış hassas çeşitlerde (Rio Grande ve H2274) hızlı bir şekilde kaydedilmiş ancak tuz konsantrasyonunun 150 mM seviyesine ulaştığında düşüş trendi göstermiş, sonraki konsantrasyonlarda (200 mM ve üstü) ise örnek alınmadığından enzim aktivitesi belirlenememiştir. Tuza tolerans gösteren çeşitlerde (SC2121, Falkon, Ayaş) ise metabolitlerin artış seyri devam etmiş ancak bu artış 50 mM NaCl'a karşı çeşitlerin gösterdiği tepkiden istatistik olarak farklı bulunmamıştır. Diğer parametrelerde olduğu gibi 50 mM NaCl stresi bütün çeşitlerde

reaksiyona neden olmuş bitkide savunma mekanizmasını harekete geçirmiştir. Çeşitler protein içerikleri bakımından incelendiğinde, tuza dayanıklılık gösteren çeşitlerin (SC2121, Falkon ve Ayaş) protein içeriği 100 mM NaCl seviyesine kadar farklılık göstermez iken diğer çeşitlerin (Rio Grande ve H2274) 50 mM ve üstü tuz konsantrasyonlarında, protein içeriğinde önemli düşüş kaydedilmiştir (Çizelge 3; $P<0.01$). Bu durum hassas çeşitlerin yüksek tuz konsantrasyonlarında enzim sentezleyememesi ile pozitif ilişkili bulunmuştur. Domates çeşitlerinin çimlenme aşamasında potansiyel olarak tuza dayanım sınırlarını belirlemede önemli bir kıstas olan IC_{50} ile vigor indeks değerlerinin belirlenmesi ve bunların protein içeriği ile kıyaslandığında anlamlı bulunması, diğer parametrelere gerek kalmadan çeşitlerin potansiyel dayanım gücü hakkında önemli bir veri arz edecektir.

Çizelge 3. Domates çeşitlerinin çimlenme aşamasında tuz stresine gösterdikleri biyokimyasal tepkiler.

Domates çeşitleri	NaCl (mM)	Prolin $\mu\text{mol g}^{-1}$ taze ağı.	CAT Ünite mg^{-1}	POX Ünite mg^{-1}	Protein mg g^{-1} taze ağı.
SC2121	0	2.43±0.9a	0.15±0.1a	2.27±0.2a	1.37±0.1a
	50	5.20±1.2b	0.52±0.1b	3.44±0.3b	1.23±0.1a
	100	6.60±1.2b	0.91±0.1b	3.95±0.3c	0.93±0.2b
	150	6.85±0.7b	1.74±0.2c	4.61±0.3c	0.85±0.2b
	200	-	-	-	-
	250	-	-	-	-
	300	-	-	-	-
Falkon	0	2.54±1.2a	0.20±0.1a	2.34±0.2a	1.19±0.07a
	50	5.61±1.1b	0.60±0.2b	2.82±0.2b	1.07±0.09a
	100	7.12±1.2b	1.11±0.2c	4.19±0.1c	0.81±0.08b
	150	7.19±1.3b	2.34±0.2c	5.03±0.2c	0.77±0.07b
	200	-	-	-	-
	250	-	-	-	-
	300	-	-	-	-
Ayaş	0	2.45±1.1a	0.25±0.1a	2.17±0.2a	1.12±0.02a
	50	5.56±1.2b	0.56±0.2b	3.38±0.7b	0.98±0.02a
	100	6.82±1.1b	1.25±0.2c	4.34±0.8bc	0.78±0.02b
	150	7.10±1.2b	2.20±0.2d	5.16±0.7c	0.70±0.08b
	200	-	-	-	-
	250	-	-	-	-
	300	-	-	-	-
Rio Grande	0	3.42±1.3a	0.42±0.06a	2.41±0.08a	1.12±0.07a
	50	7.30±1.5b	1.57±0.14b	4.05±0.15b	0.89±0.09b
	100	6.15±1.2b	1.50±0.10c	3.90±0.24c	0.77±0.10b
	150	-	-	-	-
	200	-	-	-	-
	250	-	-	-	-
	300	-	-	-	-
H2274	0	3.50±1.2a	0.50±0.10a	3.30±0.20a	0.95±0.03a
	50	7.58±1.6b	2.05±0.15b	4.24±0.28b	0.82±0.05b
	100	7.10±1.4b	2.01±0.12c	4.10±0.32b	0.74±0.12b
	150	-	-	-	-
	200	-	-	-	-
	250	-	-	-	-
	300	-	-	-	-

* Aynı sütundaki birbirinden farklı harflerle gösterilen ortalama değerler ($P<0.01$) önem düzeyinde farklı bulunmuştur. Standart hata (\pm) olarak, bitki materyali alınmamış kısımlar (-) olarak verilmiştir, n=3.

TARTIŞMA

Artan tuz stresine maruz kalan beş domates çeşidinin çimlenme oranı, yaş ağırlık, kuru ağırlık, radikul ve hipokotil uzunluk, vigor indeks ve çimlenme indeksinde azalma olduğu tespit edilmiştir. Nawaz ve ark. (2012) yapmış oldukları araştırmalarında iki domates çeşidi üzerinde 0-150 mM konsantrasyonlarındaki tuz stresinin çimlenmeyi önemli oranda azalttığını, kök ve gövde yaş ve kuru ağırlıklarda azalmalara neden olduğunu belirlemişlerdir. Tuz stresi genel olarak bitki gelişimini etkilemesine rağmen en büyük etkisi tuzun ilk temas noktası olan köklerde görülmektedir. Ancak çimlenme aşamasında tuz,

çimlenen organizmanın bütününde etkili olduğu için radikul ve hipokotil arasında belirgin bir fark beklemek her zaman mümkün olmayabilir. Artan tuz stresinde en toleranslı çeşit SC2121 olarak belirlenmiş olup tuza tolerans bakımından domates çeşitleri arasında geniş varyasyon olduğu birçok araştırmacı tarafından rapor edilmiştir (Foolad, 1996; Cuartero ve Fernandez-Munoz, 1999; Turhan ve Şeniz, 2009). Cuartero ve Fernandez-Munoz (1999)'a göre tuzlu koşullarda *Lycopersicon esculentum* çeşitleri arasında çimlenme özellikleri bakımından farklılıklar bulunmuş ve bunun genetik farklılıklardan ileri geldiği öne

sürülmüştür. Örneğin, Ashraf (2004) çimlenme yüzdesinde oluşan azalmanın ve çimlenme için geçen sürenin uzamasının tuzun toksik etkisinden kaynaklandığı gibi, ortamda bulunan serbest tuzun osmotik basıncı yükseltmesi yani su potansiyelini azalttığını ifade etmiştir. Bu görüşlere ilave olarak iyon toksisitesinin de çimlenme oranını azaltabilecek potansiyele sahip olduğu öne sürülmüştür (Begum ve ark., 1992; Crosser ve ark., 2001; Essa ve Al-Ani., 2001). Kaplan ve Sönmez (1997), Cuartero ve Fernandez-Munoz (1999) artan tuz konsantrasyonlarının çimlenmeyi geriletmediğini ve yüksek konsantrasyonlarda ise çimlenmenin durduğunu rapor etmişlerdir. Benzer sonuçlar Hajer ve ark. (2006) tarafından rapor edilmiş olup farklı konsantrasyonlardaki deniz suyunun farklı domates çeşitleri (Turust, Grace, Plitz) üzerinde farklı etkiye sahip olduklarını bildirmişlerdir.

Çalışmamızda çimlenen tohumlarda yapılan biyokimyasal analiz son

uçları incelendiğinde artan tuz stresine bağlı olarak prolin ve antioksidant enzim (CAT ve POX) içeriklerinin arttığı, protein içeriklerinin ise azaldığı dikkati çekmiştir. Bitkiler oksidatif zararın yol açtığı yıkıcı etkilerden korunmak için, değişik miktarlarda antioksidanlara ve antioksidatif enzimlere sahiptir (Asada ve Takahashi, 1987). Koruyucu mekanizmalar bu zararlı reaksiyonların etkilerini en aza indirebilecek şekilde çalışmaktadırlar. Bu savunma hem enzimatik hem de enzimatik olmayan mekanizmaları kapsamaktadır (Scandalios, 1997; Dikilitaş ve Karakaş, 2010). Böylece, stres reaksiyonları sonucu oluşan O_2 , OH iyonları daha az toksik olan H_2O_2 molekülüne dönüşmekle, membran geçirgenliği azaltılmaktadır (Li, 2009). Yine yüksek oranda biriken H_2O_2 molekülü ise özellikle CAT enzimi tarafından parçalanarak düşük konsantrasyon seviyesine indirilmekte, buradaki düşük yoğunluklu H_2O_2 molekülleri ise POX ile zararsız moleküllere dönüştürülmektedirler. Strese bağlı olarak prolin miktarında meydana gelen artış, amino asit sentezindeki artış ile ilgili olduğu öne sürüldüğü gibi protein yapısının parçalanması ile de prolin konsantrasyonunda artış rapor edilmiştir (Dikilitaş ve Karakaş, 2012). Tuz stresi nedeni ile enzim sentezinin olumsuz etkilenmesi birçok çalışmada protein sentezinin azalması ile ilişkili bulunmuş, azalan protein içeriği enzim sentezine de doğrusal olarak yansımıştır (Robinson ve ark., 1983; Tuna ve ark., 2008; Li, 2009). Tuzluluk, çimlenen tohumların çeşitleri göz önüne alınmaksızın fizyolojik ve biyokimyasal parametrelerinde olumsuz etkilere yol açmış, çimlenme yüzdesini düşürdüğü gibi çimlenme için geçen süreyi de uzatmıştır. Çeşitler arasında

farklılıklar görülmüş, ayırt edici özellikler olarak birçok parametre kriter olarak öne sürülmesine rağmen en kısa ve çeşitler arasında farklılığı ortaya koyacak kriterlerden birisinin çimlenen tohumların protein içeriği olabileceği tartışılmıştır. Böylece farklı konsantrasyonlarda elde edilen çimlenme yüzdeleri ilgili konsantrasyona karşılık gelen protein içerikleri ile kıyaslanmak sureti ile çeşitlerin dayanıklılık durumları ortaya konmuştur.

AÇIKLAMA

Bu çalışmanın bir bölümü sorumlu yazarın doktora tezinden alınmıştır. Çalışmada elde edilen biyokimyasal veriler bu çalışmanın devamı neticesinde Dr. Murat Dikilitaş ile yapılarak tez dışı laboratuvar çalışmalarından elde edilmiştir.

KAYNAKLAR

- Aebi, H., 1984. Catalase in Vitro. Method Enzym 105: 121-126.
- Asada, K and Takahashi, M., 1987. Production and scavenging of active oxygen in chloroplasts. In DJ Kyle CB Osmond, CJ Arntzen, eds, Photoinhibition. Elsevier Amsterdam, pp 227-287.
- Ashraf, M., 2004. Some Important Physiological Selection Criteria for Salt Tolerance in Plants. Flora, 199: 361-376.
- Ayers, R S and Westcot D W., 1985. Water quality for Agriculture. Irrigation and Drainage Paper 29, FAO, Rom. p. 174.
- Bates, L S., Waldren, R P., and Teare, I D., 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. Plant And Soil 39: 205-207.
- Begum, F., Karmoker, J., Fattach, Q. and Maniruzzaman, A., 1992. The effects of salinity on germination seeds of *Triticum aestivum* L. cv. Akbar. Plant Cell Physiol, 33: 1009-1014.
- Bradford, M M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, Anal Biochem, 72, 248-254.
- Bressan, R A., 2008. Stres fizyolojisi. Palme yayıncılık, Ankara, 591-620
- Carlson, J R., Ditterline, R L., Martin, J M., Sands, D C and Lund, R E. 1983 Alfalfa seed germination in antibiotic

- agar containing NaCl. *Crop Sci.* 23, 882–885.
- Croser, C., Renault, S., Franklin, J and Zwiak, J., 2001. The effect of salinity on the emergence and seedling growth of *Picea mariana*, *Picea glauca* and *Pinus banksiana*. *Environ Pollut*, 115: 9-16.
- Cuartero, J. and Fernandez-Munoz, R., 1999. Tomato and salinity. *Scienta Horticulture*, 78: 83–125.
- Cvikorova, M M., Hrubcova, M., Vagner, I., Machackova And J., Eder 1994. Phenolic Acids And Peroxidase Activity In Alfalfa (*Medicago Sativa*) Embryogenic Cultures After Ethephon Treatment. *Physiologia Plantarum*, 91:226-233.
- Dikilitaş, M and Karakaş, S., 2010. Salt as Potential Environmental Pollutants, Their Types, Effects on Plants, and Approaches for Their Phytoremediation. *Plant Adaptation and Phytoremediation* (Edited by M. Ashraf, M. Ozturk, M.S.A. Ahmad). Springer Dordrecht, Heidelberg, London, New York, 357-383.
- Dikilitaş, M. 2003. Effect of salinity & its interactions with *Verticillium albo-atrum* on the disease development in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) and Lucerne (*Medicago sativa* & *M. media*) plants. Ph.D. Thesis, University of Wales, Swansea.
- Dikilitaş, M. and Karakaş, S., 2012. Behaviour of Plant Pathogens for Crops under Stress during the Determination of Physiological, Biochemical and Molecular Approaches for Salt Stress Tolerance Chapter 16. *Crop Production for Agricultural Improvement* (Eds. Muhammad Ashraf), Springer Publ., Heidelberg, London, New York, pp 417-441.
- Essa, A T. and Al-Mani, D H ., 2001. Effect of salt stress on the performance of six soybean genotypes. *Pak. J. Biol. Sci.* 4: 175-177.
- Foolad, M. R., 1996. Genetic analysis of salt tolerance during vegetative growth in tomato, *Lycopersicon esculentum* Mill. *Plant Breed*, 115: 245–250.
- Hajer, A S., Malibari, A A., Al-Zahrani, H S., and Almaghrabi, O. A., 2006. Responses of three tomato cultivars to sea water salinity 1. Effect of salinity on the seedling growth. *African Journal of Biotechnology*, 5(10):855-861.
- Hoffman, G J., Howell, T A. and Solomon, K H., 1992. Management of farm irrigation systems. *ASAE Monograph*, no: 9
- Hu, Y., Schmidhalter, U., 2005. Drought and Salinity: A Comparison of their Effects on Mineral Nutrition of Plants. *J. Plant Nutr. Soil Sci.*, 168: 541–549.
- Khan, M H. and Panda, S K., 2008. Alterations in root lipid peroxidation and antioxidative responses in two rice cultivars under NaCl-salinity stress. *Acta Physiol Plant* 30: 81–89
- Li, Y., 2009. Physiological responses of tomato seedlings (*Lycopersicon esculentum*) to salt stress. *Modern Appl. Sci.*, 3(3): 171-176.
- Maas, E W., Poss, J.A. And Hoffman, G J., 1986. Salinity sensitivity of sorghum at three growth stages. *Irrigation Science*.
- Mengel, K., Kirkby, E A., Kosegarten, H., Appel, T., 2001. Principles of plant nutrition. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands
- Mensah, J K., Akomeah, P A., Ikhajagbe, B. and Ekpekurede, E O., 2006. Effect of salinity on germination, growth and yield of five groundnut genotypes. *Afr. J. Biotechnol.* 20, 1973–1979.
- Murphy, K S T. and Durako, M J., 2003. Physiological effects of shortterm salinity changes on *Ruppia maritima*. *Aquat. Bot.* 75, 293–309.
- Nawaz, A., Amjad, M., Jahangir, M M., Khan, S M., Cui, H., and Hu, J., 2012. Induction of salt tolerance in tomato seeds through sand priming. *AJCS* 6 (7):1199-1203.
- Okhovatian-Ardakani, A., Mehrabani, M., Dehghani, F., Ak-Barzadeh, A., 2010. Salt tolerance evaluation and relative comparison in cuttings of different pomegranate cultivars. *Plant, Soil Environ* 56: 176–185
- Pujol, J A, Calvo, J F. and L. Ramirez-Diaz., 2000. Recovery of germination from different osmotic conditions by four halophytes from Southeastern Spain. *Ann Bot.* 85:279–286.
- Rivero, M R., Ruiz, J.M. and Romero, L., Role of grafting in horticultural plants under stress conditions, *Food, Agriculture and Environment*, 1, 1, 70-74, 2003.
- Robinson, S P., Downton, W J S. and Millhouse, J. A., 1983. Photosynthesis and ion content of leaves and isolated chloroplasts of salt-stressed Spinach. *Plant Physiology*, 73 (2), 238-242

- Scandalios, J., Guan, L., Polidoros, A., 199). Oxidative stress and the Molecular biology of antioxidant defenses. *Cold spring Harbor Lab. Press Planvies NY*. 343-406.
- Tuna, A L, Kaya, C., Dikilitas, M and Higgs, D ., 2008. The combined effects of gibberellic acid and salinity on some antioxidant enzyme activities, plant growth parameters and nutritional status in maize plants. *Environmental and Experimental Botany* 62, 1-9.
- Turhan, A., Seniz, V and Kuscu, H., 2009. Genotypic variation in the response of tomato to salinity. *African Journal of Biotechnology*, 8(6):1062–1068.