

T.C İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

**SOYA FASULYESİNDE (*Glycine max* (L.) Merrill) DREB
TRANSKRİPSİYON FAKTÖRÜ VE KURAKLIK STRESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Esra EŞİYOK

2000002632

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Program: Moleküler Biyoloji ve Genetik Yüksek Lisans

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Çimen ATAĞ

EKİM 2023

T.C İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

**SOYA FASULYESİNDE (*Glycine max* (L.) Merrill) DREB
TRANSKRİPSİYON FAKTÖRÜ VE KURAKLIK STRESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Esra EŞİYOK

2000002632

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Program: Moleküler Biyoloji ve Genetik Yüksek Lisans

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Çimen ATAK

Jüri Üyeleri: Dr. Öğretim Üyesi Alp Ayan

Dr. Öğretim Üyesi Orkun Yayıcı

EKİM 2023

ÖNSÖZ

Çalışma sürecinde her türlü yol gösterici olan, olumlu tavırlarıyla beni cesaretlendiren, bilgi birikimiyle çalışmama farklı açılardan bakmamı sağlayan beraber çalışmaktan ve her zaman öğrencisi olmaktan gurur duyduğum Sayın değerli hocam Prof. Dr. Çimen ATAK’a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Deneylerim sırasında bana destek olan, beni tecrübeleri ile yönlendiren ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen Sayın Arş. Gör. Tamer GÜMÜŞ’e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tüm hayatım boyunca benim yanımda olan, aldığım kararları her zaman destekleyen, sadece bu çalışma sürecinde değil tüm hayatım boyunca beni cesaretlendiren ve moral veren annem Hillal KILINÇ’a, babam Orhan EŞİYOK’a ve kardeşim Şevval EŞİYOK’a sonsuz şükranlarımı sunar ve teşekkür ederim.

Ekim, 2023

Esra EŞİYOK

Bu çalışma BAP-2208 ile T.C İstanbul Kültür Üniversitesi tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR.....	v
TABLO LİSTESİ	vii
ŞEKİL LİSTESİ	viii
SİMGE LİSTESİ.....	x
ÖZET.....	xii
ABSTRACT	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Soya Fasulyesi (<i>Glycine max.</i> (L.)Merr.).....	5
2.2. Kuraklık Stresi ve Bitkilerin Kuraklık Stresine Verdikleri Cevaplar	10
2.2.1. Kuraklığın Bitki Morfolojisinde Meydana Getirdiği Değişiklikler ...	13
2.2.2. Fizyolojik Tepkiler	14
2.2.3. Biyokimyasal Tepkiler	16
2.2.4. Moleküler Mekanizmalar	17
2.2.5. Hormonal Denge	18
2.2.6. İyon Homeostazı	21
2.2.7. Antioksidan Moleküller	23
2.3. Transkripsiyon Faktörleri	25
2.3.1. DREB Transkripsiyon Faktörleri	27
2.3.2. SNP (Tek Nükleotit Polimorfizmi)	33
3. MATERYAL VE METOD.....	35
3.1. Bitkilerin İn – Vivo Ortamda Yetiştirilmesi	35

3.2.	Malondialdehid Miktarı Tayini (MDA)	38
3.3.	Prolin Konsantrasyon Tayini	38
3.4.	Genomik DNA İzolasyonu	39
3.5.	RNA İzolasyonu	39
3.6.	cDNA Sentezi	40
3.7.	Gradient PCR	41
3.8.	Hedef Genlerin İfade Analizinin qRT-PCR ile Gösterilmesi	42
3.9.	Agaroz Jelden DNA Ekstraksiyonu	45
3.10.	SNP Analizi	45
3.11.	İstatiksel Analizler	45
4.	BULGULAR	46
4.1.	Soya Fasulyesi Kuraklık Stresi Etkilerinin Tespiti	46
4.2.	Malondialdehid Miktarı Tayini	50
4.3.	Prolin Konsantrasyonu Tayini	52
4.4.	Gradient PCR sonuçları	53
4.5.	Hedef Genlerin İfade Analizinin qRT-PCR ile Gösterilmesi	54
4.6.	SNP Analizi	57
5.	TARTIŞMA VE SONUÇ	62
6.	KAYNAKÇA	72

KISALTMALAR

FAO:	Gıda Tarım Örgütü (Food and Agriculture Organization)
ABA:	Absisik Asit
DREB:	Dehidrasyona duyarlı element bağlayıcı proteinler
MAPK:	Mitojenle aktive edilen protein kinaz
CDPK:	Kalsiyuma bağımlı protein kinazlar
ROS:	Reaktif Oksijen Türevleri
TF:	Transkripsiyon Faktörü
AP2/ERF:	APETALA2/etilene duyarlı faktör
JA:	Jasmonik asit
IAA:	İndol asetik asit
GA:	Gibberellik asit
SA:	Salisilik asit
PA:	Fosfatidik asit
GR:	Glutasyon reduktaz
DHAR:	DehidroStomal redüktaz
MDHAR:	Monodehidroaskorbat redüktaz
GSH:	Glutasyon
CAT:	Katalaz
APX:	Askorbat peroksidaz
GR:	Glutasyon reduktaz
SOD:	Süperoksit dismutaz
POD:	Peroksidaz

UV: Ultraviyole ışınları
GOD: Glukoz oksidaz
qRT-PCR : Gerçek zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu



TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1. Soya fasulyesi vejetatif gelişim aşamaları (Fehr ve Cavinnes, 1977).....	6
Tablo 2.2. Soya fasulyesi generatif gelişim aşamaları (Fehr ve Cavinnes, 1977).....	7
Tablo 2.3. Farklı bitkilerden izole edilen DREB genleri ve çeşitli abiyotik streslere transkript tepkileri *cbf1: dreb1b, cbf2: dreb1c, cbf3: dreb1a; (*) sürekli ekspresyon; (-) çalışılmamış (Agarwal vd., 2006).	30
Tablo 3.1. Hoagland besin solüsyonu içeriği ve miktarları (Hoagland ve Arnon 1950).	37
Tablo 3.2. cDNA PCR amplifikasyon koşulları.	40
Tablo 3.3. DREB genlerine ait belirlenen primer dizileri.....	41
Tablo 3.4. Gradient PCR protokolü	42
Tablo 3.5. qRT-PCR Amplifikasyonu döngü sıcaklık, süre ve sayıları.	43
Tablo 3.6. Standart örneklerinin konsantrasyon değerleri.	44
Tablo 4.1. Soya fasulyesi ortalama bitki boyu(cm), kök uzunluğu(cm) ve yaş ağırlığı(g).....	47
Tablo 4.2. Kuraklık stresinin soya fasulyesi bitkisi boy(cm), kök uzunluğu(cm), yaş ağırlığı(g) üzerindeki etkileri.	47
Tablo 4.3. Kuraklık stresinin soya fasulyesi MDA oranlarına etkisi.....	50
Tablo 4.4. Kuraklık stresinin soya fasulyesi Prolin miktarı oranlarına etkisi.....	52
Tablo 4.5. ELF1b, DREB1 ve DREB2 gen bölgelerinden elde edilen Ct değerleri..	55

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.1. 1994-2021 yılları Dünya genelinde soya fasulyesi üretiminin ülkelere göre dağılımları (FAO, 2021).	1
Şekil 2.1. Soya fasulyesi gelişim aşamaları. VE: Ortaya çıkış. VC: Kotiledon. V1: İlk boğum. V2: İkinci boğum. R1: Çiçek açma R2: Tam çiçeklenme R3: Başlangıç tohum zarfı R4: Dolu tohum zarfı R5: Başlangıç tohumu R6: Tam tohum. R7: Olgunluk başlangıcı. R8: Tam olgunluk (Stowe ve Vann, 2022).	8
Şekil 2.2. Kuraklığın soya fasulyesi üzerindeki çeşitli etkileri (Arya vd., 2021).	11
Şekil 2.3. Kuraklığa duyarlı gen ifadesinin düzenlenmesi. ABA bağımlı ve bağımsız yollar (Saleh vd., 2005).	20
Şekil 2.4. Abiyotik stres faktörleriyle başa çıkmak için hücrel redoks dengesini korumaya yönelik bitki antioksidan potansiyeli. AO = Antioksidanlar; ROS = Reaktif Oksijen Türleri.	24
Şekil 2.5. Abiyotik stres sinyallerinin transkripsiyonel düzenleyici ağları ve gen ifadesi. ABA: Absisik asit, JA: Jasmonatlar, DREB: Dehidrasyona duyarlı element bağlayıcı, MYB: Miyeloblastoz, NAC: N -asetil- L -sistein (Jan vd., 2017).	27
Şekil 2.6. DREB proteinleri, ABA, ET, JA, GA ve CK sinyalleri aracılığıyla bitki büyümesine ve gelişmesine ve abiyotik strese yanıt modeline aracılık eder. ABA sinyali, DREB geninden bağımsız olarak soğuk stresine yanıt verebilir ve kuraklık stresi altında DREB proteinlerini düzenleyebilir. Absisik asit (ABA), etilen (ET), jasmonat (JA), gibberellin (GA) ve sitokinin (CK) (Zhang ve Xia, 2023).	29
Şekil 3.1. Soya fasulyesi bitkilerine ait kontrol grubu bitkileri.	36
Şekil 3.2. Soya fasulyesi bitkilerine ait 7. gün kuraklık stresi bitkileri.	36
Şekil 3.3. Hedef gen ifadelerinin kontrol gen ifadesine göre değişimi (Pfaffle, 2001).	44
Şekil 4.1. Kuraklık stresinin soya fasulyesi bitki boyları üzerindeki etkisi.	48
Şekil 4.2. Kuraklık stresinin soya fasulyesi bitki kök uzunluğu üzerindeki etkisi. ...	48
Şekil 4.3. Kuraklık stresinin soya fasulyesi bitki yaş ağırlıkları üzerindeki etkisi. ...	49

Şekil 4.4. Kontrol ve Kuraklık stresi uygulanan soya fasulyesi MDA oranları. Farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklılıklar, 0.05 seviyesinde önemlidir. .	51
Şekil 4.5. Kuraklık stresinin soya fasulyesi prolin konsantrasyonları üzerine etkileri. Farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklılıklar, 0.05 seviyesinde önemlidir.	53
Şekil 4.6. 60-61-62 °C’de kurulan Gradient PCR çalışma sonucu.	54
Şekil 4.7. DREB1 geni Kontrol ve Kuraklık grubundaki gen ekspresyon seviyelerindeki değişim.	56
Şekil 4.8. DREB2 geni Kontrol ve Kuraklık grubundaki gen ekspresyon seviyelerindeki değişim.	56
Şekil 4.9. DREB1 1. gün kontrol (A) ve stres (B) grubu arasındaki diziler. Kontrol grubunda 109. amino asit aspartik asitten asparajin olmuştur. Stres grubu dizilerine bakıldığında ise 121. amino asit alanin treonin’e dönmüştür.	58
Şekil 4.10. DREB1 3. gün kontrol (A) ve stres (B) grubu arasındaki diziler. Kontrol ve stres grubu arasındaki dizilere bakıldığında bir baz kaybı olduğu ve 39. amino asit arjinin, glutamik aside dönüşmüştür.	59
Şekil 4.11. DREB1 7. gün kontrol (A) ve stres (B) grubu SNP analizleri. Kontrol ve stres grubu dizi analizlerinde 30. aminoasit aspartik asitten glutamik aside dönüşmüştür ve eklenmesi sonucu 31. amino asit sonrası çerçeve kayması gerçekleşmiştir.	60
Şekil 4.12. DREB2 1. gün kontrol (A) ve stres (B) grubu SNP analizleri. Kontrol ve stres grubu dizi analizlerinde herhangi bir değişim saptanmamıştır.	61

SİMGE LİSTESİ

%:	Yüzde değeri
dS m⁻¹:	DesiSiemens/metre
RCF:	Göreceli Santrifüj Kuvveti
Na⁺:	Sodyum iyonu
Cl⁻:	Klorür iyonu
K⁺:	Potasyum iyonu
H⁺:	Hidrojen iyonu
O₂:	Oksijen molekülü
H₂O₂:	Hidrojen peroksit
H₂O:	Su molekülü
NaCl:	Sodyum klorür
N:	Nitrojen
V:	Vejetatif gelişim
R:	Generatif gelişim
N:	Azot
P:	Fosfor
K:	Potasyum
Ca:	Kalsiyum
CO₂:	Karbondioksit
CH₂:	Metilen
mM:	Mili molar
C₂H₂:	Asetilen

bZIP:	Temel lösin fermuar geni
WRKY:	WRKY Transkripsiyon faktör
MYB:	Transkripsiyon faktör MYB
AP2:	Etilene duyarlı element bağlayıcı protein
NAC:	Azot asimilasyonu düzenleyici protein
DREB:	Dehidrasyona duyarlı element bağlayıcı protein
V14:	14. valin
E19:	19. glutamik asit
GA:	Gibberellinler
CK:	Sitokininler
ET:	Etilen
NO:	Nitrik oksit
Na:	Sodyum
Cl:	Klor

ÖZET

Bu tez kapsamında ülkemizde ekimi yaygın olarak yapılan Ataem-07 soya çeşidinin kuraklık stresi altında kuraklıkla ilişkisi belirlenen DREB genlerinin, kuraklık stresindeki ifadelerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Karadeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'nden temin edilen Ataem-07 soya çeşidi tohumları T.C İstanbul Kültür Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Bitki Biyoteknolojisi Laboratuvarı'nda Hoagland besin solüsyonu verilerek 14 gün boyunca optimum koşullarda yetiştirilmiştir. Yetiştirilen bitkiler 1, 3, 5, 7. gün kuraklık stresine maruz bırakılmıştır.

Hasadı gerçekleştirilen bitkilerin, ortalama boy, kök uzunluğu ve yaş ağırlığı tespit edilmiştir. Kuraklık stresi altında bitkilerin biyokimyasal cevaplarını belirlemek amacı ile MDA ve prolin miktarı saptanmıştır. Elde edilen tüm sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Ayrıca gen ifadelerindeki değişimleri karşılaştırmak amacı ile RNA izolasyonu yapılmış ardından cDNA reaksiyonu gerçekleştirilmiş ve Real-Time PCR analizi yapılmıştır. Elde edilen veriler soya fasulyesi kontrol grubu ve kuraklık stresine maruz kalan bitkiler arasında karşılaştırılmıştır.

Sonuç olarak yapılan bu çalışmada seçilen Ataem-07 soya fasulyesi bitkisinde kuraklık stresinde belirlediğimiz DREB genlerinde, DREB1'in 1. gününde, DREB2'de 1. ve 7. günlerde ifadelerinde artış gözlenmiştir. Ayrıca bu çeşitteki DREB1 ve DREB2 transkripsiyon faktörleri ile ilgili SNP'ler ele alınmıştır.

Anahtar kelimeler: *Glycine max (L.) Merrill*, kuraklık stresi, DREB transkripsiyon faktörleri

ABSTRACT

Within the scope of this thesis, it was aimed to examine the expressions of DREB genes, which were determined to be related to drought under drought stress, of the Ataem-07 soybean variety, which is widely cultivated in our country, under drought stress. Ataem-07 soybean variety seeds obtained from the Black Sea Agricultural Research Institute were grown in optimum conditions for 14 days by giving Hoagland nutrient solution in the Plant Biotechnology Laboratory of Istanbul Kültür University Molecular Biology and Genetics Department. Grown plants 1, 3, 5, 7. day was exposed to drought stress.

Plant height, root length and fresh weight of the harvested plants were determined. In order to determine the biochemical responses of plants under drought stress, lipid peroxidation and proline amount were determined. All the results obtained were statistically significant. In addition, in order to compare the changes in gene expressions, RNA isolation was performed, then cDNA reaction was performed and Real-Time PCR analysis was performed. The obtained data were compared between soybean control group and plants exposed to drought stress.

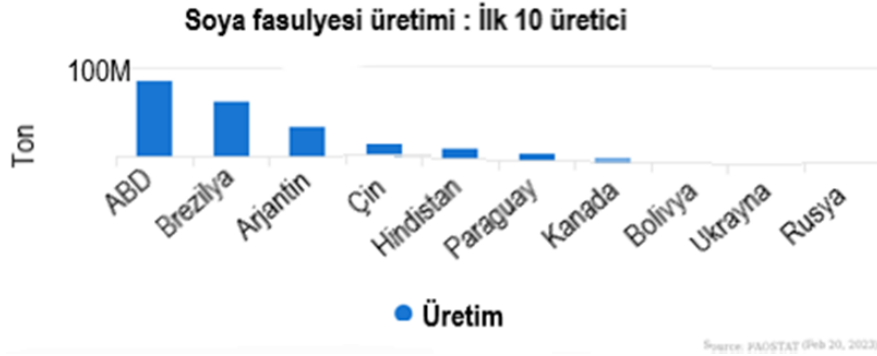
As a result, in this study, an increase was observed in the expression of the DREB genes we determined in the selected Ataem-07 soybean plant under drought stress, DREB1 on the 1st day, and DREB2 on the 1st and 7th days. Additionally, SNPs related to the DREB1 and DREB2 transcription factors in this variety were discussed.

Keywords: *Glycine max (L.) Merrill*, drought stress, DREB transcription factors

1. GİRİŞ

Soya fasulyesi (*Glycine max* (L.) Merr.), Asya kökenli bir bitkidir. Dünya çapında üretilen en önemli, en ucuz bitkisel protein ve yağlı tohum kaynaklarından biridir (SoyStats, 2017). Soya fasulyesi, tüm esansiyel amino asitleri içeren bir bitki bazlı protein kaynağı olmasının yanı sıra ayrıca lif, demir, kalsiyum, fosfor ve B vitamini gibi birçok besin ögesi içermektedir. Bu nedenle, özellikle vegan ve vejetaryen diyetlerinde, hayvansal ürünlerin yerini alabilecek önemli bir alternatif protein kaynağı olarak görülmektedir. Soya fasulyesi, gıda, yem, ilaç ve diğer endüstriyel ürünlerin üretiminde geniş bir kullanım alanına sahiptir. Ayrıca soya fasulyesi tohumundan elde edilen yağ, biyodizel üretiminde kullanılmaktadır (Ali, 2010).

Dünyadaki soya fasulyesi üretimine bakıldığında Gıda Tarım Örgütü'nün (FAO) Şekil 1.1'de gösterilen verilerine göre; dünyada ABD (87 milyon ton), Brezilya (65 milyon ton), Arjantin (37 milyon ton), Çin (14 milyon ton), Hindistan (9 milyon ton) en önemli üretici ülke konumundadır (FAO, 2021).



Şekil 1.1. 1994-2021 yılları Dünya genelinde soya fasulyesi üretiminin ülkelere göre dağılımları (FAO, 2021).

Ülkemizde ise FAO, 2021 verilerine göre; 43.885 ha alanda hasat gerçekleştirilmiş olup 182.000 bin ton soya fasulyesi üretimi yapılmıştır.

Kuraklık, dünya çapında tarımsal üretimi tehdit eden en önemli sorunlardan biridir. 21. yy’da ülkemizin de içerisinde yer aldığı Doğu Akdeniz bölgesinde, iklim değişikliği sonucunda kuraklık şiddetinin ve sıklığının artması beklenmektedir. Bu artış sebebiyle Akdeniz bölgesinde geniş alanların etkileneceği düşünülmektedir (Tramblay vd., 2020). Yeryüzündeki birçok ülke gibi Türkiye'nin tarım üretimi ve verimliliği de bu iklim değişikliğinden önemli ölçüde etkilenmiştir. İklım değişikliği Türkiye'de kuraklık, sel, toprak erozyonu, lleşme ve tarım alanlarının azalması gibi sorunlara yol açmaktadır. Kuraklık nedeniyle, tarım arazilerinde su kıtlığı yaşanmakta ve tarım verimliliği düşmektedir (Partigöç ve Soğancı, 2019).

Abiyotik stres koşulları, bitkilerin fiziksel veya kimyasal olarak değişen evre koşullarına uyum sağlamak zorunda kaldıkları durumlardır. Bunlar arasında yüksek sıcaklık, düşük sıcaklık, kuraklık, tuzluluk, aşır ışık, yüksek radyasyon ve ağır metal kirliliği gibi faktörler sıralanabilir. Abiyotik stresler bitkiler üzerinde çeşitli etkilere sebep olabilir ve bitkilerin büyümesini, gelişimini ve verimini olumsuz yönde etkileyebilir (Canter 2018, Zrb vd., 2019).

Kuraklık, bitkiler üzerinde önemli bir abiyotik stres faktörüdür ve büyüme sürecinde ana kısıtlayıcı faktörlerden biridir. Kuraklık dönemlerinde topraktaki nem oranı düşer ve bitkilerin su ihtiyaını karşılayacak kadar su bulması zorlaşır. Bu da bitkilerin çimlenme, büyüme, gelişme ve üreme süreçlerini olumsuz etkiler. Kuraklık stresi altında bitkiler, maruz kaldıkları stresi en aza indirmek için morfolojik, yapısal değişiklikler, hormonların sentezi, ozmotik düzenleyici maddeler ve kuraklığa duyarlı genlerin ekspresyonu gibi tepki mekanizmalarını etkinleştirirler. Bu mekanizmalar içerisinde bitkilerde morfolojik olarak özellikle kökler, yapraklar, gövdeler ve diğer bitki parçaları, kuraklık stresine yanıt olarak belirli değişiklikler gösterirler. Bu morfolojik değişiklikler, bitkilerin kuraklığa uyum sağlamasına yardımcı olan ve bitkilerin hayatta kalmasını sağlayan mekanizmalardır.

Yapraklarda gerçekleşen morfolojik değişimler, su kaybını azaltmaya yöneliktir. Bunun yanı sıra, yaprakların yüzey alanı azalabilir veya daha kalın bir yaprak dokusu oluşabilir. Köklerde gerçekleşen morfolojik değişimler ise, topraktan daha fazla su alınmasına yöneliktir. Bu mekanizmalar arasında daha uzun köklerin gelişmesi, daha

fazla sayıda saçak kökünün oluşması veya köklerin kalınlaşması da yer almaktadır (Yılmaz, Kısakürek, 2020 ve Yang vd., 2021).

Kuraklık stresi altında bitkiler bir dizi biyokimyasal ve fizyolojik tepki gösterirler. Bu tepkiler arasında, bitkilerin kuraklığa karşı dirençlerini arttırmak için gen ekspresyonunun değişmesi de yer almaktadır. Kuraklık stresi, bitkilerde birçok sinyal yolunu aktive eder. Bu sinyal yolları arasında, absisik asit (ABA) sinyal yolu, etilen sinyal yolu, salisilik asit sinyal yolu gibi yollar yer alır. Bu sinyal yolları, bitki hücrelerindeki belirli reseptörlere bağlanarak, transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu ile sonuçlanan bir dizi moleküler sinyal iletimi yoluyla birlikte çalışarak, stres koşullarına cevap vermek için gen ekspresyonunu değiştirirler. Bu değişiklikler, kuraklığa dayanıklılık için kritik olan çeşitli genlerin transkripsiyonunu düzenler. Yeni nesil dizileme teknolojileri, DNA dizilerini hızlı ve verimli bir şekilde analiz etmek için kullanılır. Bu teknolojiler, bitki genomlarındaki kuraklığa duyarlı transkripsiyon faktörleri, bitki hormonları ile ilgili genler gibi kuraklığa yanıt veren genlerin tanımlanmasına yardımcı olabilir (Muthusamy M. vd., 2016, Singh D. vd., 2017, Shi vd., 2019, You vd., 2019).

Kuraklık toleransı, bitkilerin stresli koşullara adaptasyonunu içeren karmaşık bir süreçtir. Bu süreçte, DNA metilasyonu da önemli bir rol oynamaktadır. DNA metilasyonu, DNA moleküllerinde meydana gelen bir kimyasal modifikasyondur. Bitkilerde özellikle DNA metilasyonu, gen ekspresyonunu düzenleyerek, genlerin baskılanması veya uyarılması yoluyla bitki büyümesi ve gelişimini kontrol eder.

Bu nedenle, bitkilerin DNA metilasyon desenleri, bitkilerin büyüme ve gelişmesinin yanı sıra stres toleransı ve adaptasyonlarının da anahtar belirleyicilerindendir. Bitkilerin kuraklık toleransını arttırmak için, DNA metilasyon düzeylerinin değiştirilmesi bir strateji olarak kullanılabilir (Zhu vd., 2002 ve Hirayama vd., 2010, R Reinders vd., 2009).

Transkripsiyon faktörleri, genlerin ekspresyonunu düzenleyen proteinlerdir. Bu proteinler, DNA'ya bağlanarak genlerin transkripsiyonunu etkilemektedir. DNA metilasyonu, transkripsiyon faktörlerinin DNA'ya bağlanmasını engelleyebilir veya

destekleyebilir. Bu, gen ekspresyonunu etkileyerek hücrelerin farklılaşmasını ve gelişimini etkileyebilmektedir. Dehidrasyona duyarlı element bağlayıcı proteinler (DREB), bitkilerde abiyotik stres (kuraklık stresi, soğuk stresi, tuz stresi vb.) koşullarında önemli rol oynayan transkripsiyon faktörleridir. DREB faktörleri, bitkilerin gen ekspresyonunu kontrol eden DNA dizileri olan dehidrasyon-duyarlı element (DRE) olarak bilinen belirli bir diziye bağlanmaktadır. DREB transkripsiyon faktörleri, bitki hücrelerinde DREB genlerinin transkripsiyonunu artırarak stres cevabı sırasında bazı önemli proteinleri etkinleştirmektedirler. Bu proteinler, bitkinin stresle mücadelesine yardımcı olan çeşitli metabolik yollarda görev almaktadır. Bu proteinler, bitki hücrelerindeki stres sinyallerine yanıt olarak hareket ederek, abiyotik stresle ilişkili genleri aktive eder ve bu genlerin ifadesini artırmaktadırlar. Böylece bitkilerde stres dayanıklılığı artmakta ve çevresel stres koşullarına daha iyi adapte olunmaktadır. DREB proteinleri ayrıca bitki büyümesi ve gelişmesi sırasında da önemli bir rol oynamaktadırlar (Agarwal vd., 2006).

DREB transkripsiyon faktörleri, bitki stres cevaplarının anlaşılması ve geliştirilmesinde önemli bir araçtır. Bu faktörlerin keşfedilmesi, bitkilerin çevresel streslere daha iyi uyum sağlamasına yardımcı olmalarının yanı sıra yeni bitki çeşitleri geliştirmek için bir fırsat sunmaktadırlar.

Bu tez kapsamında, ülkemizde geliştirilen Atam-07 soya çeşidinin kuraklık stresi altında vermiş olduğu cevaplar ortaya konulacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Soya Fasulyesi (*Glycine max*. (L.)Merr.)

Soya fasulyesi (*Glycine max* (L.) Merrill), *Fabaceae* veya *Leguminosae* familyasına, *Faboideae* alt familyasına ait, tropikal, subtropikal ve ılıman iklimlerde yetişen bir baklagildir (Weerasekara vd., 2021). Dünya çapında en önemli gıda ürünlerinden biri olan soya fasulyesi, Asya kökenli olmasına ve binlerce yıldır orada yetiştirilmesine rağmen, şu anda tüm dünyada yetiştirilen, tüketilen ve iyi bilinen bir mahsul bitkisidir (Colletti vd., 2020, Kim vd., 2022).

Üçlü yaprakçıktan oluşan ve kuvvetli bir saçak kök sistemine sahip soya fasulyesinin gelişimi, vejetatif gelişim (V) ve generatif gelişim (R) aşamaları olarak ikiye ayrılmaktadır. Vejetatif gelişim, tohum çimlenmesi ve çıkışı takiben çiçeklenmeye kadar devam etmektedir. Generatif gelişim ise, çiçeklenmeden tohum olgunluğuna kadar süren bir gelişimdir. Soya fasulyesi gelişim evrelerini kapsayan ve en yaygın olarak kullanılan sistem, 1977’de Fehr ve Caviness tarafından geliştirilmiştir. Fehr ve Caviness tarafından geliştirilen soya fasulyesi vejetatif gelişim (V) ve generatif gelişim (R) aşamaları Tablo 2.1’de ve Tablo 2.2’de verilmiştir. Ayrıca soya fasulyesi bitkisine ait vejetatif (V) ve generatif (R) aşamaları Şekil 2.1’de gösterilmiştir.

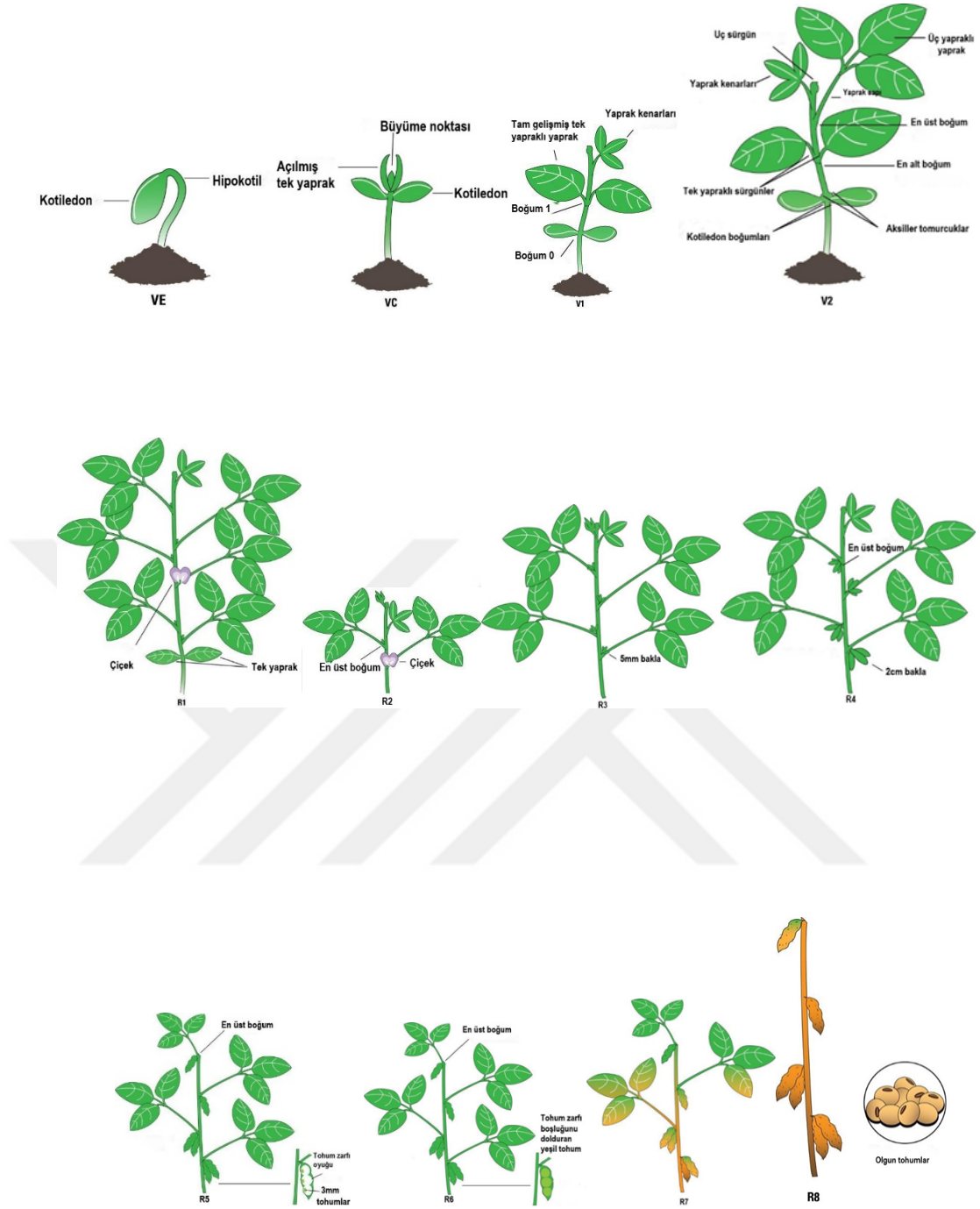
Tablo 2.1. Soya fasulyesi vejetatif gelişim aşamaları (Fehr ve Cavinnes, 1977).

Evre	Aşama	Tanım
VE	Ortaya çıkış	Tohum çimlenmesi ve çıkış
VC	Kotiledon	Toprak yüzeyinde Kotiledon
V1	İlk boğum	İlk yaprak oluşumu
V2	İkinci boğum	İkinci yaprak oluşumu
V(n)	n.boğum	n boğum sayısı

Soya fasulyesi verimini artırmaya yönelik yönetim stratejileri, potansiyel verimin etkilendiği büyüme aşaması tanımlanabildiği zaman oldukça etkilidir. Örneğin, gübreleme, abiyotik stresler, bitki hastalıkları ve pestisit uygulamalarının verim üzerindeki etkileri, bu olayların meydana geldiği büyüme aşaması tarafından belirlenmektedir. Vejetatif aşamalar, kaç tane tam gelişmiş üçlü yaprağın mevcut olduğuna göre numaralandırılır. Generatif (R) aşamaları çiçeklenme ile başlar ve bakla gelişimi, tohum gelişimi ve bitki olgunlaşmasını içerir (Şekil 2.1).

Tablo 2.2. Soya fasulyesi generatif gelişim aşamaları (Fehr ve Cavinnes, 1977).

Evre	Aşama	Tanım
R1	Çiçek açma	Ana gövdede bir boğumda çiçek
R2	Tam çiçeklenme	Ana gövdede en üst iki boğumda çiçek
R3	Başlangıç tohum zarfı	5mm uzunluğunda bakla
R4	Dolu tohum zarfı	2cm uzunluğunda bakla
R5	Başlangıç tohumu	3mm uzunluğunda tohum
R6	Tam tohum	Gelişmiş yeşil bir tohum içeren bakla
R7	Olgunluk başlangıcı	Olgunluk rengine sahip bir bakla
R8	Tam olgunluk	Olgunluk rengine sahip baklalar



Şekil 2.1. Soya fasulyesi gelişim aşamaları. VE: Ortaya çıkış. VC: Kotiledon. V1: İlk boğum. V2: İkinci boğum. R1: Çiçek açma R2: Tam çiçeklenme R3: Başlangıç tohum zarfı R4: Dolu tohum zarfı R5: Başlangıç tohumu R6: Tam tohum. R7: Olgunluk başlangıcı. R8: Tam olgunluk (Stowe ve Vann, 2022).

Soya fasulyesi tohumu, zengin protein (%35-45) ve yağ içeriğine (%15-25) sahip olmasının yanı sıra yaklaşık %33 oranında karbonhidrat içermektedir. Soya fasulyesinin düşük bir maliyet ile yüksek besin değerine sahip olması ekiminin yaygın olarak sürdürülmesine yol açmıştır (Sharma vd., 2014; Kim vd., 2022).

Soya fasulyesi, bitkisel yağ ve protein üretimi için önemli bir kaynak olması sebebi ile küresel olarak stratejik bir ürün olarak kabul edilir (Sobko vd., 2020). Soya fasulyesi, yalnızca insan beslenmesi için iyi bir protein kaynağı sağlayan temel gıda maddesi olarak değil, aynı zamanda yağlı tohum mahsulü, çiftlik hayvanları ve su ürünleri yetiştiriciliği için yem ve biyoyakıt hammaddesi olarak dünyanın en değerli mahsullerinden biridir (Chen vd., 2012).

Son yıllarda insan sağlığı göz önünde bulundurularak, bitkisel beslenmenin ön planda olduğu yeni beslenme alışkanlıkları içerisinde, zengin içeriğe sahip olan soya fasulyesi ve ürünleri de bulunmaktadır. Özellikle son yıllarda sağlık açısından önemli bir yere sahip olan soya fasulyesinin, ABD ve birçok Avrupa ülkesinde üretimi ve tüketimi hızla yaygınlaşmıştır (Bayar ve Yılmaz, 2005).

Soya fasulyesi, sahip olduğu zengin protein ve lipit içeriği sayesinde insan diyetinin temel bir parçası haline gelmiştir. Besleyiciliğinin yanı sıra, izoflavonlar da dahil olmak üzere çeşitli fonksiyonel bileşenleri içermesi sebebiyle oldukça ilgi görmektedir (Kim, 2021).

Soya fasulyesinin küresel tüketimindeki hızlı artışının sebebi, sadece insan sağlığına etkili bir besin olmasından kaynaklanmamaktadır. Hayvancılık sektöründe de önemli bir yere sahip olan ve hayvan yemleri üretiminde kullanılan soya fasulyesi hayvanların beslenmesinde büyük bir rol oynamaktadır. Ayrıca, son yıllarda biyoyakıt üretiminde de soya fasulyesi kullanımı artmıştır. Soya fasulyesi yağı, biyodizel üretiminde kullanılan önemli bir ham madde haline gelmiştir (Kinney ve Clemente, 2005).

2.2.Kuraklık Stresi ve Bitkilerin Kuraklık Stresine Verdikleri Cevaplar

2050 yılına kadar dünya nüfusunun 9,7 milyarı aşacağı ve bireylerin %65'inden fazlasının geçimlerini yalnızca tarıma dayalı olarak sağlayacağı tahmin edilmektedir. Gelişmekte olan ülkelerde bu oranın %90'a çıkması muhtemel görülmektedir. Sonuç olarak, yalnızca bir ulusun ekonomisi değil, aynı zamanda gıda arzı da büyük ölçüde tarıma bağlı olacaktır. Bununla birlikte daha şimdiden tarımsal uygulamalar, yeterli sulama sisteminin olmaması, küçük ve parçalı araziler, kaliteli tohumların bulunmaması, uygun mekanizasyon eksikliği ve aşırı kimyasal gübre ve ilaç kullanımı gibi birçok sorunla karşılaşmaktadır. Bütün bunlar toprak kalitesinin azalmasına, toprak erezyonuna ve doğal afetlere yol açmaktadır. Bu engellerin yanı sıra, farklı mahsuller farklı türlerde biyotik ve abiyotik streslerle de karşı karşıyadır (Ahluwalia vd., 2021).

Temel olarak stres, dengeyi bozan canlı ve cansız farklı faktörlerin neden olduğu değişen fizyolojik bir durumdur (Atta vd., 2022). Stresler doğada biyotik veya abiyotik olabilmektedir. Biyotik stresler bitkilerin böcek zararlıları ve patojenler veya mikroorganizmalarla etkileşimini içerirken abiyotik stresler arasında kuraklık, donma, tuzluluk, sıcaklık, yüksek ışık, oksidatif stres, ağır metal toksisitesi ve radyasyon bulunmaktadır. Her bir biyotik ve abiyotik faktörün etkisi, bitkilerin maruz kalma şekline, miktarına, yoğunluğuna ve süresine bağlıdır (Ansari vd., 2019; Acquaah, 2007). Bu tür abiyotik ve biyotik faktörler bitkilerin büyümesini ve üretkenliğini sınırlamaktadır. Bu durum, tarımsal ürünlerde sadece bitkilerin hayatta kalmasını değil, aynı zamanda verim ve kalite açısından ekonomik çıktıyı da etkileyebilmektedir (Battisti ve Naylor, 2009).

Abiyotik streslerden biri olan kuraklık, bitki verimliliğini etkileyen en şiddetli çevresel streslerden biridir. Kuraklık meteorolojik bir terimdir ve önemli yağışların olmadığı bir dönem olarak tanımlanır. Genel olarak, kuraklık stresi, mevcut toprak suyunun yetersiz hale gelmesi ve atmosferik koşulların terleme veya buharlaşma yoluyla sürekli su kaybına neden olması durumunda ortaya çıkmaktadır (Atta vd., 2022).

Kuraklık, tüm büyüme aşamalarında çeşitli morfo-fizyolojik özellikleri etkileyen ve önemli ekonomik kayıplara neden olan karmaşık bir streştir (Poudel vd., 2023). Soya fasulyesi veriminin sürdürülebilirliği, dünyanın birçok yerinde kuraklıkla birlikte öngörülen iklim değişiklikleri tarafından tehdit edilmektedir. Bu nedenle, gıda ve protein güvenliğine yönelik bu yakın tehdidi ele almak için kuraklığa dayanıklı soya fasulyesi çeşitlerinin seçilmesi gerekmektedir (Kunert vd., 2016).

Bitkilerin moleküler, biyokimyasal, fizyolojik, morfolojik, ekolojik özellikleri ve süreçleri kuraklık stresi altında bozulmaktadır (Şekil 2.2). Kuraklık stresi altında bitki verimi ve kalitesi olumsuz etkilenir (Arya vd., 2021). Gelişim evreleri, bitki türleri, kuraklığın şiddeti ve süresi bitkilerin kuraklığa tepkilerini etkileyen temel faktörlerdir (Seleiman vd., 2021). Bitkiler, kuraklık stresini tolere etmek için savunma mekanizmalarını geliştirmiş olmalarına rağmen, bu mekanizmalar çok çeşitli olmakta ve bitki türlerine göre değişiklik gösterebilmektedir. Bitkilerin kuraklığa toleransı ile ilgili mekanizmalar, hücre homeostazını korumaya yöneliktir ve hücrelere su girişinin artırılmasıyla mümkün olmaktadır (Lisar ve Agdam, 2016).



Şekil 2.2. Kuraklığın soya fasulyesi üzerindeki çeşitli etkileri (Arya vd., 2021).

Kuraklık stresi altında bitki direnci, kuraklıktan kaçış (erken çiçeklenme zamanı), kaçınma (stoma tarafından terleme düzenleyici ve yoğun kök sistemlerinin geliştirilmesi), dokularda su kullanımının korunması, antioksidan temizleyici sistem, bitki büyüme düzenleyicileri ve ozmotik düzenleme yoluyla gerçekleştirilebilmektedir. Kuraklık stresi fotosentetik aktiviteyi, değişen oksidatif metabolizmayı ve membran kararsızlığını belirgin bir şekilde etkileyebilmekte, bitkilerde yaprak boyutunu, gövde uzamasını ve su kullanım etkinliğini azaltabilmektedir. Kuraklık stresine maruz kalan bitkilerde, kök sisteminde veya yaprak seviyesinde fitohormon olarak bilinen absisik asit (ABA) üretimi artmaktadır, bu da stomaların kapanmasına neden olmakta ve terlemeyi azaltmaktadır (Fahad vd., 2017, Alghabari vd., 2016, Bashir vd., 2021).

Bitki büyüme düzenleyicileri, bitki büyümesini ve gelişimini düzenleyen kimyasal sinyal molekülleridir. Düşük konsantrasyonda düzenleyici bir rol oynayabilmekte ve bitki sinyal iletiminin gerçekleştirilebilmesinde bitkilerin farklı kısımlarında ve hücreler arasında hücre sinyallerini iletebilmektedirler. Kuraklık stresinde çok önemli bir sinyal molekülü olan ABA bir bitki büyüme düzenleyicisidir ve bitki büyümesini kontrol etmekte, tohum çimlenmesini engellemekte ve yaşlanmayı teşvik etmekte rol oynamaktadır. Bunlara ek olarak, abiyotik stresler altında strese karşı bitki tepkilerini düzenlemede oldukça etkindir (Yang vd., 2021).

Kuraklık stresi altında stresin algılanması regülasyondaki, ilk basamak olarak görülmekte ve hücre su kaybı hücresel sinyal iletimini tetiklemektedir. Bu sebeple sinyal mekanizması ile spesifik genler aktive olmaktadır. Kuraklık stresine genlerden bazıları hızlı bir şekilde tepki verirken, bazıları ABA birikiminden sonra yavaş bir şekilde indüklenmektedir. Üretilen ABA bazı genleri indükleyebilmekte ve üretimi de tetikleyebilmektedir. ABA bağımlı ve ABA bağımsız sinyal tipleri, kuraklık stresinin başlangıç sinyali ile spesifik genler arasındaki sinyal iletim yoludur.

Kuraklık stresine tolerans için bitkiler, reaktif oksijen türlerinin sentezi, etilen ve absisik asit gibi stres hormonlarının üretimi, kök ve gövde morfolojisindeki değişiklikler gibi farklı stresle başa çıkma mekanizmalarını kullanmaktadır. Bu mekanizmalar, bitkilerde kısa vadeli ve uzun vadeli tepkilerle sonuçlanır.

Kısa vadeli tepkiler genellikle stres periyodu çok küçük olduğunda ortaya çıkar. Bazı kısa vadeli tepkiler arasında azalmış karbon asimilasyonu, stoma kapanması, ozmotik denge, büyümenin engellenmesi, hidrolik değişiklikler, sinyal taşınması ve hücre kuraklığı sinyali yer alır. Bu tepkiler, bir an önce normal şartlara geri dönmek şartıyla genellikle bitkilerde fazla bir hasara yol açmaz. Uzun süreli stres daha tehlikeli ve kalıcı yaralanmalara ve hatta bitkilerin ölümüne yol açmaktadır (Ahluwalia vd., 2021).

2.2.1. Kuraklığın Bitki Morfolojisinde Meydana Getirdiği Değişiklikler

Kuraklık stresi, bitkilerde erken çimlenme, bitki boyu, bağıl kök uzunluğu, kök çapı, yaprak ve köklerin toplam biyokütlesi, yaprak/bitki sayısı ve dal sayısı gibi bitkilerin morfolojik özelliklerini olumsuz etkileyebilmektedir (Islam vd., 2018). Diğer çevresel faktörlerle birlikte topraktaki düşük su içeriği çimlenme başarısını etkilemektedir. Diğer koşullar ideal olsa da kuraklık stresi altında tohumların su emilimi olumsuz etkilenmektedir ve sonuç olarak çimlenme başlamamaktadır (Damalas, 2019).

Kuraklık stresi, bitki boyunu arttıran iç bitki bileşenlerini önemli ölçüde etkilemektedir. Kuraklık, yaprak alanını ve bitki toplam biyokütlesini azaltmakta, yaprak büyümesini sınırlayarak fotosentetik süreci etkilemektedir. Yaprığın üst epidermisinden su kaybı, yaprağın kıvrılmasına neden olan yaprak basıncı potansiyelinin azalmasına neden olmaktadır (Cai vd., 2020). Ayrıca kuraklık stresi, sürgün uzunluğu ve yaş ağırlık üzerinde de olumsuz etkiye sahiptir (Widuri vd., 2018).

Kuraklık stresi altında, tarımsal bitkilerin kök yapısı ve morfolojisi de değişmektedir. Kök yapısı, bitki büyümesinde ve gelişmesinde çok önemli bir rol oynamaktadır. Abiyotik stres koşulları sırasında, birçok bitkinin kök biyokütlesi, köklerin uzunluğu, topraktan su ve mineral emilimi artmaktadır. Bitkiler kuraklık stresine maruz kaldıklarında, kökleri zemine doğru uzar, daha derinlere ulaşır ve hayatta kalmak için yeterli su ve mineralleri bitki içerisine alır (Ghafar vd., 2021, Tûmová vd., 2018). Bazı bitki türlerinde kuraklık stresi, süresine ve yoğunluğuna bağlı olarak verimi de etkileyebilmekte ve düşüşe sebep olabilmektedir (Malinowska vd., 2020).

2.2.2. Fizyolojik Tepkiler

Kuraklık stresi farklı fizyolojik fonksiyonları olumsuz etkilemekte ve bitkiler olumsuz koşullara uyum sağlamak için tepki vermektedirler. Bu nedenle, ıslah programlarından önce fizyolojik faktörlerin ve süreçlerin kuraklık koşullarında verim artışı için iyileştirilmesi çok önemlidir (Dash vd., 2020; Barik vd., 2019; Gupta vd., 2020).

Yaprak bağıl su içeriği, bitkilerde fizyolojik süreçleri kontrol eden önemli bir faktördür. Bağıl su içeriğinin azalması, kuraklık stres yanıtının ilk belirtisidir. Yaprakların bağıl su içeriği, yaprak dokusu büyüme hızı ve terleme hızı ile güçlü bir şekilde ilişkilidir. Düşük bağıl su içeriği, yaprak su potansiyelini azaltarak stomaların kasılmasına neden olmaktadır (Hussain vd., 2018, Wu vd., 2022, Kapoor vd., 2020).

Terlemede azalma ve buna bağlı olarak yaprak sıcaklığındaki artış ve ayrıca stomaların kapanması kuraklık stresinin bir sonucudur. Verim ve terleme oranı arasında güçlü ve pozitif bir bağlantı vardır. Stoma tarafından düzenlenen terlemede azalma, bitkilerin kuraklık stresine karşı genel bir tepkisidir ve bu da bitki su kullanım verimliliğini artırmaya destek olur. Kuraklık koşullarında kümülatif terlemedeki düşüş, genellikle kuru madde üretiminin azalmasıyla doğrusal olarak ilişkilidir. Farklı mahsuller, mevcut toprak suyunun azalan seviyesine karşı çeşitli yaprak genişlemesi ve terleme tepkileri göstermektedir (Lopez vd., 2012).

Bitkiler kuraklık stresine maruz kaldıklarında, ilk tepkileri, terleme yoluyla su kaybını önlemek için stomaların kapanmasıdır. Stomaların kapanması, bitkilerin kuraklık stresine karşı başlıca fizyolojik tepkisidir. Stoma iletkenliği, elektron taşıma hızı, solunum, terleme ve CO₂ difüzyonu gibi birçok fizyolojik parametre ile yakın ilişki göstermektedir. Stomaların kapanması, çevre ile yaprak içi arasındaki gaz alışverişinde kısıtlamaya neden olmaktadır. Fotosentez aktivitesini azalmasına sebep olan stomaların kapanması, su kaybını önlemede etkili bir mekanizma olarak kabul edilmektedir (Sapeta vd., 2013, Taiwo vd., 2020;).

Fotosentez, ışık enerjisini yakalayıp canlı organizmalar tarafından daha fazla kullanılan kimyasal enerjiye dönüştürmenin tek yolu olduğundan, yaşamı sürdürmek için dünyadaki en önemli süreç olarak kabul edilmektedir. Fotosentez, çok sayıda

Çevresel strese karşı şiddetli duyarlılığı nedeniyle kuraklık stresinin de temel bir göstergesidir. Kuraklığın klorofil içeriği, net fotosentetik hız, stoma iletkenliği, terlemede düşüşe neden olduğu ve bunun da bitki metabolizmasını ve üretimini azalttığı bilinmektedir. Kuraklık stresi altında stoma ile ilgili olan ve olmayan faktörler fotosentetik hızın baskılanmasında etkili olabilir. Bununla birlikte, bu baskılanma tersine çevrilebilir. Bu nedenle stres ortadan kalktıktan sonra fotosentez devam edebilir. Kuraklık, stomaların kapanmasına yol açan ve böylece hücreler arası karbondioksit konsantrasyonlarını azaltan ve fotosentezi engelleyen ABA sentezini harekete geçirir. Stomaların kapanması sonucu azalan CO₂, karanlık reaksiyonda yer alan birçok enzimin aktivitesini de azaltmaktadır. Işıktan bağımsız reaksiyonların azalan aktivitesi, aydınlık ve karanlık reaksiyonlarda eşitsizliğe neden olarak plastidlerde ROS birikimine yol açabilir (Muhammad vd., 2021, Saeidi vd., 2015, Sapeta vd., 2013, Chaves vd., 2009, Nezhadahmadi vd., 2013, Zargar vd., 2017).

Kuraklık stresine maruz kalan bitkilerin temel bir tepkisi, büyümenin durmasıdır. Kuraklık stresinin varlığında sınırlı sürgün gelişimi, bitkinin metabolik taleplerini azaltır. Ozmotik denge için gerekli olan savunma bileşiklerinin oluşumu için metabolitleri bir araya getirir. Daralmış kök gelişimi, kök meristeminin işlevini düzenler ve stres yatıştığında kök büyümesini destekler. Kuraklık, kök ve sürgün gelişiminin ve yaprak alanının engellenmesine neden olur ve bunu bitkilerin büyüme ve gelişiminin azalması takip eder. Bu değişikliklerin yanı sıra bitkiler, su eksikliği direncinin bileşenleri olarak fotosentezden antioksidan ve çözünen birikimine kadar uzanan çeşitli metabolik süreçlere girerler. Bitkiler, karmaşık transkripsiyonel ağlar yoluyla gen ifadesini değiştirerek kuraklık stresine yanıt verir (Pandey ve Shukla, 2015, Boyer vd., 2004, Rostamza vd., 2011, Ayub vd., 2021, Jaleel vd., 2009).

2.2.3. Biyokimyasal Tepkiler

Kuraklık, ROS (süperoksit radikali, hidrojen peroksit, hidroksil radikali ve tekli oksijen) oluşumunu indükleyerek bitki hücrelerinde oksidasyona neden olur. Bitkilerde ROS üretimi, lipid peroksidasyonuna, klorofilin parçalanmasına ve zarın dengesizleşmesine neden olan fotosentez ve antioksidan savunma sistemi gibi birçok fizyolojik ve metabolik süreç için zararlıdır.

ROS, streslerin neden olduğu olumsuz durumlarda rol oynamanın yanı sıra, büyüme ve gelişmede de rol oynar. ROS'un üretim yeri ve seviyesi, stres koşulları veya büyüme ve gelişme tepkileri altında, sinyalleşme için kesinlikle kontrol altında olmalıdır. Hücre duvarı, ROS yoluyla savunma tepkisinin başladığı temel yerlerden biridir (Hossain vd., 2013, Zou vd., 2021, Castro vd., 2021).

Kuraklık stresi altında bitkiler stresin üstesinden gelmek için çeşitli mekanizmalar geliştirmiştir. Antioksidan sistem ve ozmotik düzenleme, kuraklık stresi koşullarına karşı bitkilere tolerans sağlayan başlıca savunma sistemleridir. Katalaz (CAT), peroksidaz (POX), süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon redüktaz (GR), askorbat peroksidaz (APX), glutatyon peroksidaz (GPX), malondialdehit (MDA) ve prolin enzimatik antioksidanları, askorbat, glutatyon ve fenolik bileşikler ise enzimatik olmayan antioksidanları oluşturmaktadır. Flavonoidler, tanenler ve lignin öncüleri gibi bazı enzimatik olmayan antioksidanlar, oksidatif stresi azaltan ROS detoksifikasyonunda aktiftir. Bu antioksidanlar, çeşitli redoks reaksiyonlarına girerek iş birliği içinde işlev görür (Neill vd., 2002, Demidchik vd., 2007, Mahajan vd., 2005, Kumar vd., 2020, Ali vd., 2006, Harb vd., 2015).

Prolin, kuraklık stresi gibi çeşitli abiyotik çevresel zorluklara yanıt olarak daha belirgin bir şekilde birikmektedir. Prolin, hücresel yapıyı bozmadan bitki hücrelerinde bir ozmoprotektan olarak yüksek konsantrasyonlarda birikebilir. Prolin birikimi, bitkiler çevresel streslerle karşılaştığında ozmotik ayarlama, ROS'un detoksifikasyonunda ve membran bütünlüğünde önemli bir rol oynamaktadır. Prolin konsantrasyonundaki artış, stres tolerans çalışması için kriter olarak kullanılmaktadır (Zhang vd., 2011).

Tüm canlılarda stres koşullarında meydana gelen en zararlı süreçlerden biri lipid peroksidasyonudur. Genotipin stres koşulları altında toleranslı veya duyarlı olduğunu belirlemede dikkate alınan en güvenilir parametrelerden biri lipid peroksidasyonudur. MDA, lipid peroksidasyonu sırasında oluşan bir üründür. Hem hücre hem de organel zarlarında, ROS seviyesi eşik sınırının üzerine çıktığında, lipid peroksidasyonu meydana gelir. Bu, yalnızca düzenli hücresel işleyişi etkilemekle kalmaz, aynı zamanda lipid türevli radikallerin oluşumu yoluyla oksidatif stresi de uyarır (Rasool vd., 2013).

2.2.4. Moleküler Mekanizmalar

Kuraklık stresi altında bitkiler, moleküler seviyelerde birçok adaptif mekanizmaya maruz kalır. Bu koşullar altında, birçok genin yukarı ve aşağı regülasyonu, strese yanıt olarak indüklenir ve stres proteinlerinin birikimi, kuraklığa toleransta rol alır. Kuraklık da dahil olmak üzere abiyotik stres sırasındaki sinyal yolları, çeşitli dehidrasyona duyarlı element bağlayıcı genlerin anlatımını gösterir (Agarwal vd., 2006; Farooq vd., 2008).

Kuraklık stresine maruz kalan bitkiler, ROS aracılı hücre yaralanmaları, artan hücresel sıcaklık ve hücresel içeriklerin viskozitesi, değişen etkileşim, agregasyon ve proteinlerin denatürasyonu gibi olumsuz etkiler yaşarlar. Kuraklık stresinin bitkiler üzerindeki toksik sonuçlarıyla mücadele etmek için, transkriptomik, proteomik ve metabolomik dahil olmak üzere çeşitli moleküler yaklaşımlar kullanarak yüksek kuraklık toleransı sergileyen yeni çeşitler geliştirilmiştir (Pareek vd., 2009; Aguado vd., 2014).

Bitkilerde kuraklık toleransının artmasından bir dizi fizyolojik, hücresel ve moleküler süreç sorumludur (örneğin, osmolit birikiminden sorumlu çeşitli genlerin ekspresyonunun yukarı veya aşağı regülasyonu, enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan içeriğinin artması, terleme hızında azalma, sürgün büyümesi). Kuraklık stresi altında, artan absisik asit (ABA) konsantrasyonu stomaların kapanmasında çok önemli bir rol oynar. Ayrıca, strese duyarlı çeşitli genlerin ifadesini düzenler. Bununla

birlikte, kuraklığa duyarlı genlerin ifadesi de ABA'dan bağımsız bir sistem tarafından kontrol edilmektedir.

Çok sayıda protein kodlayan anahtar gen, kuraklık destekli ifade gösterir ve metabolik veya düzenleyici bir rol oynar. Ayrıca düzenleyici rollere sahip olan genler, esas olarak transkripsiyon faktörlerini (AREB, NAC, AP2/ERF, MYC, MYB ve bZIP), mitojenle aktive olan protein kinazları (MAPK); farklı hücresel sinyal yollarından, ribozomlar, reseptörler ve transkripsiyonel olarak düzenlenen sistemle ilgili protein kinazlardan ve sinyal iletiminin senkronizasyonundan sorumlu proteinlerden (fosfatazlar) sorumludur (Sah vd., 2016; Manna vd., 2021).

Kuraklık stresi de dahil olmak üzere çeşitli abiyotik streslerin sinyal yolları, bazı ortak anahtar adımları içerir. En önemlisi, plazma zarında lokalize olan veya sitozolde serbestçe bulunan sensörler veya reseptörler aracılığıyla stres uyarısının algılanmasıdır. İkincisi, ikincil haberciler aracılığıyla sinyal iletimidir. Stres uyarısının algılanması bir kez meydana geldiğinde, kalsiyum iyonları, siklik nükleotidler (cAMP, cGMP), nitrik oksit, şekerler, ROS, vb. gibi ikincil habercilerin aktivasyonuna yol açar (Liu vd., 2016; Pérez vd., 2013).

İkincil haberciler, farklı streslere yanıt veren çeşitli genlerin ekspresyonunu veya baskılanmasını modüle ederek sinyal yolunu aktive eder. Bazı transkripsiyon faktörleri (TF'ler), bir aşağı akış gen grubunun promotör bölgesinde yer alan cis -etkili elemanlarla doğrudan iletişim kurar, dolayısıyla ekspresyonlarını senkronize eder (Bashir vd., 2021).

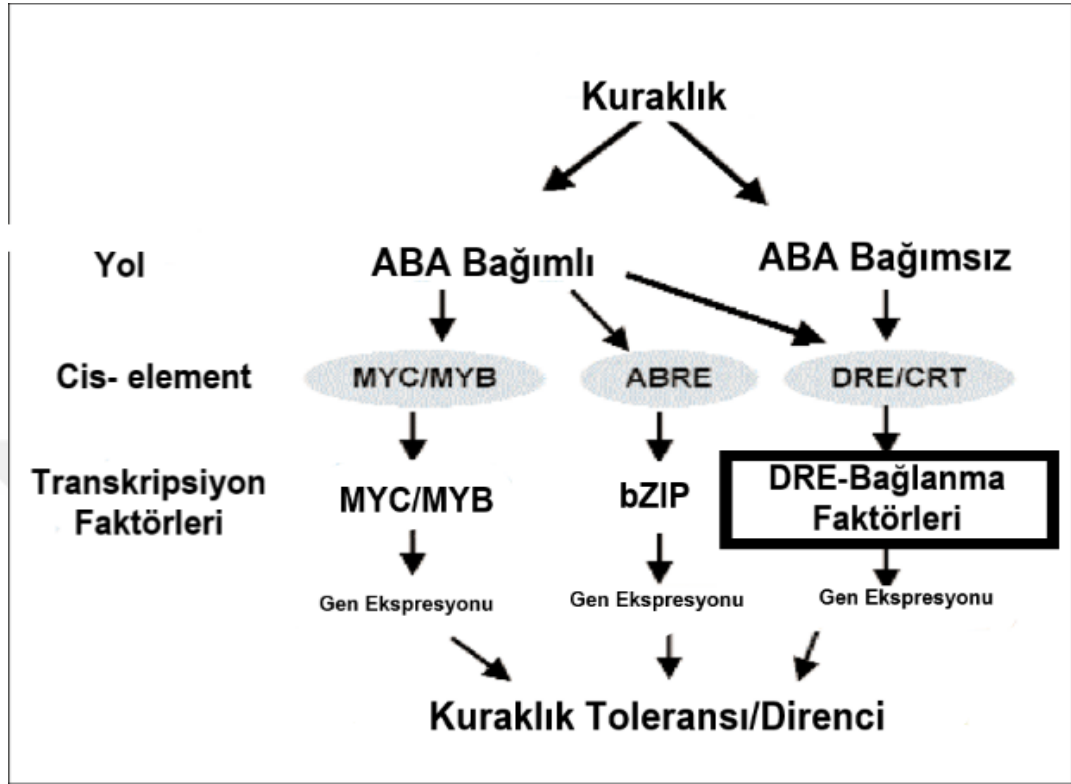
2.2.5. Hormonal Denge

Bitki hormonları veya fitohormonlar, bitkilerin normal büyümesi ve gelişmesi için gerekli olan biyokimyasallardır. Bitki hormonları arasında oksinler (IAA), gibberellinler (GA'lar), sitokininler (CK), absisik asit (ABA), etilen (ET), jasmonatlar (JA), salisilik asit (SA), brassinosteroidler (BR), strigolaktonlar (SL) ve nitrik oksit (NO) yer almaktadır. Bitki büyüme ve gelişmesindeki rollerinin yanı sıra hormonlar ayrıca biyotik (hastalık, patojenler, otçullar vb.) ve abiyotik (kuraklık, sıcaklık, tuzluluk, ağır metaller vb.) strese karşı tepkiye aracılık etmektedirler. Hormonlar,

biyosentezlerinin yapıldığı yerde veya yakın dokularda hareket ederler. Stres koşulları altında hormon biyosentezi, dağılımı ve sinyal iletiminin modelleri değişir (Rasool, 2023).

Kuraklık stresi koşullarında, ABA, ABA biyosentezi ile ilişkili genlerin indüklenmesi yoluyla köklerde hızla sentezlenir (Kim vd., 2022). ABA, abiyotik streslere karşı bitki savunmasından sorumludur çünkü kuraklık, tuzluluk, soğuk, sıcak stresi ve yaralanma gibi çevresel koşulların ABA düzeylerinde artışı tetiklediği bilinmektedir. ABA stomaların kapanması gibi kısa vadeli tepkileri uyarır, bunun sonucunda su dengesinin korunmasına ve strese duyarlı genlerin düzenlenmesi yoluyla daha uzun vadeli büyüme tepkilerine yol açmaktadır. ABA ozmotik streslerin ortaya çıkması üzerine birikmektedir (Verma vd., 2016).

Kuraklık stresi sinyali ayrıca ABA'ya bağımlı ve ABA'dan bağımsız yollar tarafından düzenlenir (Şekil 2.3). Her iki yol da kuraklık stresinde aktive olur ve çeşitli kuraklığa neden olan genlerin ekspresyonunu düzenler. Kuraklık stresi altında bitkiler, köklerinde büyük miktarlarda ABA üretmek için ABA biyosentez genlerini indükler. ABA, köklerde artan kuraklık toleransına yanıt olarak oksin ile ilgili oksin yanıt faktörleri (ARF) transkripsiyon faktörünü aktive eder ve sitokinin, ABA'yı antagonize eder. Ek olarak, ABA'dan bağımsız yol, kök gelişimine yardımcı olmak için etilen sinyal transdüksiyon transkripsiyon faktörünü aktive eder (Kim vd., 2022).



Şekil 2.3. Kuraklığa duyarlı gen ifadesinin düzenlenmesi. ABA bağımlı ve bağımsız yollar (Saleh vd., 2005).

2.2.6. İyon Homeostazı

Hücre içi iyon konsantrasyonlarının homeostazı, canlı hücrelerin fizyolojisi için esastır. Hücrelerin toksik iyon konsantrasyonlarını düşük tutması ve temel iyonları biriktirmesi için iyon akışının uygun şekilde düzenlenmesi gereklidir. Bitki hücreleri, sitozolde karakteristik olarak yüksek K^+ konsantrasyonlarını ve düşük Na^+ konsantrasyonlarını korumak için H^+ -ATPazların aracılık ettiği birincil aktif taşımayı, kanallar ve yardımcı taşıyıcıların aracılık ettiği ikincil taşımayı kullanır. Hücre içi K^+ ve Na^+ homeostazı, birçok sitozolik enzim aktiviteleri ve hücre hacminin düzenlenmesi için membran potansiyelinin korunması için önemlidir (Zhu,2002).

İyon homeostazı, makromoleküllerin negatif yüklerinin telafisi, elektro nötralitenin korunması, hücre turgorunun ve hacminin oluşturulması gibi bitki biyolojisi için çok önemli işlevleri belirler. Ayrıca, enzim aktivitesi ve protein sentezi gibi diğer temel işlevler için dahili ortamda veya organellerde uygun bir iyon potansiyeli gereklidir. İyonlar bitki hücresi fizyolojik fonksiyonu ve homeostazı üzerindeki doğrudan etkilerinin yanı sıra, ayrıca klorofil veya hemoglobin gibi biyomoleküllerin temel bileşenleridir ve terlemeyle su kaybını, bitki kurumasını ve hücre uzamasını kontrol eden stoma açıklığı gibi yaşamsal süreçlere katkıda bulunarak tüm bitki düzeyinde önemli bir rol oynarlar.

Kuraklık stresi altında bitkiler tepki olarak, su ve potasyum birikimine bağlı bir savunma mekanizmasını harekete geçirmektedirler. Farklı bitki organlarında kuraklık stresi altında potasyum ve klorür önemli rol oynamaktadır. K^+ ve Cl^- alım sistemlerinin yüksek aktivitesi ve geniş bir kök sistemi ihtiyaç duyulan özelliklerdir. Yaprakta K^+ ve Cl^- , suyu hücreler içinde tutmak için önemli bir süreç olan yaprak hücrelerinin verimli bir ozmotik düzenlemeye olanak sağlamaktadır. Verimli stoma kapanması, aşırı su kaybını önler ve koruyucu hücrelerden K^+ ve Cl^- salınımı ile sağlanır.

Kuraklık, bozulmuş bir iyonik dengeye sebep olduğundan, başta K^+ , Na^+ , Cl^- ve Ca^{2+} olmak üzere birçok inorganik iyon, iyon homeostazı yoluyla bitkilerde kuraklık toleransının sağlanmasına yardımcı olabilmektedir. Na^+ /H^+ antiporter, Na^+ /Ca^{2+} antiporter, K^+ /Na^+ antiporter, Ca^{2+} kanalı ve Cl^- kanalı dahil olmak üzere çok sayıda iyon antiportörü ve iyon kanalı, iyon taşıma sürecine aracılık eder ve bitkilerin çeşitli kısımlarında iyon alımını, akışını ve transferini düzenler. K^+ ve Cl^- hücrelerdeki turgor

basıncını düzenler ve böylece K^+/Cl^- iyon homeostazı, koruyucu hücrelerin şişkinliğini düzenleyerek stoma davranışını kontrol eder.

H^+ bağlı H^+ -ATPazlar, negatif bir elektriksel potansiyel gradientini indükleyen ve plazma zarının hiperpolarizasyonuna sebep olan çok önemli enzimlerdir. Hiperpolarizasyon, voltaj ayarlı içe doğru K^+ kanallarını açar ve stoma açılmasıyla sonuçlanır. Bununla birlikte, kuraklık altında, stoma kapanmasını tetikleyerek aşırı su kaybını sınırlamak için H^+ -ATPazların aktivitesi inhibe edilir. Bu ABA aracılı düzenleme, membran depolarizasyonunu sürdürmek için gerekli olan H^+ -ATPazların fosforilasyon seviyesini azaltır. Böylece, ABA'nın yaprak vasküler dokularından hücreleri korumak için taşınması ve ardından H^+ -ATPaz aktivitesinde azalma, stoma kapanmasını indükleyerek ve terlemeyi veya buharlaşmayı en aza indirerek bitkinin kuraklık koşullarında daha toleranslı olmasını sağlar.

Kalsiyum (Ca^{2+}), bitkilerde önemli yapısal ve fizyolojik roller oynar ve bu yapılar arasındaki kimyasal kalıntıları köprüleyerek hücre duvarları, zarlar ve zara bağlı proteinlerin stabilitesini korur. Hücre bölünmesi, hücre farklılaşması, hücre polaritesi, ayrıca stres tepkileri ve bitki savunması dahil olmak üzere çeşitli fizyolojik ve moleküler süreçlere Ca^{2+} tarafından aracılık edilir. Kritik bir haberci görevi gören kalsiyum, çevresel bir uyarana (örneğin, stres faktörleri) maruz kalındığında hücrelerde birincil fizyolojik fonksiyonları tetikler.

Plazma zarında ve organel zarlarında bulunan üç ana Ca^{2+} kanalı, kalsiyum iyonu geçirgen kanallar, Ca^{2+}/K^+ antiporterleri ve Ca^{2+} -ATPazlar, kuraklık stresi sinyallerine yanıt verir ve mesajları ileten sitozolik Ca^{2+} konsantrasyonunu yükseltir böylece biyokimyasal süreçlerin bir sinyal dizisini başlatmış olur. Bu yüksek Ca^{2+} seviyeleri, kalmodulin (CaM), kalsinörin B benzeri proteinler (CBL'ler) ve kalsiyuma bağımlı protein kinazlar (CDPK'ler) gibi kalsiyum sensör proteinleri tarafından çözülür ve iletilir. CBL'ler, CBL-etkileşimli protein kinazlar (CIPK'ler) olarak adlandırılan spesifik bir protein kinaz grubu ile etkileşime girer ve bitkilerde çok sayıda Ca^{2+} 'ya bağımlı süreçte temel roller gerçekleştirir. Ayrıca, çeşitli çalışmalar, Ca^{2+} 'nın hücresel plazma zarlarının yapısını koruma ve genel bitki kuraklık direncini artırmadaki rolünü doğrulamıştır (Mukarram vd., 2021).

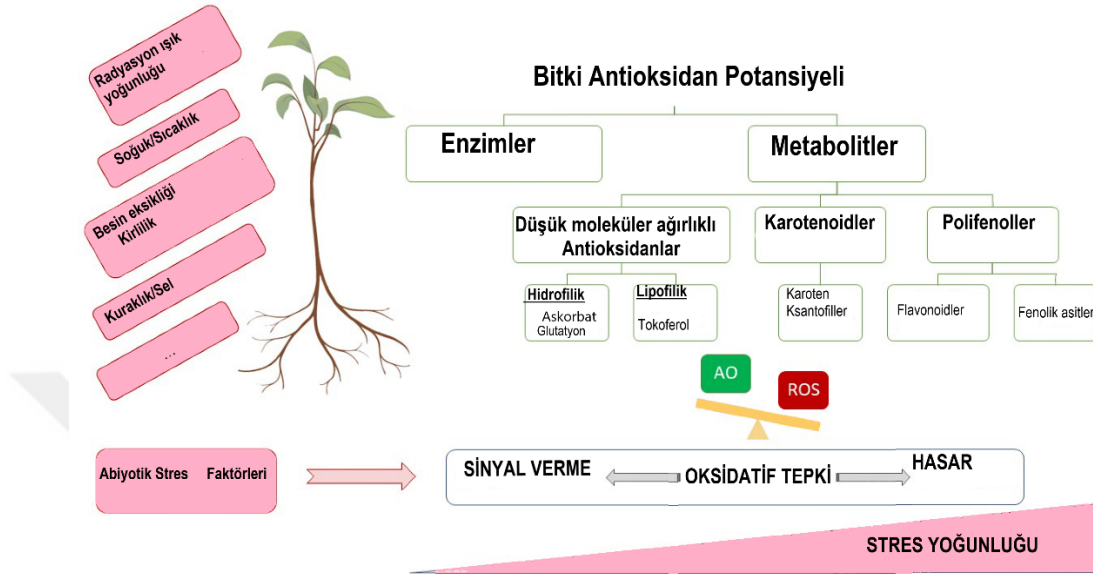
2.2.7. Antioksidan Moleküller

Bitki antioksidanları, çevresel streslere uyum sağlamada önemli rol oynamaktadırlar. (Maury vd., 2020). Bitkilerin çevresi sürekli değişmekte olup doğal kökenli varyasyonları ve aynı zamanda antropojenik faaliyetlerden kaynaklanan değişiklikleri içermektedir. Hareketsiz yapıları nedeniyle, bitkiler bu çevresel zorluklara daha yatkındır ve bu nedenle genellikle strese maruz kalırlar. Artan ROS üretimi ile karakterize edilen bir oksidatif soruna dönüşür. ROS, oksidatif sinyalleşmede çok önemli rol oynar ve bitki hormonları gibi diğer bileşenlerle birlikte, bitkinin alışmasını ve sonunda stresli bir ortama uyum sağlamasını sağlamak için hızlı ve etkili bir yanıt başlatır. Ayrıca artan ROS konsantrasyonları DNA, proteinler ve membran lipitleri gibi hücrel makromoleküllerde hasara neden olabilir (Maury vd., 2020).

Kloroplast ve mitokondri bitki hücrelerinde ROS'u en yoğun üreten yapılardır. Aynı zamanda enerji üretimi ile ilgili rollerinden dolayı ROS dengesinin sağlanması açısından da önemlidirler. (Kasote vd., 2015). ROS, normal bitki büyümesi ve gelişimi için çok önemli olmasına ve sinyal iletiminde önemli rol oynamasına rağmen, hücrel hasarı da indükleyebilmektedir. Bu nedenle, oksidatif dengenin korunması stres toleransı için çok önemlidir. Oksidatif hasarı önlemek için bitkiler, enzimler ve metabolitlerden oluşan kapsamlı bir antioksidan savunma sistemine sahiptir (Şekil 2.4). Oksidatif stres, bitkiler üzerinde yapılan çok sayıda çalışmada bildirildiği gibi, kuraklık koşullarında bitki hücreleri üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Hücrel düzeyde, ROS su eksikliği stresine maruz kaldığında birikir ve hücrel homeostaziye zarar vererek protein denatürasyonuna, hücre zarlarında lipid peroksidasyonuna, DNA veya RNA hasarına, antioksidan enzim aktiviteleri üzerinde olumsuz etkilere ve nihayetinde hücre ölümüne neden olur. Bu nedenle bitkiler, oksidatif hasara direnmek için enzimler ve enzimatik olmayan metabolitler dahil olmak üzere çok sayıda antioksidan kullanılmaktadırlar (Szalai vd., 2009; Avendaño-Vázquez vd., 2014).

Başlıca enzimatik antioksidanlar süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), peroksidazlar (POD) ve redoksin ailesinin üyeleridir. Bunlar doğrudan ROS detoksifikasyonunda yer almakta, AsA (askorbik asit)-GSH (indirgenmiş glutatyon) döngüsünün enzimleri monodehidroaskorbat redüktaz (MDHAR); dehidroaskorbat redüktaz (DHAR); glutatyon redüktaz (GR) ve indirgeme kapasitesi sağlayan enzimler, AsA ve GSH gibi enzimatik olmayan antioksidanların geri dönüşümünde

önemlidir. AsA ve GSH önemli düşük moleküler ağırlıklı (DMA), suda çözünür moleküllerdir (Maury vd., 2020).



Şekil 2.4. Abiyotik stres faktörleriyle başa çıkmak için hücrel redoks dengesini korumaya yönelik bitki antioksidan potansiyeli. AO = Antioksidanlar; ROS = Reaktif Oksijen Türleri.

Artan ROS üretiminin bir sonucu olarak oksidatif hasarı önlemek için, bitki antioksidanlarının aktivitesi ve biyosentezi genellikle stres koşullarına yanıt olarak artar. Antioksidan enzim aktivitelerini ve antioksidan metabolitlerin biyosentezini artırarak oksidatif stresle mücadele etme yeteneği, bitki stres toleransını tanımlamada önemli bir rol oynar ve aynı türün hassas, toleranslı çeşitleri arasında farklılık gösterir. Özellikle zorlu ortamlarda yetişen bitkiler, genellikle artan spesifik antioksidan bileşik seviyeleri ile karakterize edilir (Maury vd., 2020).

2.3. Transkripsiyon Faktörleri

Artan dünya nüfusunun beslenme ihtiyaçlarını karşılamak için değişen çevresel koşullara daha dayanıklı tarımsal bitkiler geliştirmek gerekmektedir. Farklı biyotik ve abiyotik streslerin ana düzenleyicileri olarak bitki transkripsiyon faktörlerinin (TF'ler) keşfi, bitki bilimciler için yeni ufuklar açmaktadır (Shahzad vd., 2021).

Trans-aksiyon faktörleri olarak da bilinen TF'ler, tüm canlı organizmalarda gen ekspresyonunun kontrolü için önemli düzenleyicilerdir ve bitki gelişimi, hücre döngüsü, hücre sinyali ve stres yanıtında çok önemli roller oynarlar (Javed vd., 2020). Transkripsiyon faktörleri, DNA bağlama alanı (DBA) aracılığıyla hedef genlerin yukarı akış promotör bölgesindeki spesifik DNA sekanslarına (cis-etkili elementler) bağlanır. Böylece farklı bitki hücre tiplerinde veya farklı çevresel koşullar altında hedef genlerin spesifik ekspresyonunu düzenlemektedirler. Bitki morfogenezinde, genlerin seçici ifadesi fenotiplerin farklılaşmasına yol açar ve transkripsiyon faktörleri bu süreçlerde önemli bir düzenleyici rol oynar. TF'ler, DNA bağlama alanlarındaki ve korunmuş motiflerdeki farklılıklara göre bHLH, TCP, MADS, bZIP, KNOX, WOX, AP2/ERF, NAC, GATA ve ARF aileleri gibi farklı gen ailelerine ayrılmaktadır (Zhang vd., 2022).

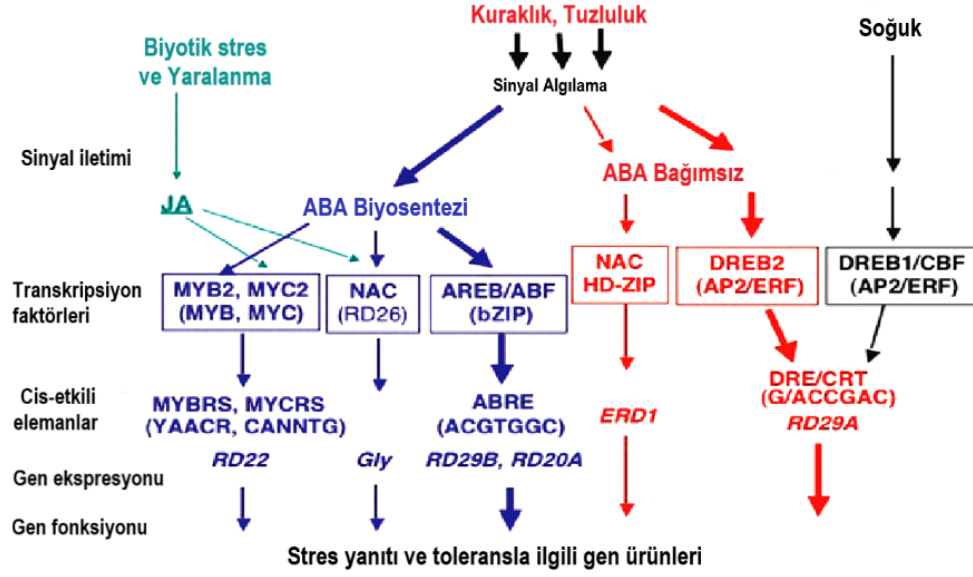
TF'ler, bitkilerin çeşitli biyotik ve abiyotik streslere karşı savunmada görev alan yardımcı faktörleridir. Bunlar, çeşitli biyotik ve abiyotik streslere karşı bitki toleransında/direncinde temel roller oynamaktadır. TF'ler genellikle strese yanıt veren genlerin promotör bölgelerindeki cis -etkili elemanlar içindeki hedef bölgelerine bağlanarak strese yanıt verirler. Promotor bölgelerde bağlanan TF'ler, biyokimyasal, fizyolojik ve moleküler tepkiler için karmaşık bir oluşumu başlatır (Şekil 6).

Stres yanıtı, sinyal algısı, sinyal iletimi ve strese yanıt veren genlerin ifadesinden oluşur. Stres sinyali, bitki hücresi zarlarındaki veya hücre duvarındaki reseptörler tarafından alınır ve hücre içi elementler, yani Ca^{2+} , reaktif oksijen türleri (ROS), fitokromlar, fosfatazlar ve protein kinazlar aracılığıyla TF'lere iletilir. TF'ler daha sonra gen ekspresyonunu kontrol eder ve strese duyarlı genlerin ekspresyonunu başlatır. Stres sinyali algısının strese duyarlı gen ekspresyonuna dönüştürülmesinde yer alan sinyal iletim ağları içinde, çeşitli TF'ler ve cis- strese duyarlı promotörlerde bulunan aktif elementler, yalnızca gen ekspresyonu için moleküler anahtarlar olarak

değil, aynı zamanda sinyal iletiminin uç noktaları olarak da işlev görür (Şekil 2.5) (Gujjar vd., 2016, Shahzad vd., 2021).

TF'ler, genel olarak DNA bağlama alanlarına karşılık gelen karakteristik dizi motiflerinin varlığına göre sınıflandırılır. Sekans türü ve işlevi arasında bir korelasyon olmamasına rağmen, farklı TF sınıfları, farklı rollere sahip olma eğilimindedir (Shahzad vd., 2021).

TF'ler, bitki hücrelerinin hücre duvarında ve plazma zarında bulunan sensörler aracılığıyla çevresel stres uyarılarını algılar. Hücre dışı sinyal daha sonra ROS, siklik nükleotidler (cAMP, cGMP), şekerler, kalsiyum iyonları, inositol fosfat ve nitrik oksit gibi hücrelerde bulunan çeşitli ikincil haberciler aracılığıyla hücre içi sinyallere dönüştürülür. Bu ikincil haberciler aracılı sinyal iletimi, kalsiyum bağımlı protein kinazlar (CDPK'ler) ve mitojen aktif edilmiş protein kinazlar (MAPK'ler) gibi protein kinazların, fosforilasyon/de-fosforilasyon yoluyla hedeflenen TF'lerin aktivitesini aktive eden/ baskılayan çeşitli fosfatazların aktivasyonuna yol açmaktadır. Sonuç olarak, bitkilerde stres duyarlılığı veya toleransı, temel olarak, strese duyarlı genlerin hücre içindeki yerine ve zamana göre düzenlemesini kontrol eden fitohormon ve TF'nin koordineli aktivitesine bağlıdır (Manna vd., 2020).



Şekil 2.5. Abiyotik stres sinyallerinin transkripsiyonel düzenleyici ağları ve gen ifadesi. ABA: Absisik asit, JA: Jasmonatlar, DREB: Dehidrasyona duyarlı element bağlayıcı, MYB: Miyeloblastoz, NAC: N -asetil- L -sistein (Jan vd., 2017).

2.3.1. DREB Transkripsiyon Faktörleri

Dehidrasyona duyarlı element bağlayıcı proteinler (DREB), bir dizi abiyotik stresle ilişkili genleri indükleyen ve bitkilere stres toleransı kazandıran önemli transkripsiyon faktörleridir. ERF (etilene duyarlı eleman bağlama faktörleri) transkripsiyon faktörleri ailesine üyedirler. ERF proteinleri, bitkilere özgü APETALA2 (AP2) /etilene duyarlı element bağlayıcı protein (EREBP) transkripsiyon faktörlerinin bir alt ailesidir (Agarwal vd., 2006, Huang vd., 2020). TF ailelerinin en büyük gruplarından biri olan AP2/ERF (APETALA2/etilene duyarlı faktör) üst ailesi, bitki gelişim süreçlerinin ve biyotik ve abiyotik stres tepkilerinin düzenlenmesinde yer alır. APETALA 2 / etilene duyarlı element bağlama faktörü (AP2/ERF) ailesi, dört ana alt aileyi içeren bitkiye özgü transkripsiyon faktörlerinin büyük bir grubudur. AP2, RAV, ERF ve dehidrasyona duyarlı element bağlayıcı protein (DREB) alt ailelerini içerir (Mizoi vd., 2012, Zhang ve Xia, 2023).

DREB transkripsiyon faktörleri, dehidrasyona duyarlı element (DRE) (çekirdek motifi A/GCCGAC) ile spesifik olarak etkileşime giren tek bir korunmuş AP2 alanı içeren AP2/ERF (APETALA2/etilene duyarlı faktör) gen ailesinin bir alt grubudur. DREB transkripsiyon faktörleri, bir dizi aşağı akış genin ekspresyonunu düzenlemek ve

bitkilerin farklı abiyotik streslere karşı direncini arttırmak için stres direnci genlerinin promotör bölgesindeki DRE ve C-tekrar duyarlı (CRT) cis- elementine bağlanır. DNA bağlayıcı alanların sekans kimliklerine dayalı olarak, DREB proteinleri altı alt gruba (A1-A6) ayrılabilir. Farklı alt gruplardaki DREB üyeleri, bitkilerde farklı roller oynamaktadır (Wu vd., 2022).

14. valin (V14) ve 19. glutamik asit (E19) DREB proteinlerinin AP2/ERF alanında korunur ve DREB proteinlerinin DNA'ya bağlanma özgülüğünün belirlenmesinde merkezi bir rol oynar (Li vd., 2021). Tüm TF'ler, DNA bağlama motifi adı verilen kısa bir peptit bölgesi içeren bir DNA bağlama alanına sahiptir. DNA bağlama alanının amino asit dizileri, bir aile içinde korunur. CBF/DREB'ye ait proteinler, ~60 amino asitten oluşan AP2/ERF alanı adı verilen yüksek oranda korunmuş DNA bağlama alanına sahiptir. DREB1 / CBF genlerinin farklı abiyotik stresler altında ekspresyonu, genetik olarak çok çeşitli bitki türlerinden kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır (Akhtar vd., 2012).

DREB1 /CBF genleri, DREB alt ailesinin A1 alt grubuna aittir ve ilk kez *Arabidopsis thaliana*'da bulunmuştur. DREB1/CBF genlerinin, birçok COR geninin promotör bölgesindeki DRE/CRT yanıt elemanlarına bağlanabildiği yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır. DREB1 hedef genlerin ekspresyonunu düzenleyebilir ve strese karşı bitki direncini geliştirebilmektedir. *Arabidopsis thaliana*'ya ek olarak, domates, mısır, buğday, pirinç ve diğer kapalı tohumlularda homolog DREB1/CBF genleri de tanımlanmış ve incelenmiştir (Chen vd., 2022).

AP2 alanında, DREB1/CBF ve DREB2 yüksek homolojiye sahiptir ve aynı DRE çekirdek dizisine (A/GCCGAC) bağlanabilmektedirler. DREB1/CBF'den farklı olarak, DREB2 kuraklık ve yüksek sıcaklık tarafından indüklenmektedir. Ayrıca yapılan çalışmalarda kuraklık stresi altında, lipid sinyalinin DREB2 geninin düzenlenmesi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Kudo vd., 2017, Cui vd., 2011).

Karmaşık sinyal iletim yollarında bitki hormonları oldukça önemli bir yere sahiptirler. Bitkilerin normal büyümesini ve üremesini sağlamak için çeşitli bitki hormonları, farklı aşamalarda ve organlarda gen ifadesini etkileyerek farklı yaşam aktivitelerini düzenlerler (Örneğin absisik asit (ABA), etilen (ET), jasmonat (JA), gibberellin (GA) ve sitokinin (CK)). DREB transkripsiyon faktörleri, bitki hormonlarına karşı oldukça

duyarlı ve bitki hormonu sinyal yolunda önemli bir rol oynamaktadır (Şekil 2.6) (Zhang ve Xia, 2023).

Şekil 2.6. DREB proteinleri, ABA, ET, JA, GA ve CK sinyalleri aracılığıyla bitki büyümesine ve gelişmesine ve abiyotik strese yanıt modeline aracılık eder. ABA sinyali, DREB geninden bağımsız olarak soğuk stresine yanıt verebilir ve kuraklık stresi altında DREB proteinlerini düzenleyebilir. Absisik asit (ABA), etilen (ET), jasmonat (JA), gibberellin (GA) ve sitokinin (CK) (Zhang ve Xia, 2023).

Tablo 2.3. Farklı bitkilerden izole edilen DREB genleri ve çeşitli abiyotik streslere transkript tepkileri *cbf1: dreb1b, cbf2: dreb1c, cbf3: dreb1a; (*) sürekli ekspresyon; (–) çalışılmamış (Agarwal vd., 2006).

Türler	DREB tipi	Streste ifadesi			
		Soğuk	Kuraklık	Tuzluluk	ABA
Arabidopsis	CBF1: U77378	Evet	Hayır	–	Hayır
	CBF2: AF074601	Evet	–	–	–
	CBF3: AF074602	Evet	–	–	–
Arabidopsis	DREB1A: AB007787	Evet	Hayır	Hayır	Hayır
	DREB2A: AB007790	Hayır	Evet	Evet	Evet
Arabidopsis	CBF1: U77378	Evet	Hayır	–	Hayır
	CBF2: AF062924	Evet	Hayır	–	Hayır
	CBF3: AF062925	Evet	Hayır	–	Hayır
Kanola	CBF gibi: AF370733, AF370734	Evet	–	–	–

Türler	DREB tipi	Streste ifadesi			
		Soğuk	Kuraklık	Tuzluluk	ABA
Buğday	CBF gibi: AF376136	Evet	–	–	–
Çavdar	CBF gibi: AF370728, AF370729, AF370730	Evet	–	–	–
Domates	CBF gibi: AY034473	Evet	–	–	–
Tütün	Tsi1: AF058827	-	–	Evet	–
Arpa	CBF3: AF239616	Evet	Hayır	–	Hayır
	CBF1: AF298230	-	–	–	–
Arabidopsis	CBF4: AB015478	Hayır	Evet	–	Evet
Pirinç	DREB1A: AF300970	Evet	Hayır	Evet	Hayır
	DREB1B: AF300972	Evet	Hayır	Hayır	Hayır
	DREB1C: AP001168	*	*	*	*

Türler	DREB tipi	Streste ifadesi			
		Soğuk	Kuraklık	Tuzluluk	ABA
	DREB1D: AB023482	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır
	DREB2A: AF300971	Hayır	Evet	Evet	Hayır
Buğday Xiaoyan54	DREB2: AF303376	Evet	Evet	Evet	Evet
Atriplex hortensis	DREB1: AF274033	–	–	Evet	–
Biber	DREB1: AY496155	Hayır	Evet	Evet	Hayır
Buğday	CBF2-1: AB178166	Evet	Evet	–	Hayır
	CBF2-2: AB178167	Evet	Evet	–	Hayır
Soya fasulyesi	DREBa: AY542886	Evet	Evet	Evet	Evet
	DREBb: AY296651	Evet	Evet	Evet	Hayır
	DREBc: AY244760	Hayır	Evet	Evet	Evet

2.3.2. SNP (Tek Nükleotit Polimorfizmi)

Bir nükleotid dizisindeki tek nükleotidin değişikliği, silinmesi veya eklenmesi tek nükleotid polimorfizmi (SNP) olarak adlandırılır. Genetik lokusta farklı alleller meydana getirecek şekilde baz veya bazlarda meydana gelen SNP'ler nokta mutasyonlarının yol açtığı polimorfizmlerdir. SNP'ler kodlama bölgesinde, intronların içinde yer alır veya kodlama bölgelerinin dışında olabilir. Bu nedenle SNP'ler birkaç farklı sınıfa ayrılabilir. Bir gendeki SNP pozisyonuna bağlı olarak, SNP'ler ekzon (eSNP), intron (iSNP) ve promotor SNP (pSNP) olarak sınıflandırılabilirler (Irshad vd., 2021, Karcicio, 2006).

Bir genin ifade edildiği kısımlarda yer alan fonksiyonel SNP'ler, amino asitleri kodlayan kodondaki birinci veya ikinci nükleotid dizisini değiştirebilir. Bu değişim de enzimlerin aktivitelerini değiştiren protein yapısını değiştirebilir ve bitkilerde arzu edilen veya istenmeyen özelliklerin ortaya çıkmasına neden olabilir. Genlerin ekzon kısımlarında bulunan fonksiyonel SNP'ler, biyotik ve abiyotik streslerin seviyesini kontrol edebilir. Ayrıca ifade edilen bölgeyi değiştirerek abiyotik ve biyotik strese toleransın sağlanmasında rol alabilirler (Korsa ve Feyissa, 2022, Morgil ve diğ., 2020).

Genomdaki DNA dizi varyasyonunun belirlenmesi bitki genetiği ve ıslahı açısından oldukça önemlidir. SNP'lerin seçimi, büyük ölçekli popülasyonlarda istenen hatların seçilmesine olanak sağlamaktadır. SNP'ler belirli genlerdeki veya genomik bölgelerdeki çeşitliliği değerlendirmek için son yıllarda çalışılmaktadır.

Soya fasulyesinin genom büyüklüğü yaklaşık 1,1 Gb olup 46.430 protein kodlayan gen içerir. Yapılan çalışmalarda dört milyondan fazla SNP'yi tanımlanmıştır. Bunların %20.4'ü genleri kodlayan bölgede bulunurken geri kalanları genler arasındaki bölgede yer alır. Ayrıca soya fasülyesinde kuraklık stresiyle ilişkili genlerde 6.000'den fazla SNP bulunmuştur. (Hug ve diğ. 2016).

Transkripsiyon faktörlerinden DREB1 ve DREB2, bir dizi abiyotik stresle ilişkili genleri indükleyerek bitkilere stres toleransı kazanmasında rol oynarlar. Bu nedenle bu transkripsiyon faktörleri ile ilgili SNP'in de araştırılması çok önemlidir. Özellikle ülkemizde geliştirilen Ataem-07 soya çeşidi için bu çalışma ilk olacaktır.



3. MATERYAL VE METOD

3.1.Bitkilerin İn – Vivo Ortamda Yetiştirilmesi

Bu tez çalışmasında kullanılan Ataem-07 soya fasulyesi çeşidine ait tohumlar Karadeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'nden temin edilmiştir. Soya fasulyesi tohumları, içerisinde toprak bulunan plastik ekim kaplarına (5 cm çap-6,5 cm yükseklik) ekilmiştir. Plastik kaplar 40 x 25 cm ebatlarındaki plastik tepsilere yerleştirilmiş ve bitkiler Tablo4' de içeriği verilen Hoagland besin solüsyonu ile sulanmıştır. Soya fasulyesi bitkileri 14 gün boyunca 25 °C sıcaklık 16 saat gündüz, 8 saat gece olacak şekilde T.C İstanbul Kültür Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Bitki Biyoteknolojisi Laboratuvarına ait iklim odasında optimum koşullarda çimlendirilmiştir.

Toprak içeren plastik bitki büyütme kaplarında çimlendirilen soya bitkileri, Hoagland besin solüsyonu verilerek 14 gün süre ile iklimlendirme odasında yetiştirilmiştir. 14. gün sonunda soya bitkileri 0, 1, 3, 5, 7 gün olarak kuraklık stresine maruz bırakılmıştır. Kuraklık stresi boyunca gerekli gözlemler Şekil 3.1 ve Şekil 3.2'de olduğu gibi yapılmıştır. 0, 1, 3, 5, 7 gün boyunca kuraklık stresine maruz bırakılan soya fasulyesi bitkileri hasat edilmiştir. Hasat edilen bitkiler aşağıda Şekil 3.1 ve Şekil 3.2'de görülmektedir. Kuraklık stresinin soya fasulyesi üzerinde etkisini belirlemek amacı ile bitki boyu, kök uzunluğu ve yaş ağırlıkları saptanmıştır.



Şekil 3.1. Soya fasulyesi bitkilerine ait kontrol grubu bitkileri.



Şekil 3.2. Soya fasulyesi bitkilerine ait 7. gün kuraklık stresi bitkileri.

Tablo 3.1. Hoagland besin solüsyonu içeriği ve miktarları (Hoagland ve Arnon 1950).

Stok	Kimyasal adı	Solüsyondaki Konsantrasyonu	Molekül Ağırlığı	Stok Konsantrasyonu (mM)	1L Solüsyon için Alınan Stok Miktarı (ml)
A	KNO ₃	6,5 Mm	101,11	812	8
	Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	4 mM	236,16	500	
B	NH ₄ H ₂ PO ₄	2 mM	115,03	250	8
	MgSO ₄ .7H ₂ O	2 mM	246,47	250	
C	H ₃ BO ₃	4,6 µM	61,83	4,6	1
	MnCl ₂ .4H ₂ O	0,5 µM	197,9	0,5	
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,2 µM	287,54	0,2	
	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	0,1 µM	1235,9	0,1	
	O	0,2 µM	5	0,2	
	CuSO ₄ .5H ₂ O		249,7		
D	FeCl ₃	45 µM	162,2	45	1

3.2.Malondialdehid Miktarı Tayini (MDA)

Soya fasulyesi bitkilerine uygulanan kuraklık stresi sonucu meydana gelen oksidatif stresin oluşturduğu bir lipid peroksidasyon ürünü olan malondialdehid (MDA) miktarı kolorimetrik olarak saptanmıştır. Soya fasulyesi bitkilerinden alınan 0,1 g yaprak 1 mL distile su eklenerek havan içerisinde homojenize edilmiştir. İçerisinde %0,5 (v/w) tiobarbitürik asit bulunan %20'lik trikloroasetik asit çözeltisinden aynı oranda eklenen örnekler 95 °C' de 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda meydana gelen kolorimetrik reaksiyonları sonlandırmak için örnekler buz banyosuna yerleştirilmiştir. Örnekler +4 °C'de 10000 x g hızda santrifüj edilmiş süpernatant kısımları alınarak yeni mikrofüj tüplerine aktarılmıştır. Süpernatantların absorbans değerleri 532 ve 600 nm dalga boylarında ölçülmüş ve sonuçlar µmol MDA/g.TA cinsinden bulunmuştur (Stewart ve Bewley, 1980).

3.3.Prolin Konsantrasyon Tayini

Kuraklık stresinin Ataem-07 soya fasulyesi bitkisi çeşidi üzerinde meydana getirmiş olduğu oksidatif strese karşı, koruyucu bir role sahip olan prolin seviyeleri tespit edilmiştir. Soya fasulyesi bitkilerinden 0,1 g yaprak örneği alınarak %3'lük (w/v) sülfosalisilik asit ile havan içerisinde homojenize edilmiştir. 10000 x g hızda 15 dakika santrifüj edilen örneklerin süpernatant kısımları eşit hacimlerde asetik asit ve ninhidrin ile 100 °C'de 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda mikrofüj tüpleri buz içerisine yerleştirilerek reaksiyon sonlandırılmıştır. Elde edilen reaksiyon karışımı içerisinde bulunan prolin moleküllerinin eldesi için karışım toluen ile ekstrakte edilmiştir. Konsantrasyon ölçümleri spektrofotometrik olarak 520 nm dalga boyunda yapılmıştır. Ölçüm sonucu hesaplamalar prolin standardı ile hazırlanmış standart kalibrasyon eğrisine göre µg/µL proline g⁻¹.TA cinsinden verilmiştir (Bates vd.,1973).

3.4.Genomik DNA İzolasyonu

Moleküler analizlerde kullanılmak üzere soya bitkisi genomik DNA izolasyonları Thermo Scientific® GeneJET Plant Genomic DNA Purification Mini Kit kullanılarak yapılmıştır. Kit protokolüne göre 100 mg yaprak örneği sıvı azot ile dondurularak havan yardımı ile homojenize edilmiştir. Homojenatın üzerine 350 µL of Lizis Tampon A eklenerek 10-20 saniye vortekslenmiştir. Vorteksin ardından karışımın üzerine 50 µL Lizis Tampon B ilave edilmiştir. 20 µL RNase A eklenmesinin ardından 65 °C’de 10 dakika inkübasyon beklenmiştir. İnkübasyon sonucunda 130 µL çöktürme solüsyonu eklenerek karıştırılmış ve 5 dakika buzda inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi dolduğunda örnekler 20000 x g hızda 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant santrifüj tüpüne transfer edilmiş ve üzerine 400 µL bitki gDNA Bağlanma Solüsyonu, 400 µL %96’lık ethanol eklenerek karıştırılmıştır. Karışımın yarısı spin kolona transfer edilmiş ve 6000 x g hızda 1 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılarak karışımın diğer yarısı spin kolona transfer edilmiş ve 6000 x g hızda 1 dakika santrifüj edilmiştir. Spin kolona 500 µL yıkama tamponu eklenmiş ve 8000 x g hızda 1 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılarak 500 µL yıkama tamponu eklenmiş ve 20000 x g hızda 3 dakika santrifüj edilmiştir. Spin kolon üzerine 100 µL elüsyon tamponu eklenerek oda sıcaklığında 5 dakika inkübasyon beklenmiştir. İnkübasyon sonunda örnekler 8000 x g hızda 1 dakika santrifüj edilmiştir. İzole edilen örneklerin konsantrasyonları ve saflıkları Implen NanoPhotometer NP80 ile ölçülmüştür. Genomik DNA’lar %0,8’lik agaroz jelde görüntülenmiştir.

3.5.RNA İzolasyonu

Moleküler analizlerde kullanılmak üzere soya bitkisi RNA izolasyonları TRIzol metoduna göre yapılmıştır. 100 mg yaprak örneği sıvı azot ile dondurularak havan yardımı ile homojenize edilmiştir. Homojenatın üzerine 1mL Trizol eklenmiş ve ependorf tüpe aktarılarak 5 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda 200 µL kloroform eklenerek 20 saniye karıştırılmış ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında örnekler 15 dakika 12000 x g hızda 15 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant yeni bir tüpe aktarılmış ve üzerine 1:1 oranında izopropanol eklenerek karıştırılmıştır. Örnekler oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilmiş ve 12000 x g hızda 15 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant

atılmış ve pellet üzerine 1 mL %75 etanol eklenmiş ve 7500 x g hızda 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılarak 7500 x g hızda 10 saniye santrifüj edilmiştir. Pellet 5 kurutulduktan sonra 30 µL RNaz- Free water eklenmiştir. İzole edilen örneklerin konsantrasyonları ve saflıkları Implen NanoPhotometer NP80 ile ölçülmüştür (Yang, vd., 2009). RNA'lar %2'lik agaroz jelde görüntülenmiştir.

3.6. cDNA Sentezi

Total RNA örnekleri ile iScript cDNA isolation kit prosedürüne uygun olarak cDNA eldesi sağlandı. cDNA sentezi için reaksiyon karışımı (4 µL 5X iScript Reaction Mix + 1 µL iScript Reverse Transcriptase + 14 µL Nuclease-free Su) son hacim 19 µL olacak şekilde prosedürde belirtildiği gibi hazırlanmıştır. Ardından 1 µL RNA örnekleri eklenerek Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) tüpleri PCR cihazına yerleştirilmiş ve Tablo 3.2' de belirtilen sıcaklık ve sürelerde protokol uygulanmıştır (Ibraheem vd., 2011).

Tablo 3.2. cDNA PCR amplifikasyon koşulları.

İşlev	Sıcaklık	Dakika
İlk aktivasyon	25°C	5 dk
Ters çevrim	46°C	20 dk
İn aktivasyon	95°C	1 dk
Durdurma	4°C	-

3.7.Gradient PCR

DREB genlerine ait belirlenen primer dizileri aşağıda Tablo 3.3’de belirtildi. Primer çiftleri ile kontrol grubu olan soya fasulyesi cDNA örnekleri ve negatif kontrol için Nuclease free water kullanılarak Gradient PCR yapıldı. Bu çalışma için Thermo Scientific PCR Master Mix (2X) kullanıldı.

Karışım; 12,5 µL mix + 9,5 Nuclease free water + 1 µL cDNA olacak şekilde hazırlandı, vortexte karıştırıldı ve 0,2 µL PCR tüplerine dağıtıldı. PCR tüplerine 1 µL Forward Primeri + 1 µL Reverse primeri eklenerek hazırlanan karışım tekrar vorteks cihazında karıştırıldı ve gradient PCR Thermo Scientific PCR Master Mix (2X) protokolüne göre gerçekleştirildi (Tablo 3.4).

Tablo 3.3. DREB genlerine ait belirlenen primer dizileri.

Primer İsmi	Sekans	Ürün Boyutu
DREB1	F 5’-AATCACTGCCCTCCTGGTCG-3’ R 5’-AAGTGGGTGGCGGAGATCAG-3’	181 bp
DREB2	F 5’-TCTCCTAAACCCGCTTCTTCCA-3’ R 5’-GCTCGCAACTGCAACTTCCC-3’	158 bp

Tablo 3.4. Gradient PCR protokolü

Adım	Sıcaklık	Zaman	Siklus
Başlangıç Denatürasyonu	95°C	3 dk	1
Denatürasyon	95°C	30 sn	30
Bağlanma	58-59-60-61- 62°C	30 sn	30
Uzaman	72°C	25 sn	30
Son uzama	72°C	10 dk	1

Elde edilen PCR sonucundaki en iyi primer bağlanma sıcaklığı agaroz jel elektroforezinde görüntülendi.

3.8.Hedef Genlerin İfade Analizinin qRT-PCR ile Gösterilmesi

Gen ekspresyon analizi için SYBR™ Green PCR Master Mix protokolüne uygun olarak bir deney düzeneği oluşturuldu. Her primer çifti için ayrı ayrı karışım hazırlandı. Bu karışımlar 1,5 mL eppendorf tüpleri içerisine 10 µL 2X SYBR™ Green PCR Master Mix + 1 µL Forward Primeri + 1 µL Reverse Primeri + 7 ul Nuclease Free water olarak hazırlandı ve vortekste karıştırılarak 0,1'lik platelere 19 µL olarak dağıtıldı. Ardından 1 µL cDNA örnekleri plate içerisine dağıtılarak 10-20 sn vortekslenerek ardından Applied Biosystems™ 7500 Fast Real-Time PCR cihazına aşağıdaki Tablo 3.5' de belirtilen koşullarda yerleştirildi. Endojen kontrol olarak EF1b primeri kullanıldı.

Tablo 3.5. qRT-PCR Amplifikasyonu döngü sıcaklık, süre ve sayıları.

Adım	Enzim Aktivasyonu	PCR	
		Siklus	
		Denatürasyon	Bağlanma/Son Uzama
Zaman	10 dk	15 sn	60 sn
Sıcaklık	95 °C	95 °C	60 °C

Soya fasulyesi kontrol grubu örneklerinden aşağıdaki Tablo 3.6’da gösterilen konsantrasyon değerlerinde seri dilisyon yapıp endojen kontrol EF1b primerleri ile reaksiyon kurularak standart sapma grafiği ve doğruluk (R^2) değeri belirlenmiştir.

Tablo 3.6. Standart örneklerinin konsantrasyon değerleri.

Örnek	Konsantrasyon ng/uL
Kontrol-0/Std1	1000.00
Kontrol-0/Std2	100.00
Kontrol-0/Std3	10.00
Kontrol-0/Std4	1.00

Real Time PCR sonuçlarından elde edilen Ct değerleri Şekil 3.3’de belirtilen Pfaffle formülasyonuna yerleştirilerek gen ekspresyonlarındaki artış ve azalış miktarları belirlendi.

$$\text{Gen ekspresyon oranı} = \frac{\left(\text{Etkinlik}_{\text{Hedef}} \right)^{\Delta \text{Ct hedef (kontrol-örnek)}}}{\left(\text{Etkinlik}_{\text{Referans}} \right)^{\Delta \text{Ct referans (kontrol-örnek)}}}$$

Şekil 3.3. Hedef gen ifadelerinin kontrol gen ifadesine göre değişimi (Pfaffle, 2001).

3.9. Agaroz Jelden DNA Ekstraksiyonu

Agaroz jel içerisinde alanan DNA parçası mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Alınan miktar üzerine 3 hacim ADB (Agarose Dissolving Buffer) eklendi ve 55 °C 'de 10 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası tüp karıştırılarak Zymo-Spin™ kolonuna aktarıldı. 1 dakikalık santrifüj sonrası üst faz atılarak kolona 200 µL DNA yıkama tamponu eklenerek 30 dakika santrifüj edildi. Üst faz atılarak yıkama adımı tekrarlandı. Santrifüj sonrasında 6 µL DNA Elution tamponu eklendi ve 1 dakika santrifüj edildi.

3.10. SNP Analizi

DNA izolasyonu ile elde edilen Ataem-07 soya çeşidine ait DNA örnekleri SNP analizi için Medsantek Laboratuar Malzemeleri Sanayi ve Ticaret Ltd. Şti. gönderildi ve analiz ettirildi.

3.11. İstatiksel Analizler

Soya fasulyesi bitkilerine ait kontrol ve farklı günlerde kuraklık stresin maruz bırakılmış bitkilerin in vivo koşullardaki büyüme parametrelerinden bitki boy uzunluğu, kök uzunluğu, yaş ağırlık ve morfolojik zararlanma değerlendirilmesinden elde edilen veriler ile farklı günlerde strese in vivo koşullarda maruz bırakıldıktan sonraki tüm biyokimyasal analizlerinin (lipid peroksidasyon, prolin, peroksidaz enzim aktivitesi) değerlendirilmeleri Rstudio istatistik programı kullanılarak yapılmıştır. Programda tek yönlü ANOVA testi yapılmış, testte istatistiksel olarak anlamlı bulunan grupların karşılaştırması Fisher- LSD testi ile yapılmıştır.

4. BULGULAR

4.1.Soya Fasulyesi Kuraklık Stresi Etkilerinin Tespiti

0, 1, 3, 5 ve 7 gün kuraklık stresi uygulanmış Ataem-07 soya fasulyesi bitkilerinde ortalama bitki boyları, ortalama bitki kök uzunlukları ve ortalama bitki yaş ağırlıkları saptanmıştır (Tablo 4.1 ve Tablo 4.2). Kontrol grubunda ortalama bitkilerin boyları, ortalama bitki kök uzunlukları ve ortalama bitki yaş ağırlıkları günlere paralel olarak artmıştır. Kuraklık stresi uygulanan soya bitkilerinde ise ortalama bitki boyları, kontrol bitkilerine kıyasla 5. güne kadar değişiklik göstermezken 7. günde bir azalma olmuştur. Kuraklık stresi uygulanan bitkilerde artan stres gününe paralel olarak ortalama bitki kök uzunlukları kontrol grubuna göre artmıştır. Kuraklık stresi uygulanan bitkilerde artan stres gününe paralel olarak ortalama yaş ağırlıkları kontrol grubuna göre azalmıştır (Tablo 4.1, Şekil 4.1, Şekil 4.2, Şekil 4.3).

Kuraklık stresinin, soya fasulyesi bitki boyları üzerine etkisi Şekil 3.1 ve Şekil 3.2’de gösterilmiştir. Soya fasulyesi bitkisine ait kontrol bitkilerinin ortalama bitki boyları sırayla 16,80 cm, 17,44 cm, 19,10 cm ve 20,44 cm olarak bulunmuştur. Kuraklık stresine maruz kalan bitkilerde ortalama bitki boyu sırasıyla 16,84 cm, 17,38 cm, 19,68 ve 17,50 cm olarak bulunmuştur (Şekil 4.1). Bitki boylarında meydana gelen bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Kuraklık stresinin ortalama bitki kök uzunluklarının kontrole göre artması istatistiksel olarak anlamlı bulunurken ortalama yaş ağırlıklarının yine kontrole göre azalması da istatistiksel olarak anlamlıdır (Şekil 4.2 ve Şekil 4.3).

Tablo 4.1. Soya fasulyesi ortalama bitki boyu(cm), kök uzunluğu(cm) ve yaş ağırlığı(g).

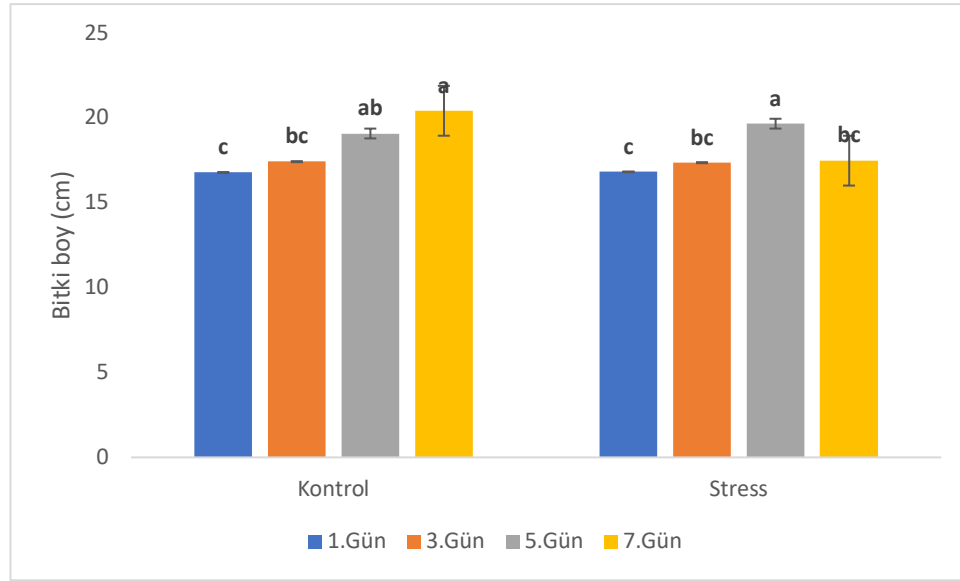
KONTROL	1.Gün	3.Gün	5. Gün	7. Gün
Boy	16,80±0,447 ^c	17.44±0.439 ^{bc}	19.10±0.380 ^{ab}	20.44±0.517 ^a
Kök Uzunluğu	14.30±1.788 ^c	15.70±1.303 ^c	19.10±0.380 ^b	20.44±0.517 ^{ab}
Yaş ağırlık	5.368±0.636 ^{cd}	6.690±0.987 ^{bc}	7.280±1.094 ^b	9.752±1.685 ^a

* Aynı harfle gösterilmeyenler, kontrol deney gruplarının ortalama bitki boyu, ortalama kök uzunluğu ve ortalama yaş ağırlık bakımından aralarındaki farkların, en az 0,05 önemli olduğunu ifade etmektedir. ± Standart Sapma.

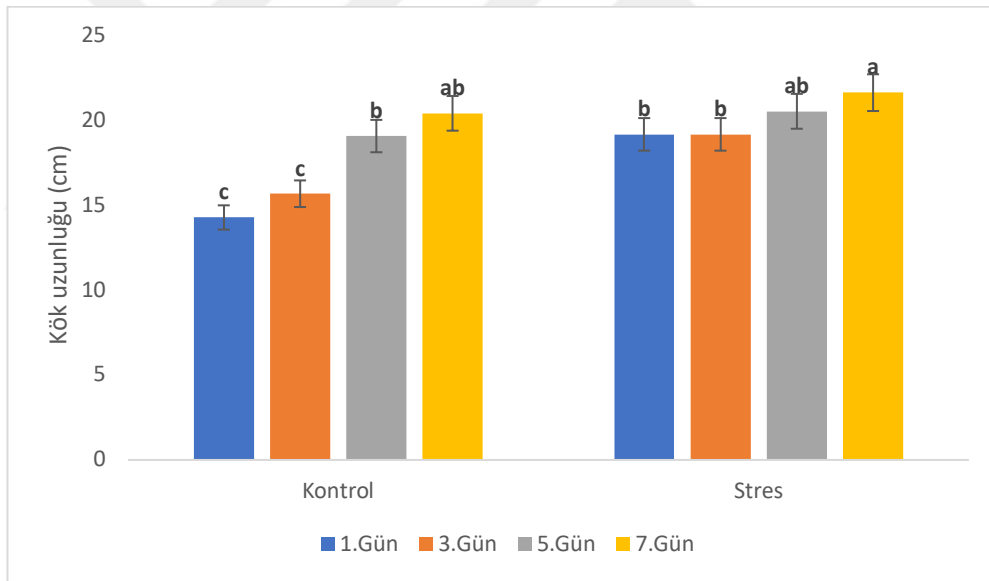
Tablo 4.2. Kuraklık stresinin soya fasulyesi bitkisi boy(cm), kök uzunluğu(cm), yaş ağırlığı(g) üzerindeki etkileri.

KURAKLIK STRESİ	1.Gün	3.Gün	5. Gün	7. Gün
Boy	16.84±1.858 ^c	17.38±0.759 ^{bc}	19.68±1586 ^a	17.50±0.634 ^{bc}
Kök Uzunluğu	19.20±0.778 ^b	19.20±1.151 ^b	20.56±0.626 ^{ab}	21.66±0.634 ^a
Yaş ağırlık	4.874±0.550 ^{de}	4.380±0.420 ^{de}	3.640±0.340 ^e	2.100 ±0.162 ^f

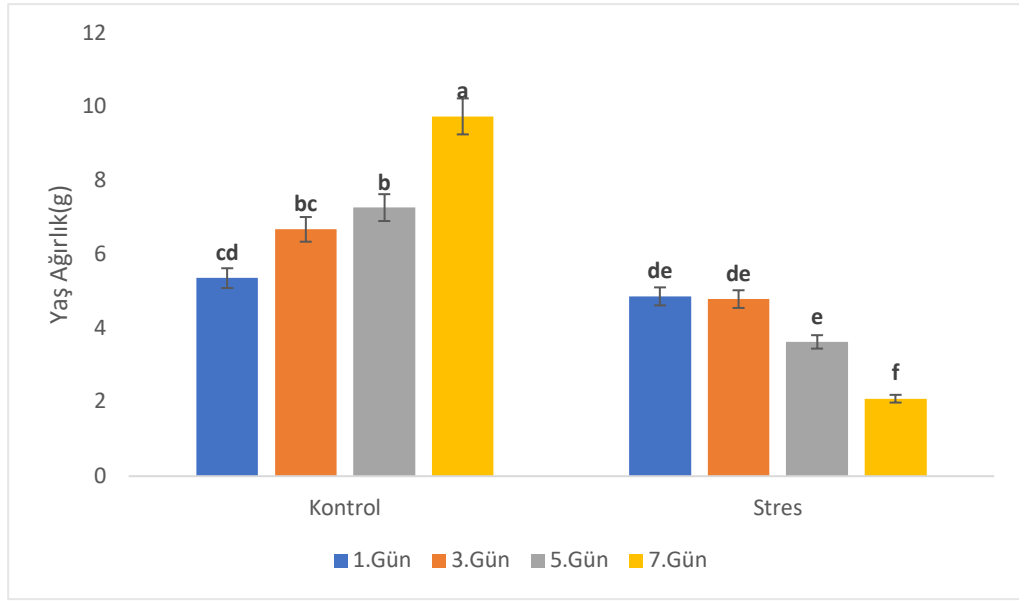
* Aynı harfle gösterilmeyenler, kuraklık stresi deney gruplarının ortalama bitki boyu, ortalama kök uzunluğu ve ortalama yaş ağırlık bakımından aralarındaki farkların, en az 0,05 önemli olduğunu ifade etmektedir. ± Standart Sapma.



Şekil 4.1. Kuraklık stresinin soya fasulyesi bitki boyları üzerindeki etkisi.



Şekil 4.2. Kuraklık stresinin soya fasulyesi bitki kök uzunluğu üzerindeki etkisi.



Şekil 4.3. Kuraklık stresinin soya fasulyesi bitki yaş ağırlıkları üzerindeki etkisi.

4.2.Malondialdehid Miktarı Tayini

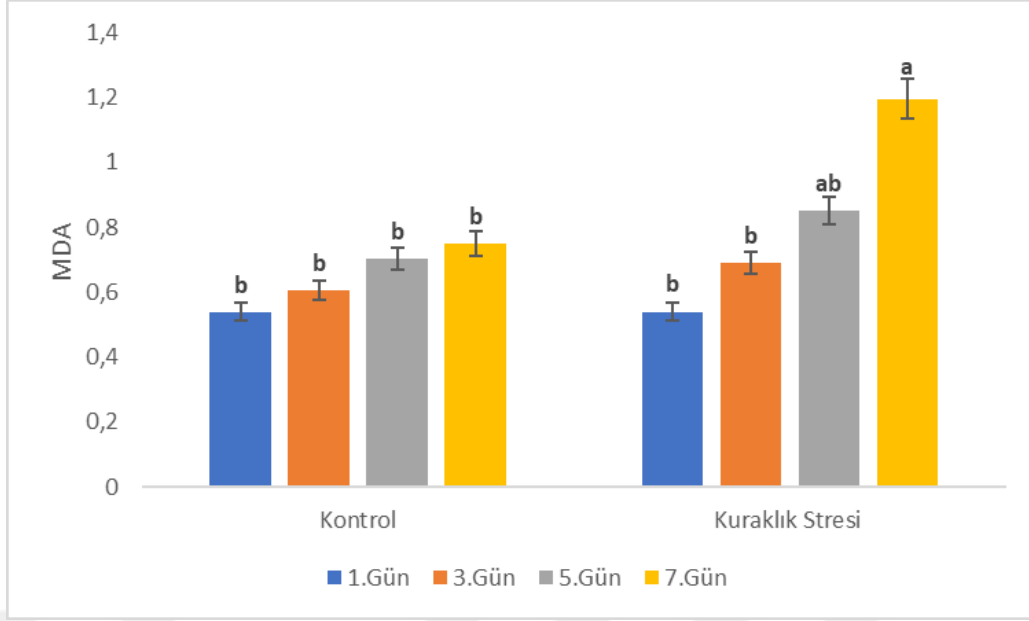
Kuraklık stresinin Ataem-07 soya fasulyesi üzerindeki etkisi oksidatif stresin meydana getirdiği lipid peroksidasyonun ürünü olan malondialdehid (MDA) miktarının kolorimetrik olarak ölçülmesi ile saptanmıştır. Kuraklık stresi etkisi ile oksidatif strese bağlı olarak soya fasulyesinde MDA miktarının arttığı tespit edilmiştir (Şekil 14). Soya fasulyesi bitkisine ait kontrollerde MDA miktarı 0,538, 0,606, 0,703 ve 0,749 U/mol.g⁻¹TA bulunurken, kuraklık stresi uygulanan bitkilerin MDA miktarı 0,539, 0,69, 0,849 ve 1,195 U/mol.g⁻¹TA oranında bulunmuştur (Tablo 4.3).

Tablo 4.3. Kuraklık stresinin soya fasulyesi MDA oranlarına etkisi.

MDA	1.Gün	3.Gün	5. Gün	7. Gün
Kontrol	0.538±0.067 ^b	0.606±0.040 ^b	0.703±0.058 ^b	0.749±0.059 ^b
Kuraklık Stresi	0.539±0.239 ^b	0.69±0.082 ^b	0.849±0.288 ^{ab}	1.195±0.252 ^a

* Aynı harfle gösterilmeyenler, kontrol ve stres deney gruplarının ortalama MDA miktarı bakımından aralarındaki farkların, en az 0,05 önemli olduğunu ifade etmektedir. ± Standart Sapma

Kontrol soya fasulyesi bitkileri MDA oranları arasında istatistiksel bir fark bulunamamıştır. Kuraklık stresi uygulanmış soya fasulyesi bitkilerinin tamamında lipid peroksidasyon, stres uygulanmamış kontrollerine göre artış göstermiştir. Kuraklık stresi uygulanmış soya fasulyesi bitkileri arasında en yüksek lipid peroksidasyon 1,195 U/mol.g⁻¹TA değeri ile 7. gün bitkilerinden elde edilmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Kontrol ve Kuraklık stresi uygulanan soya fasulyesi MDA oranları. Farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklılıklar, 0.05 seviyesinde önemlidir.

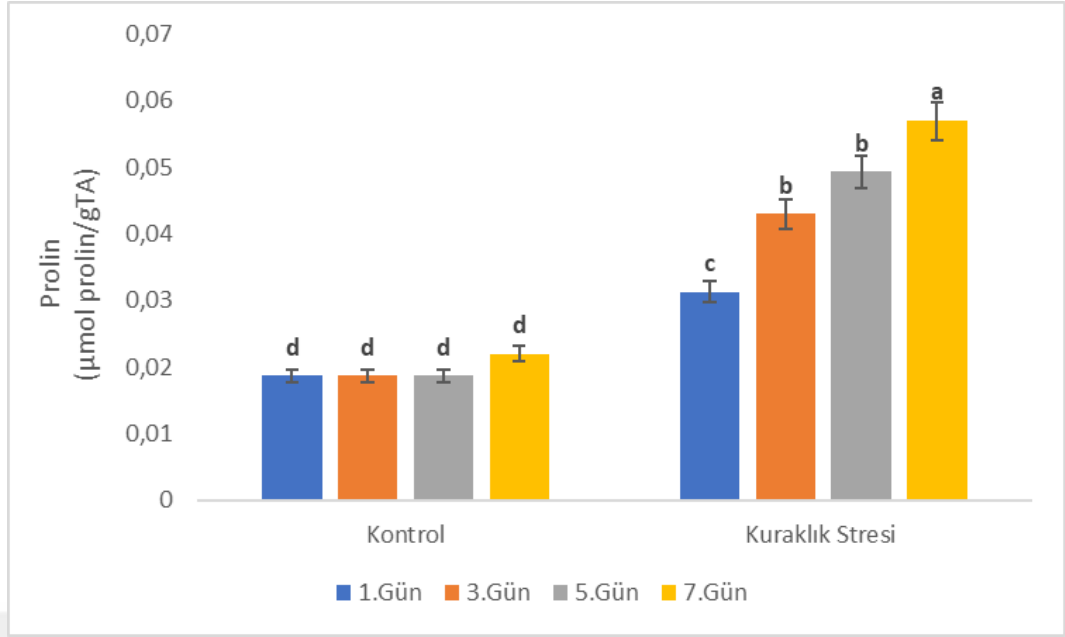
4.3.Prolin Konsantrasyonu Tayini

Oksidatif strese karşı koruyucu osmoprotektan rolü olan prolin konsantrasyonu Bates vd. (1973) metoduna göre tespit edilmiştir. Soya fasulyesi kontrol bitkilerinde prolin konsantrasyonu 0,018 ve 0,022 $\mu\text{mol prolin/g.TA}$ iken, kuraklık stresi uygulanan bitkilerde ise 0,031, 0,043, 0,049 ve 0,057 $\mu\text{mol prolin/g.TA}$ olarak bulunmuştur. Prolin konsantrasyonu kuraklık stresi uygulanan ve stres uygulanmayan bitkilerde en yüksek değerlere 7. günde ulaşmıştır (Şekil 4.5). Kuraklık stresi uygulanmasının ardından kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı seviyelerde prolin artışı saptanmıştır.

Tablo 4.4. Kuraklık stresinin soya fasulyesi Prolin miktarı oranlarına etkisi.

PROLİN	1.Gün	3.Gün	5. Gün	7. Gün
Kontrol	0.018 $\pm$ 0.002 ^d	0.018 $\pm$ 0.005 ^d	0.018 $\pm$ 0.003 ^d	0.022 $\pm$ 0.002 ^d
Kuraklık Stresi	0.031 $\pm$ 0.0005 ^c	0.043 $\pm$ 0.001 ^b	0.049 $\pm$ 0.001 ^b	0.057 $\pm$ 0.002 ^a

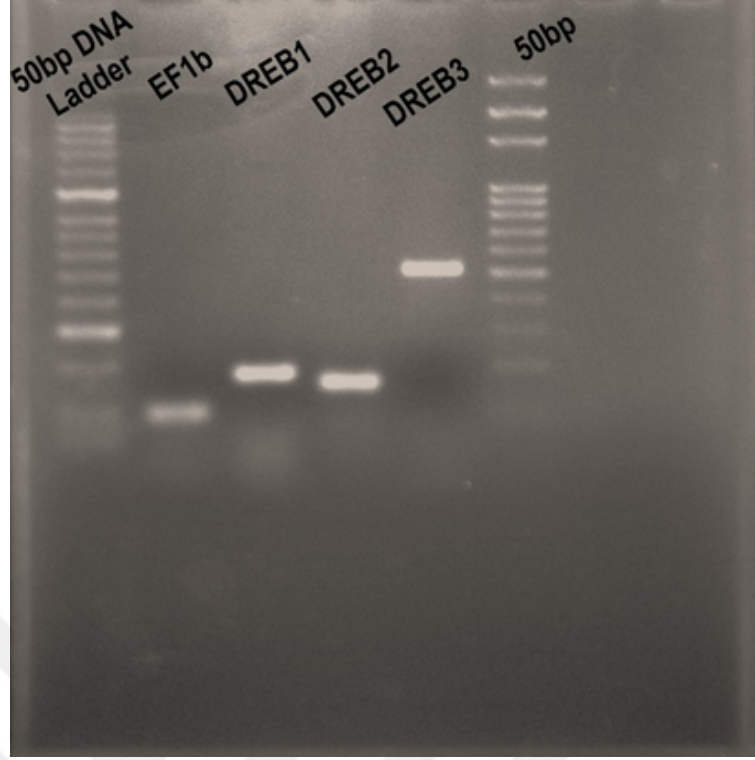
* Aynı harfle gösterilmeyenler, kontrol ve stres deney gruplarının ortalama Prolin miktarı bakımından aralarındaki farkların, en az 0,05 önemli olduğunu ifade etmektedir. $\pm$ Standart Sapma



Şekil 4.5. Kuraklık stresinin soya fasulyesi prolin konsantrasyonları üzerine etkileri. Farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklılıklar, 0.05 seviyesinde önemlidir.

4.4. Gradient PCR sonuçları

Gradient PCR sonuçlarına göre primerler en iyi DREB1; 61°C, DREB2; 62°C, EF1b; 60°C’ de çalışmıştır. Primerlerin bağlanma sıcaklıklarını belirlemek için soya fasulyesi kontrol grubu örneklerinden elde edilen cDNA’lar kullanıldı. Örnekler %2’lik olarak hazırlanan agaroz jelde 80V’da 45 dk yürütüldükten sonra Şekil 4.6’daki sonuçlar elde edilmiştir.



Şekil 4.6. 60-61-62 °C’de kurulan Gradient PCR çalışma sonucu.

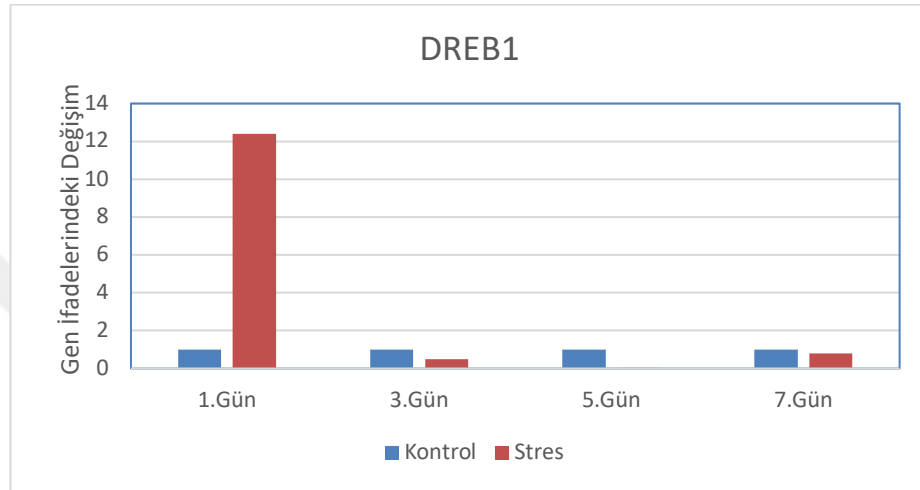
4.5. Hedef Genlerin İfade Analizinin qRT-PCR ile Gösterilmesi

Kuraklıkla ilişkili olarak belirlediğimiz gen bölgelerindeki ekspresyon değişimleri incelendiğinde EF1b, DREB1 ve DREB2 gen bölgesinden elde edilen Ct değerleri aşağıdaki Tablo 4.5’ te verilmiştir.

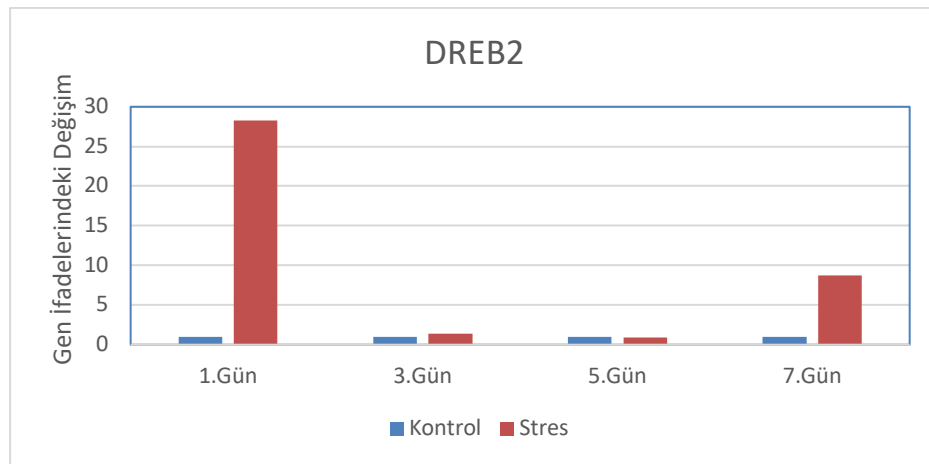
Tablo 4.5. ELF1b, DREB1 ve DREB2 gen bölgelerinden elde edilen Ct değerleri.

Örnek	Hedef Genler		
Kontrol	ELF1b	DREB1	DREB2
	Ct	Ct	Ct
	30,33	31,18	31,99
Kuraklık 1.Gün	ELF1b	DREB1	DREB2
	Ct	Ct	Ct
	30,33	31,18	31,99
Kuraklık 3.Gün	ELF1b	DREB1	DREB2
	Ct	Ct	Ct
	26,73	30,88	30,57
Kuraklık 5.Gün	ELF1b	DREB1	DREB2
	Ct	Ct	Ct
	24,15	30,21	27,04
Kuraklık 7.Gün	ELF1b	DREB1	DREB2
	Ct	Ct	Ct
	25,06	28,7	26,56

Elde edilen Ct değerleri Şekil 3.3 'de belirtilen Pfaffl formülasyonuna yerleştirilerek, Kontrol-0, Kuraklık-1, Kuraklık-3, Kuraklık-5, Kuraklık-7. Gün bitkilerindeki hedef gen bölgelerinin ekspresyon seviyelerindeki değişimler aşağıdaki Şekil 7.7, Şekil 4.8' de gösterilmiştir. DREB1 geninde kontrol grubuna göre kuraklık stresine karşı 1. günde gen ekspresyon seviyelerinde bir fark tespit edilirken, DREB2 geninde kontrol grubuna göre 1.ve 7. günlerde gen ekspresyon seviyeleri farklılıklar göstermiştir (Şekil 4.7 ve Şekil 4.8).



Şekil 4.7. DREB1 geni Kontrol ve Kuraklık grubundaki gen ekspresyon seviyelerindeki değişim.



Şekil 4.8. DREB2 geni Kontrol ve Kuraklık grubundaki gen ekspresyon seviyelerindeki değişim.

4.6. SNP Analizi

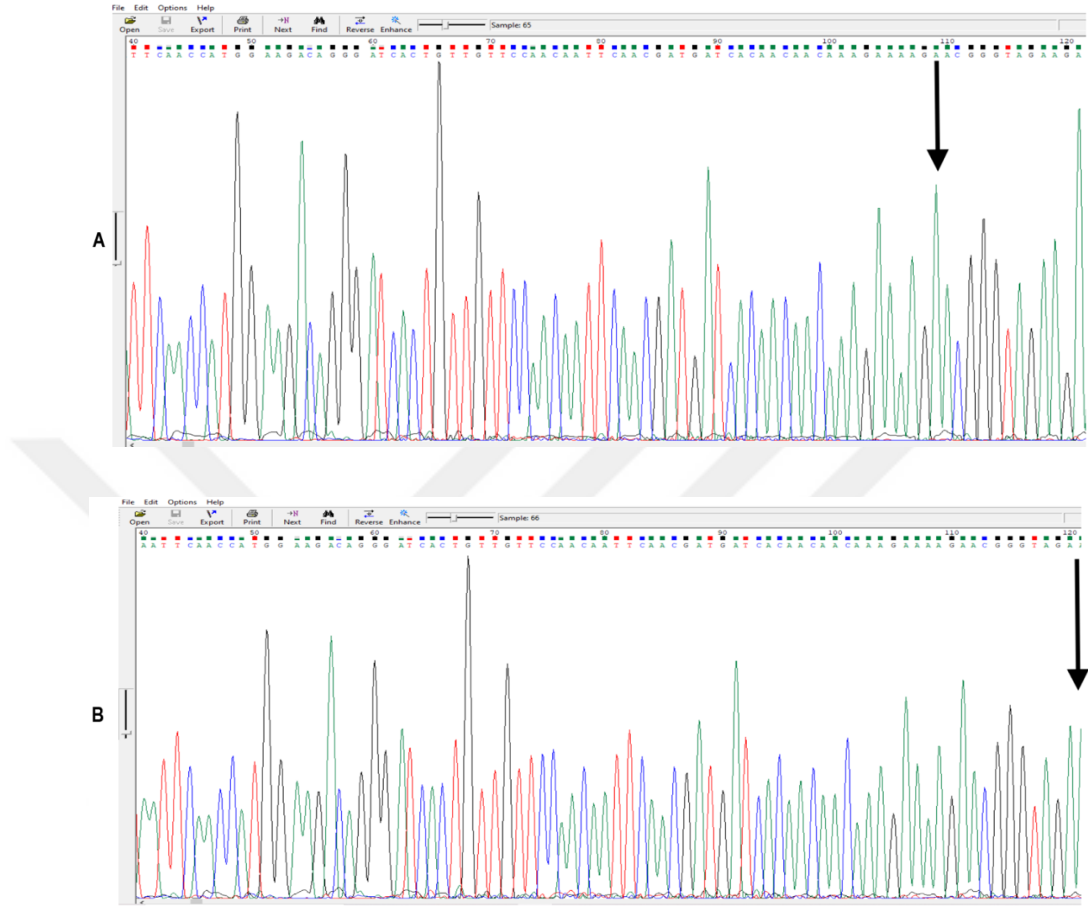
Ataem-07 soya çeşidinin SNP analizi ile kuraklık stresi altındaki durumu belirlenmiştir. DREB1 geni kontrol ve stres grubu arasındaki diziler Şekil 4.9’da verilmiş olup, kontrol grubunda 109. amino asit aspartik asitten asparajin olmuştur. Stres grubu dizilerine bakıldığında ise 121. amino asit alanin treonin’e dönmüştür.

DREB1 geni 3. gün kontrol ve stres grubu arasındaki dizilere bakıldığında bir baz kaybı olduğu ve 39. amino asit arjinin, glutamik aside dönüştüğü saptanmıştır (Şekil 4.10).

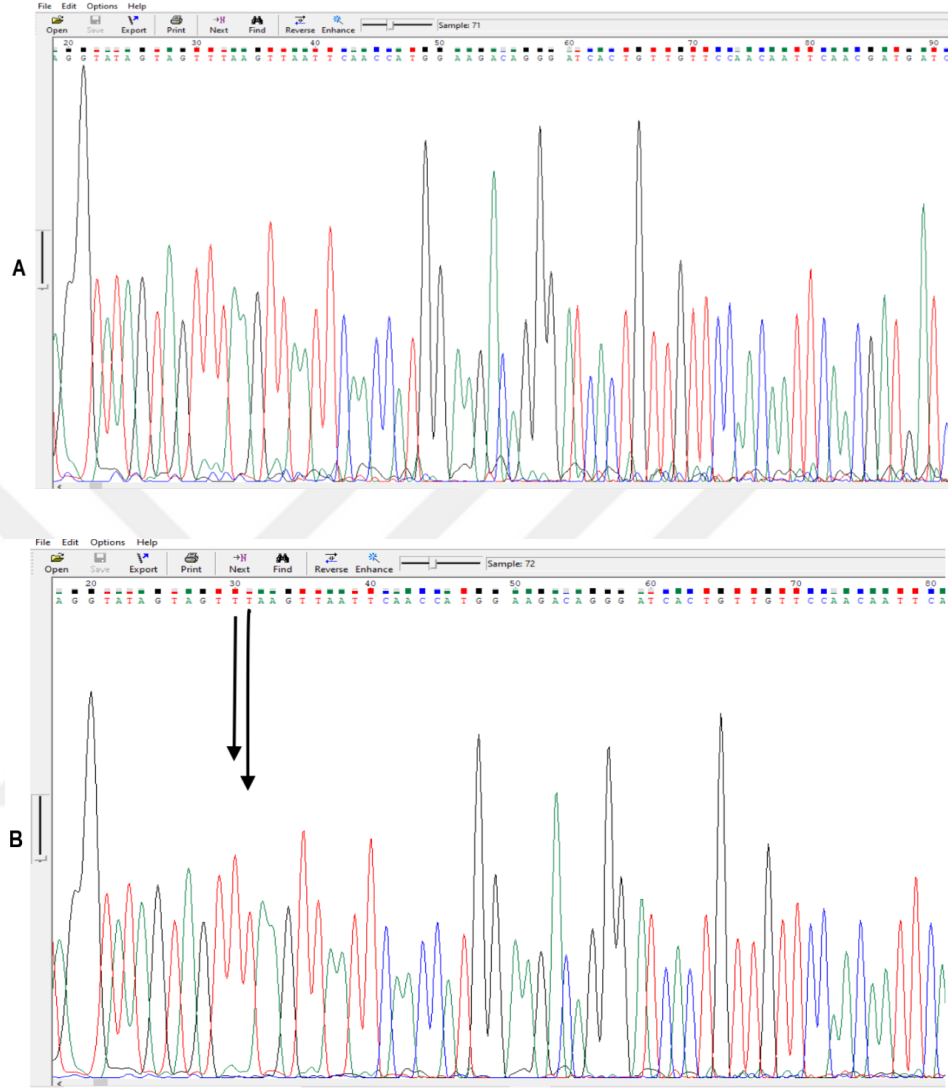
DREB1 geni 5.gün kontrol ve stres grubu dizi analizlerinde değişim saptanmamıştır. DREB1 geni 7.gün kontrol ve stres grubu dizi analizlerinde ise 30. aminoasit aspartik asitten glutamik aside dönmüştür. Ayrıca baz eklenmesi sonucu 31. amino asit sonrası çerçeve kayması gerçekleşmiştir (Şekil 4.11).

DREB2 geni 1.gün kontrol ve stres grubu dizi analizlerinde herhangi bir değişim saptanmamıştır (Şekil 4.12). Ayrıca 3. ve 5.gün kontrol ve stres gruplarında herhangi bir SNP saptanmamıştır.

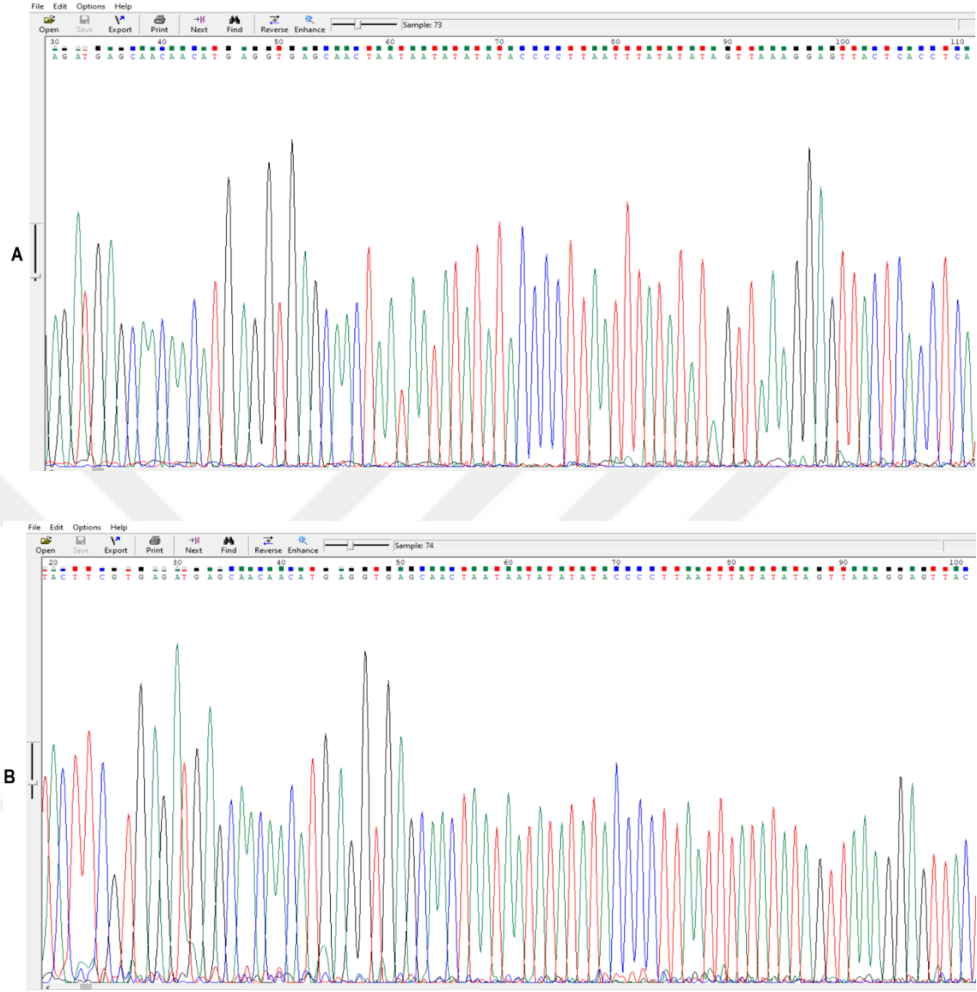
DREB2 geni 7.gün kuraklık ve stres grubu dizi analizinde ise sadece 3’ UTR bölgesinde bir SNP saptanmıştır.



Şekil 4.9. DREB1 1. gün kontrol (A) ve stres (B) grubu arasındaki diziler. Kontrol grubunda 109. amino asit aspartik asitten asparajin olmuştur. Stres grubu dizilerine bakıldığında ise 121. amino asit alanin treonin'e dönmüştür.



Şekil 4.11. DREB1 7. gün kontrol (A) ve stres (B) grubu SNP analizleri. Kontrol ve stres grubu dizi analizlerinde 30. aminoasit aspartik asitten glutamik aside dönüşmüştür ve eklenmesi sonucu 31. amino asit sonrası çerçeve kayması gerçekleşmiştir.



Şekil 4.12. DREB2 1. gün kontrol (A) ve stres (B) grubu SNP analizleri. Kontrol ve stres grubu dizi analizlerinde herhangi bir değişim saptanmamıştır.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Yapılan bu tez çalışmasında, soya fasulyesi kuraklık stresi altında vermiş olduğu morfolojik ve biyokimyasal cevaplar ile DREB1 ve DREB2 genlerinin ifadelerinin ortaya konulması amaçlanmıştır.

Bu tez kapsamında soya fasulyesi bitkisine ait kontrol grupları ve 1, 3, 5, 7 gün kuraklık stresine maruz bırakılan bitkilerin ortalama bitki boyları, bitki yaş ağırlıkları ve kök uzunlukları tespit edilmiştir. Tüm uygulama gruplarında ortalama bitki kök uzunluğu artan kuraklık stresi günlerine paralel olarak kontrole göre artarken, kuraklık stresi uygulanan bitkilerde artan stres gününe paralel olarak ortalama yaş ağırlıkları kontrol grubuna göre azalmıştır.

Kuraklığın bitkilerde bitki boyu ve yaş ağırlığı üzerine olumsuz etkileri olduğu pek çok çalışma ile gösterilmiştir (Babaei vd., (2021) Meksika kadife çiçeği (*Tagetes minuta* L.) bitkisinin kuraklık stresine morfolojik, fizyolojik ve fitokimyasal tepkilerini araştırdıkları çalışmalarında bitkiye kuraklık stresi uygulamışlardır. Bitki büyümesi kuraklık stresinden etkilenmiştir. Kuraklık stresinin etkilerini bitki boyu, gövde çapı, yaprak, çiçeklenme, taze ve kuru ağırlığı parametreleri üzerinden değerlendirmişlerdir. Sonuç olarak gözlemlenen tüm parametreler doğrultusunda kuraklık stresinden önemli ölçüde etkilendiklerini tespit etmişlerdir. Kuraklığın bitkilerde, kök uzunluğu üzerindeki etkileri de pek çok çalışma ile gösterilmiştir.

Kachare vd., (2022) yapmış olduğu çalışmada kuraklık stresi altında altı genotipe ait 60 günlük soya bitkilerini, on günlük kuraklık stresine tabi tutmuşlardır. Araştırmacılar kuraklık stresi koşullarında, bitkilerin taze ve kuru ağırlıklarının daha düşük olduğunu saptarken kök uzunluğunun arttığını göstermişlerdir.

Khodabin vd., (2020) kuraklık stresinin kanola çeşitlerinin morfolojik ve fizyolojik özelliklerine etkisini araştırdıkları çalışmada, kuraklık stresi altındaki kanolanın bitki boyu, kök uzunluğu, yaş ve kuru ağırlığı üzerinde etkileri gözlemlenmiş ve bildirilmiştir.

Bitkiler maruz kaldıkları biyotik ve abiyotik streslere karşı savunma mekanizmaları geliştirmiştir. Enzimatik ve enzimatik olmayan bu savunma mekanizmaları birçok önemli bileşene sahiptir. Özellikle moleküler ağırlığı düşük olan ve hücre içerisindeki çözünürlüğü yüksek, yüksek konsantrasyonlara sahip olan ve toksik etki yaratmayan organik moleküller olan ozmoprotektanlar enzimatik olmayan savunma mekanizmaları için oldukça önemli bileşenlerdir. Bu ozmoprotektanlar içerisinde yer alan prolin, bitkilerde abiyotik ve biyotik stres faktörlerin sonucu olarak bitki içerisinde birikim göstermektedir (Verbruggen ve Hermans, 2008; Mattioli vd., 2009; Hayat vd., 2012).

Bitkiler, kuraklık stresine tepki olarak çeşitli morfo-fizyolojik ve biyokimyasal değişikliklere uğrayarak tolerans mekanizmalarını güçlendirmektedirler. Ozmotik stres toleransı, değişen stres seviyeleri ve iklim koşulları altında büyüme ve gelişmeyi kontrol altında tutmak için bir araya gelen morfolojik, anatomik ve fizyolojik özelliklerden kaynaklanmaktadır. Birçok bitki türü kuraklık stresi altında prolin biriktirmektedir ve bu da bunun ozmotik dengede önemli bir rol oynadığını göstermektedir.

Abiyotik ve biyotik streslerin bitkiler üzerinde meydana getirmiş olduğu fizyolojik etkiler lipid peroksidasyon, prolin birikimi ve çeşitli antioksidan enzimlerin aktivitelerinin belirlenmesi gibi biyokimyasal analizler ile değerlendirilmektedir (Mostofa vd., 2015; Chunthaburee vd., 2016; Ramesh vd., 2017).

Jafarnia vd., 2018'de yapmış oldukları çalışmada ise, kuraklık stresi altında incelemiş oldukları iran meşesi popülasyonlarında MDA içeriğinde artış olduğu tespit edilmiştir.

Çalışmamızda soya fasulyesinin 0, 1, 3, 5, ve 7 gün kuraklık stresine vermiş olduğu biyokimyasal cevapların belirlenmesinde prolin birikimi değerlendirilmiştir. Kuraklık stresi uygulamasının ardından istatistiksel olarak anlamlı artışlar tespit edilmiştir. Bates vd., (1973) metoduna göre, kuraklık stresi uygulanan soya bitkilerinde prolin konsantrasyonlarında kontrole göre artış gözlemlenmiştir. Kontrol bitkilerinde prolin konsantrasyonu 0,018 ve 0,022 $\mu\text{mol prolin/g.TA}$ iken, kuraklık stresi uygulanan bitkilerde ise 0,031, 0,043, 0,049 ve 0,057 $\mu\text{mol prolin/g.TA}$ olarak bulunmuştur.

Prolin konsantrasyonu kuraklık stresi uygulanan ve stres uygulanmayan bitkilerde en yüksek değerlere 7. günde ulaşmıştır.

Stewarf, 1973'te yapmış olduğu çalışmada, soya dokularında bol miktarda bulunan aminoasitlerden biri olan prolinin, soya yapraklarında önemli bir nr azot deposu olduğunu aynı zamanda, Bohnert ve Sheveleva 1998'de ki çalışmalarında prolinin bitkilerde serbest O₂ radikallerinin detoksifikasyonuna katıldığı bildirmektedir. Farklı bitkilerde kuraklık stresiyle birlikte prolin konsantrasyonunun artması, strese karşı toleransın göstergesi olarak kabul edilmektedir.

Hücresel yapıların bütünlüğünü korumada etkili olan prolin ile ilgili yapılan biyokimyasal çalışmalarda, kuraklık stresine uyum sağlayan bazı bitkilerin yapraklarında prolin biriktirdikleri gözlenmiş olup, aynı türün kuraklığa dayanıklı ve dayanıksız varyeteleri karşılaştırıldığında, dayanıklı olanların düzenli bir şekilde daha fazla proline sahip oldukları tespit edilmiştir. Ayrıca prolin serbest radikallerin ortadan kaldırılmasına yardımcı olarak stres altında hücresel redoks potansiyelinin sağlanması katkı sağlamaktadır (Hayat vd., 2012).

Prolin birikimi ve metabolizması, bitkilerde abiyotik stresten kaçınma mekanizmalarıyla ilişkilidir. Prolin birikimi genellikle ozmotik stres toleransını geliştirirken, prolin metabolizmasının ATP üretiminden reaktif oksijen türlerinin oluşumuna kadar değişen etkileri olabilmektedir. Wang vd., (2022) yapmış olduğu çalışmada prolin miktarının, kuraklık stresi altında kökler ve gövdelere kıyasla yapraklarda önemli ölçüde arttığı gözlemlenmiştir.

Dien vd., (2019) yapmış oldukları çalışma ile, kuraklık stresi altında eltik bitkilerinin yapraklarında kontrol grubuna kıyasla prolinin yüksek oranda biriktiğini ve daha şiddetli kuraklık stresinin daha fazla prolin birikimine yol açtığını ifade etmişlerdir. Elde edilen sonuçların, prolinin kuraklık stresi koşullarında yüksek oranda biriktiğini gösteren diğer çalışmalarla uyumlu olduğu belirtilmiştir. Ayrıca prolinin, yapraklarda daha fazla biriktiği, bu da yapraklardaki ozmotik stresin daha şiddetli olduğunu ifade etmişlerdir.

Oksidatif strese sebep olan abiyotik ve biyotik stres faktörleri, bitkilerde hücre membranlarının yapısında yer alan doymamış yağları oksitlerler. Bunun sonucu olarak lipid peroksidasyonuna sebep olurlar. Lipid peroksidasyonu, hücre zarının bütünlüğünün zarar görmesine, membran proteinlerinin yıkımına ve hücre iyon taşınımının azalmasına sebep olur. Stresin uzun süre devam etmesi veya şiddetinin yüksek olması durumunda hücre ölümünü tetikleyebilir. Hücre zarında yer alan lipidlerin oksitlenmesinin yan ürünü olan malondialdehitin stres altındaki bitkilerde arttığını bildiren pek çok çalışma yapılmıştır (Awasthi vd., 2017).

Çalışmamızda soya fasulyesi bitkilerinin 0, 1, 3, 5 ve 7 gün kuraklık stresi altında iken lipid peroksidasyon ürünü olan MDA miktarları saptanmıştır. Kuraklık stresi günlerinin artışına bağlı olarak MDA birikimi istatistiksel olarak önemli artış göstermiştir. En yüksek MDA değeri 7 gün stres uygulanmış bitkilerde tespit edilmiştir. Kontrol grubu MDA oranları tüm stres uygulanan bitki grubuna oranla daha düşük bulunmuştur. Soya fasulyesi bitkilerinin yapraklarında ortalama lipid peroksidasyon değerlerinin kontrol bitkilerine kıyasla daha yüksek olması, soya fasulyesi bitkisinin çevresel stres faktörlerinden daha fazla etkilenmekte olduğunu ayrıca serbest radikal oluşumunun daha yüksek olabileceği sonucunu ortaya çıkartmaktadır. Kuraklık stresinin artışına bağlı olarak soya fasulyesi bitkisinin membranlarında oluşan MDA içeriğindeki artış oksidatif hasarın bir göstergesi olarak kabul edilmektedir. Elde etmiş olduğumuz sonuçlara göre, kuraklık stresi MDA üzerinde etkili olmuştur ve hücre hasarının artması sonucu MDA miktarı artmıştır.

Plazas vd., (2019) kuraklık stresi altında patlıcan (*Solanum melongena*) bitkisinin çeşitlerinin stres cevaplarının karşılaştırıldığı çalışmada, kuraklık stresi altındaki bitkilerde önemli bir malondialdehit artışı tespit edilmiştir.

Kachare vd., (2022) yapmış olduğu çalışmada soya fasulyesinde kuraklık stresi altında DREB 1, RBCL, PIP, SGR genlerinin ve morfo-fizyolojik değişikliklerin ifadesi incelenmiştir. Altı genotipe ait 60 günlük bitkiler, on günlük şiddetli kuraklık stresine tabi tutulmuş, kuraklık stresi koşullarında, sürgünlerin taze ve kuru ağırlıkları daha düşük olurken, kök uzunluğunun önemli ölçüde arttığı gözlemlenmiştir. İncelenen tüm soya fasulyesi çeşitleri arasında, kuraklık stresi altında malondialdehit miktarında önemli bir artış olduğu bildirilmiştir. Ayrıca, artan prolin seviyeleri, kuraklık stresinde turgorun korunmasına ve normal fizyolojik ve biyokimyasal fonksiyonların

sürdürülmesine yardımcı olan hücrelerin ozmotik potansiyeline bağlanabildiği, prolinin kuraklığa ve tuza dayanıklı fasulye genotiplerinin büyük ölçekte hızlı taranması için uygun bir belirteç olarak kullanıldığı vurgulanmıştır.

Kuraklık, bitki büyümesinin, fizyolojisinin ve metabolizmasının çeşitli özelliklerini değiştiren yaygın bir olumsuz sınırlayıcı faktördür. Büyümenin zamanlaması, süresi, şiddeti ve hızı, belirli ortamlarda kuraklığa dayanıklı türleri seçme girişiminde dikkate alınması gereken önemli faktörlerdir. Kuraklık stresi, bitkilerin embriyo döneminden üreme ve olgunluk aşamalarına kadar çeşitli biyolojik süreçlerini olumsuz etkiler. Kuraklık stresi, bitkilerin morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve metabolik yollarını etkiler ve sonuçta bitki verimin azaltmaktadır. Bitkiler tarafından benimsenen kuraklığa dayanıklılık stratejileri, bitki büyümesinin çeşitli aşamalarında uyarıldığında hücre, organ ve tüm bitki seviyelerinde çeşitli biyolojik mekanizmaları içermektedir (Kapoor vd., 2020).

Bu araştırmada Ataem-07 soya fasulyesi çeşidinde kuraklık stresi ilişkili hedef genlerdeki ekspresyon seviyelerinin farklılıkları gösterilmiştir. Bu çalışma kapsamında öncelikle kuraklık stresi ilişkili olarak belirlenen DREB hedef gen bölgeleri üzerinde durulmuştur. Ataem-07 soya çeşidine ait bitkilerin kontrol ve kuraklık stresi uygulanan bitkilerde DREB1 ve DREB2 genlerinin farklı cevaplar verdiği saptanmıştır.

Kuraklık stresinden sonra hasat edilen bitkiler, 3 biyolojik tekrarlı olarak kontrol grupları sıvı azot ile muamele edilerek RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. RNA izolasyon protokolünü takiben cDNA ve qRT PCR çalışmaları yapılmış ve sonuçlar istatistiksel analizlerle beraber değerlendirilmiştir. DREB1, yaprak dokularında kuraklık stresi altında anlamlı şekilde azalma göstermiştir. 1. günde ciddi bir artış gözlemlenirken 3, 5 ve 7.günlerde gen ifadesinde belirgin bir azalma mevcuttur. DREB2, yaprak dokularının kuraklık stresi altındaki gen ifadesinde, 1. ve 7. günde artış gözlemlenirken özellikle 3. ve 5. günlerde azalma mevcuttur.

1. gün kuraklık stresi bitkilerinde DREB1 gen ekspresyonunda 12,4 oranında artış gözlemlenirken DREB2 gen ekspresyonunda 28,3 oranında artış gözlemlenmiştir. 1.gün kuraklık stresi altındaki soya fasulyesi bitkilerinin DREB1 ve DREB2 gen

ekspresyon oranları karşılaştırıldığında, DREB2’de DREB1’e oranla yaklaşık olarak 2,3 oranında artış olmuştur.

3.gün kuraklık stresi bitkilerinde DREB1 gen ekspresyonu 0,5 oranında artış gösterirken, DREB2 gen ekspresyonu 1,4 oranında artış göstermiştir. DREB1 ve DREB2 gen ekspresyonları karşılaştırıldığında DREB2 gen ekspresyonu DREB1’e oranla 2,8 oranında artış göstermiştir.

5. gün kuraklık stresi altındaki bitkilerdeki DREB1 gen ekspresyonu 0,01 oranında, DREB2 gen ekspresyonu 0,9 oranında artış göstermiştir. 7. gün kuraklık stresi altında ise bitkilerde DREB1 gen ekspresyonu 0,8 oranında artış gösterirken DREB2 gen ekspresyonu 8,7 oranında artış gözlemlenmiştir. DREB2 gen ekspresyonunda DREB1’e oranla 10,8 oranında artış gerçekleşmiştir.

qRT-PCR sonuçları, GmDREB1 ekspresyon seviyelerinin kuraklık koşulları altında, en yüksek 1. günde yukarı regüle edildiğini göstermektedir. GmDREB2 ekspresyon seviyelerinin ise kuraklık stresi altında en yüksek 1. ve 7. günlerde yukarı regüle edildiği gözlemlenmiştir. GmDREB1 3.,5. ve 7.gün ekspresyon seviyeleri 1. güne oranla, GmDREB2’de ise 3. ve 5. gün ekspresyon seviyeleri 1. ve 7. güne oranla oldukça düşüktür.

Ito vd., 2006’da yapmış oldukları çalışmada, DREB1 genin kuraklık stresindeki rolü keşfedilmiştir. Yapılan çalışmada yüksek düzeyde DREB1 içeren bitkilerin kuraklık stresine karşı daha dirençli olduğu gözlemlenmiştir.

Akbudak vd., 2018’de yapmış oldukları çalışmada, DREB2 genlerinin genom çapında tanımlanması ve Arabidopsis ve pirinç genomlarıyla karşılaştırılmasının yanı sıra Cd ve NaCl stresleri altındaki ekspresyon profilleri ortaya konulmuştur. Çalışmada, dört DREB2 geninin (SbDREB2A, 2B, 2C2 ve 2D) ekspresyonları tespit edilmiştir. Cd stresi altında, SbDREB2A ve 2C2 hem kök hem de yaprak dokularında aşağı doğru düzenlenirken, SbDREB2B yalnızca yapraklarda aşağı doğru düzenlenmiştir. SbDREB2D hem yapraklarda hem de köklerde yukarı doğru düzenlenirken, SbDREB2B yalnızca köklerde düzenlenmiştir.

Zhou vd., 2020' de yapmış oldukları çalışmada da kuraklık koşulları altında GmDREB1'in melatonin senteziyle ilgili genlerin ekspresyonunu yukarı doğru düzenleyerek buğdayın kuraklığa direncini arttırdığını gösterilmiştir.

Ayrıca Chen vd., 2022 yılında yapmış oldukları çalışmada, GmDREB1'in soya fasulyesindeki fonksiyonuna odaklanılmış ve GmDREB1 aşırı ekspresyonunun soya fasulyesinin kuraklık direncini önemli ölçüde arttırdığı doğrulanmıştır. Buğday veya soya fasulyesinde GmDREB1'in aşırı ifadesinin, melatonin biyosentezi ile ilgili genler ve stres direnci ile ilgili genler dahil olmak üzere benzer aşağı yönlü genlerin ekspresyonunu yukarı doğru düzenleyebildiği ifade edilmiştir. Buğday ve soya fasulyesindeki fenotipik deneylere ve aşağı yöndeki genlerin ekspresyon analizine dayanarak, GmDREB1'in kuraklığa direnç mekanizmasının türe özgü olmadığı belirtilmiştir.

2006'da Sakuma vd.,'lerinin Arabidopsis thaliana'da yaptıkları çalışmada ise mikroarray ve qRT-PCR analizleri sonucunda DREB2A'nın (dehidrasyona duyarlı element bağlayıcı protein) hem kuraklık hem de sıcaklık stresinde rolü olduğu belirlenmiştir.

AP2 süper ailesine ait ve yüksek oranda korunmuş bir AP2/ERF alanı içeren, DREB, kuraklık ve düşük sıcaklık gibi abiyotik streslere yanıt olarak DRE/CRT elementlerine spesifik olarak bağlanabilen bitkiye özgü bir tür transkripsiyon faktörüdür. Hepsi ortak bir kökene sahip olmasına rağmen farklı türlerdeki farklı DREB türleri için abiyotik strese yanıt olarak işlev açısından büyük farklılıklar vardır. Bu nedenle, DREB ailesi üyelerinin genom çapında ve sistematik analizi, abiyotik stres toleransındaki mekanizmalarını ayırt etmek için esastır (Huang vd., 2020). Bitkilerde DREB gen ailesi birden fazla genden oluşmaktadır. Her ne kadar öncelikli olarak kuraklık stresıyla ilişkili gen ifadesinin düzenlenmesinde yer alsalar da spesifik DREB genleri için başka işlevler de kaydedilmiştir. Örneğin, DREB1D/CBF4, soğuk tepkisinde işlev gören homolog DREB1A/CBF3 geninin aksine, bitki kuraklık stresi toleransında rol oynamaktadır. DREB1C/CBF2, DREB1A/CBF3 ve DREB1B/CBF1 ekspresyonunu sıkı bir şekilde kontrol ederek bitki soğuk stresi tepkisinin negatif fakat pozitif olmayan bir düzenleyicisi olarak karakterize edilmiştir. DREB2C kuraklığa toleranstan ziyade sıcaklığa karşı bir rol oynadığı rapor edilmiştir. Farklı DREB

genlerinin fonksiyonel farklılığının ilginç ve zorlu bir araştırma konusu olduğu kanıtlanmıştır.

Pirinç, domates, soya fasulyesi, buğday, arpa ve mısır gibi diğer türlerde yapılan çalışmalar, DREB genlerinin bitki stres yanıtında merkezi bir rol oynadığını göstermektedir. Mısırdaki, sırasıyla DREB1 ve DREB2 alt gruplarına ait iki DREB geni (ZmDREB1A ve ZmDREB2A) klonlanmış ve bitkilerde kuraklık stresine yanıt olarak yukarı regüle edildiği gösterilmiştir (Qin vd., 2004; Qin vd., 2007.)

2016'da Dossa vd., tarafından yapılan çalışmada, susamdaki önemli AP2/ERF süper ailesi hakkında çok az şey bilindiğinden, bu TF'ler tanımlanmış ve DREB alt ailesinin kuraklık stresine verilen yanıtlardaki potansiyel rolü analiz edilmiştir. Yapılan çalışmada, kuraklık stresi koşullarında DREB genlerinin ekspresyon profillerini analiz etmek için qRT-PCR kullanılmış ve genler arasında genel bir diferansiyel ekspresyon paternleri gözlemlenmiştir. Yirmi üç DREB geninin kuraklık stresi altında yukarı regüle edildiği ve bunların arasında ekspresyon seviyesinde 2 kattan fazla artış gösteren 13 genin olduğu, bu genlerin susamdaki kuraklık stresinin düzenlenmesinde bazı önemli roller oynayabileceğini belirtilmiştir. Daha dikkat çekici bir şekilde, DREB6 grubuna ait olan AP2si16 geni, 16 kattan fazla oran artışıyla en yüksek ekspresyon seviyesini anlamlı şekilde sergilemiştir. AP2si90 (DREB1), AP2si13 (DREB1), AP2si84 (DREB6) genleri, AP2Si106 (DREB4), AP2si35 (DREB6), AP2si116 (DREB5), AP2si49 (DREB1) ve AP2si39 (DREB6) da güçlü ekspresyon seviyeleri sergilemiştir (3 ila 8 kat artış oranı). Buna karşılık, 3 günlük kuraklık stresi altında AP2si115 (DREB6), AP2si47 (DREB3), AP2si103 (DREB6) ve AP2si11 (DREB4) olmak üzere dört gen ekspresyon seviyelerinde 10 kattan fazla azalmada gözlemlenmiştir.

2023'te Dash vd., tarafından yapılan çalışmada ise, uygun referans genlerin seçilmesinin kritik rolü göz önüne alınarak, Actin, EF1a, ETIF5A ve UBI ve qRT-PCR analizleri kullanılarak kuraklık stresi altında gen ekspresyonu çalışmalarında referans genler olarak kullanım açısından faydaları değerlendirilmiştir. Kuraklık stresi koşullarında bu dört genin ekspresyon stabilitesini inceleyerek, gen ekspresyon verilerini doğru bir şekilde normalleştirebilecek ve deneysel değişkenliği azaltabilecek en güvenilir ve tutarlı referans genlerin belirlenmesi amaçlanmıştır. Seçilen referans gen EF1a, Keten çeşidi Hira, Mukta ve R552'de AREB1, AREB2 / ABF4 , DREB1 /

CBF , DREB2A ve ARR1 gibi beş kuraklığa duyarlı genin orantılı ekspresyon profili için kullanılmıştır. Sonuç olarak, üç çeşitte de AREB2'nin daha yüksek bir ifadeye sahip olduğu, ARR1'in ise en düşük tekdüze ifadeye sahip olduğunu gözlemlenmiştir. Ayrıca DREB1 ve DREB2A'nın Hira'da daha yüksek ekspresyona sahip olduğu, oysa Mukta ve R552 çeşitlerinde antagonist olarak eksprese edildikleri gözlemlenmiştir. Mukta'da DREB1 0,2 kat daha düşük ifade sergilerken DREB2A 0,3 kat daha yüksek bir ifade ortaya koymuştur. Şaşırtıcı bir şekilde, DREB1 0,2 kat daha düşük ifade sergilerken DREB2, R552 genotipinde 20 kat daha yüksek ifade sergilemiştir.

SNP'ler bitkiler de dahil olmak üzere organizmaların genomunda çok miktarda bulunur ve yaygın olarak dağılır (Nasu vd, 2002). Liu vd., 2020'de yapmış oldukları çalışmada, 259 Çin soya fasulyesi çeşidinde kuraklığa tolerans fenotipleri ve genotipleri incelenmiştir. Yapılan çalışmada 4616 SNP'lere dayanarak, en az bir kuraklık toleransı ile ilişkili toplam 15 SNP tanımlanmıştır.

Zaidi vd., 2016'da yapmış oldukları çalışmada Mısırdaki kuraklık stresi altında kök ile ilişkili genomik bölgelerde SNP'ler araştırılmıştır. Kuraklık stresi altında kökle ilişkili genomik bölgelerde birçok SNP bulunmuştur.

Tan vd., 2017'de yapmış oldukları çalışmada 31.839 SNP'ye sahip 520 Kanola bitkisinde tuz ve kuraklık stresi altında çimlenme kapasitesi ile önemli ölçüde ilişkili SNP'ler ve aday genler tanımlanmıştır. Önemli SNP'lerin konumlarına dayalı toplam 37 aday gen taranmış ve bu aday genlerin çoğu, sinyal iletimini ve prolin biyosentezini düzenleyerek tuz ve kuraklık streslerine yanıt vermiştir. SNP lokusları ve aday genlerin gelecekte tuz ve kuraklığa toleransı geliştirmeyi amaçlayan Kanola araştırması ve yetiştirme programları için faydalı olacağı belirtilmiştir.

Bu tez çalışmasında, Ataem-07 soya fasulyesi çeşidinde kuraklık stresi altında SNP'leri tanımlamak için DREB ailesinin farklı üyeleri (DREB1 ve DREB2) araştırılmıştır. DREB1 geninde kontrol ve stres grubu dizi analizleri sonucunda SNP'ler saptanırken, DREB2 geninde 1, 3, 5.günlerde kontrol ve stres grubu dizi analizlerinde SNP bulunamamıştır. 7. günde 3'UTR bölgesinde bir SNP saptanmıştır.

Ataem-07 soya çeşidinde kuraklık stresi altında DREB1 geninde kontrol ve stres grubunda SNP'ler bulunurken, DREB2 geninde herhangi bir SNP bulunamamıştır. Deneysel bir hata veya elde edilen DNA miktarı/saflığı sebebi ile DREB2 geninde SNP bulunamamış olabileceği düşünülmektedir. Flinders Üniversitesinde 2018' Nawal Alsamdani tarafından yayınlanmış olan tez çalışmasında, yapılan çalışmada da kuraklık stresi altında Auksiniai (AUK) ve Natali (NAT) olarak bilinen iki arpa çeşidinde Dehidrin genlerinde (Dhn9 ve Dhn7) SNP'ler taranmıştır. AUK ve NAT dizi analizinde HvDhn9-F1 primeri kullanılmış ve SNP bulunamamıştır. AUK ve NAT dizi analizinde HvDhn7-F2 primeri kullanılmış fakat SNP bulunmamıştır. HvDhn7-F5 primeri kullanılan dizi analizinde ise SNP'ler saptanmıştır.

Bu araştırmada elde edilen sonuçlar ile Ataem-07 soya çeşidinde DREB1 ve DREB2 genlerinin kuraklık stresi altındaki cevapları ortaya konulmuştur. Ülkemizde geliştirilen Ataem-07 soya çeşidine ait DREB genlerinin kuraklık stresine vermiş olduğu cevaplar bu soya fasulyesi çeşidindeki ilk çalışmadır.

Bu tez kapsamında,

- a. Kuraklık stresinin artışına paralel olarak bitki kök uzunlukları kontrol grubuna kıyasla anlamlı artış gösterirken, bitki yaş ağırlıklarında anlamlı azalma gözlemlenmiştir. Bitki boyları, kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında 5. güne kadar bir değişim göstermezken 7.günde bir artış görülmüştür.
- b. Kuraklık stresi altında MDA miktarı ve prolin birikimleri ele alındığında, kuraklık stresinin artışına paralel olarak kontrol grubuna kıyasla MDA miktarlarında ve prolin birikimlerinde anlamlı artışlar tespit edilmiştir.
- c. Bitki savunmasında ve sinyal iletim yollarında görevli olan DREB1 ve DREB2 genleri Ataem-07 soya çeşidinde incelenmiş ve DREB2 geninde 1.ve 7.günde artış gözlemlenirken, DREB1'de 1.günde artış olmuştur.
- d. Ataem-07 soya çeşidinde DREB1 geninde SNP'ler saptanırken, DREB2 geninde 1, 3, ve 5. günlerde SNP bulunamamıştır. DREB2 geninde sadece 7.günde 3'UTR bölgesinde bir SNP bulunmuştur.

6. KAYNAKÇA

- Agarwal, P. K., Agarwal, P., Reddy, M. K., & Sopory, S. K. (2006). Role of DREB transcription factors in abiotic and biotic stress tolerance in plants. *Plant cell reports*, 25, 1263-1274.
- Aguado, A., Capote, N., Romero, F., Dodd, I. C., & Colmenero-Flores, J. M. (2014). Physiological and gene expression responses of sunflower (*Helianthus annuus* L.) plants differ according to irrigation placement. *Plant Science*, 227, 37-44.
- Ahanger, M. A., Morad-Talab, N., Abd-Allah, E. F., Ahmad, P., & Hajiboland, R. (2016). Plant growth under drought stress: Significance of mineral nutrients. *Water stress and crop plants: a sustainable approach*, 2, 649-668.
- Ahluwalia, O., Singh, P. C., & Bhatia, R. (2021). A review on drought stress in plants: Implications, mitigation and the role of plant growth promoting rhizobacteria. *Resources, Environment and Sustainability*, 5, 100032.
- Akbudak, M. A., Filiz, E., & Kontbay, K. (2018). DREB2 (dehydration-responsive element-binding protein 2) type transcription factor in sorghum (*Sorghum bicolor*): genome-wide identification, characterization and expression profiles under cadmium and salt stresses. *3 Biotech*, 8(10), 426.
- Akhtar, M., Jaiswal, A., Taj, G. et al. DREB1/CBF transcription factors: their structure, function and role in abiotic stress tolerance in plants. *J Genet* 91, 385–395 (2012).
- Alghabari, F., Ihsan, M. Z., Khaliq, A., Hussain, S., Daur, I., Fahad, S., & Nasim, W. (2016). Gibberellin-sensitive Rht alleles confer tolerance to heat and drought stresses in wheat at booting stage. *Journal of Cereal Science*, 70, 72-78.
- Ali, N. (2010). Soybean processing and utilization. In *The soybean: botany, production and uses* (pp. 345-374). Wallingford UK: Cabi.
- Ali, A. A., & Alqurainy, F. (2006). Activities of antioxidants in plants under environmental stress. *The lutein-prevention and treatment for diseases*, 187-256.

- Amelework, B., Shimelis, H., Tongoona, P., & Laing, M. (2015). Physiological mechanisms of drought tolerance in sorghum, genetic basis and breeding methods: a review. *African Journal of Agricultural Research*, 10(31), 3029-3040.
- Amtmann, A., & Blatt, M. R. (2009). Regulation of macronutrient transport. *The New Phytologist*, 181(1), 35-52.
- Anjum, S. A., Xie, X., Wang, L. C., Saleem, M. F., Man, C., & Lei, W. (2011). Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress. *African journal of agricultural research*, 6(9), 2026-2032.
- Ansari W. A, Atri N, Pandey M, Singh A. K, Singh B, Pandey S. Influence of drought stress on morphological, physiological and biochemical attributes of plants: A review. *Biosci Biotech Res Asia* 2019;16(4).
- Apel, K., & Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 55, 373-399.
- Arya, H., Singh, M. B., & Bhalla, P. L. (2021). Towards Developing Drought-smart Soybeans. *Frontiers in plant science*, 12, 750664.
- Aslam, M., Zamir, M. S. I., Afzal, I., & Amin, M. (2014). Role of potassium in physiological functions of spring maize (*Zea mays* L.) grown under drought stress. *JAPS: Journal of Animal & Plant Sciences*, 24(5).
- Atta, K., Pratap Singh, A., Adhikary, S., Mondal, S., & Dewanjee, S. (2022). Drought Stress: Manifestation and Mechanisms of Alleviation in Plants.
- Awasthi, J. P., Saha, B., Regon, P., Sahoo, S., Chowra, U., Pradhan, A., Roy, A., & Panda, S. K. (2017). Morpho-physiological analysis of tolerance to aluminum toxicity in rice varieties of North East India. *PloS one*, 12(4), e0176357.
- Avendaño-Vázquez, A. O., Cordoba, E., Llamas, E., San Román, C., Nisar, N., De la Torre, S., ... & León, P. (2014). An uncharacterized apocarotenoid-derived signal generated in ζ -carotene desaturase mutants regulates leaf development and the expression of chloroplast and nuclear genes in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 26(6), 2524-2537.

- Ayub, M., Ashraf, M. Y., Kausar, A., Saleem, S., Anwar, S., Altay, V., & Ozturk, M. (2021). Growth and physio-biochemical responses of maize (*Zea mays* L.) to drought and heat stresses. *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 155(3), 535-542.
- Babaei, K., Moghaddam, M., Farhadi, N., & Pirbalouti, A. G. (2021). Morphological, physiological and phytochemical responses of Mexican marigold (*Tagetes minuta* L.) to drought stress. *Scientia Horticulturae*, 284, 110116.
- Bahadur, A., Chatterjee, A., Kumar, R., Singh, M., & Naik, P.S. (2011). Physiological and biochemical basis of drought tolerance in vegetables. *Vegetable Science*, 38,
- Bates, L.S., Waldren, R.P. & Teare, I.D., 1973, Rapid determination of free proline for water-stress studies, *Plant and Soil*, 39(1): p. 205-207.16.
- Battisti, D. S., & Naylor, R. L. (2009). Historical warnings of future food insecurity with unprecedented seasonal heat. *Science*, 323(5911), 240-244.
- Barik, S. R., Pandit, E., Pradhan, S. K., Mohanty, S. P., & Mohapatra, T. (2019). Genetic mapping of morpho-physiological traits involved during reproductive stage drought tolerance in rice. *PLoS One*, 14(12), e0214979.
- Bashir, S. S., Hussain, A., Hussain, S. J., Wani, O. A., Zahid Nabi, S., Dar, N. A., ... & Mansoor, S. (2021). Plant drought stress tolerance: understanding its physiological, biochemical and molecular mechanisms. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 35(1), 1912-1925.
- Bayar, R., & Yilmaz, M. (2005). Soybeans areas, production and yield in Turkey. *Journal of Human Sciences*, 2(1).
- Bhargava, S. and Sawant, K. (2013), Drought stress adaptation: metabolic adjustment and regulation of gene expression. *Plant Breed*, 132: 21-32.

- B BOHNERT, H.J. and Sheveleva, E. 1998. Plant Stress Adaptations-making Metabolism Move. *Current Opinion in Plant Biol.* 1: 267-274.
- ird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* 2002;16(1):6–21.
- Boyer, J. S., & Westgate, M. E. (2004). Grain yields with limited water. *Journal of experimental botany*, 55(407), 2385-2394.
- Boyer J. S. (1968). Relationship of water potential to growth of leaves. *Plant physiology*, 43(7), 1056–1062.
- Cai, F., Zhang, Y., Mi, N., Ming, H., Zhang, S., Zhang, H., & Zhao, X. (2020). Maize (*Zea mays* L.) physiological responses to drought and rewatering, and the associations with water stress degree. *Agricultural Water Management*, 241, 106379.
- Canter, L. W. (2018). *Environmental Impact of Agricultural Production Activities*. Broken Sound Parkway NW: CRC Press.
- Castro, B., Citterico, M., Kimura, S., Stevens, D. M., Wrzaczek, M., & Coaker, G. (2021). Stress-induced reactive oxygen species compartmentalization, perception and signalling. *Nature plants*, 7(4), 403-412.
- Chaves, M. M., Flexas, J., & Pinheiro, C. (2009). Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of botany*, 103(4), 551-560.
- Chen, KI., Erh, MH., Su, NW. et al. Soyfoods and soybean products: from traditional use to modern applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 96, 9–22 (2012).
- Chen, K., Tang, W., Zhou, Y., Chen, J., Xu, Z., Ma, R., ... & Chen, M. (2022). AP2/ERF transcription factor GmDREB1 confers drought tolerance in transgenic soybean by interacting with GmERFs. *Plant physiology and biochemistry*, 170, 287-295.
- Colletti A, Attrovio A, Boffa L, Mantegna S, Cravotto G. Valorisation of By-Products from Soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) Processing. *Molecules*. 2020; 25(9):2129.
- Cui, M., Zhang, W., Zhang, Q., Xu, Z., Zhu, Z., Duan, F., & Wu, R. (2011). Induced over-expression of the transcription factor OsDREB2A improves drought tolerance in rice. *Plant Physiology and Biochemistry*, 49(12), 1384-1391.

- Damalas, C. A. (2019). Improving drought tolerance in sweet basil (*Ocimum basilicum*) with salicylic acid. *Scientia horticulturae*, 246, 360-365.
- Dash, P. K., Rai, R., Pradhan, S. K., Shivaraj, S. M., Deshmukh, R., Sreevathsa, R., & Singh, N. K. (2023). Drought and Oxidative Stress in Flax (*Linum usitatissimum* L.) Entails Harnessing Non-Canonical Reference Gene for Precise Quantification of qRT-PCR Gene Expression. *Antioxidants*, 12(4), 950.
- Dash, P. K., Rai, R., Rai, V., & Pasupalak, S. (2018). Drought induced signaling in rice: delineating canonical and non-canonical pathways. *Frontiers in Chemistry*, 6, 264.
- Dash, P. K., Rai, R., Pradhan, S. K., Shivaraj, S. M., Deshmukh, R., Sreevathsa, R., & Singh, N. K. (2023). Drought and oxidative stress in flax (*Linum usitatissimum* L.) entails harnessing non-canonical reference gene for precise quantification of qRT-PCR gene expression. *Antioxidants*, 12(4), 950.
- David, T. S., Henriques, M. O., Kurz-Besson, C., Nunes, J., Valente, F., Vaz, M., Pereira, J. S., Siegwolf, R., Chaves, M. M., Gazarini, L. C., & David, J. S. (2007). Water-use strategies in two co-occurring Mediterranean evergreen oaks: surviving the summer drought. *Tree physiology*, 27(6), 793–803.
- Deeba, F., Pandey, A. K., Ranjan, S., Mishra, A., Singh, R., Sharma, Y. K., Shirke, P. A., & Pandey, V. (2012). Physiological and proteomic responses of cotton (*Gossypium herbaceum* L.) to drought stress. *Plant physiology and biochemistry: PPB*, 53, 6–18.
- Demidchik, V., Shabala, S. N., & Davies, J. M. (2007). Spatial variation in H₂O₂ response of *Arabidopsis thaliana* root epidermal Ca²⁺ flux and plasma membrane Ca²⁺ channels. *The Plant Journal*, 49(3), 377-386.
- Demiral, T., & Türkan, I. (2004). Does exogenous glycinebetaine affect antioxidative system of rice seedlings under NaCl treatment? *Journal of plant physiology*, 161(10), 1089–1100.
- Dien, D. C., Mochizuki, T., & Yamakawa, T. (2019). Effect of various drought stresses and subsequent recovery on proline, total soluble sugar and starch metabolisms in Rice (*Oryza sativa* L.) varieties. *Plant Production Science*, 22(4), 530-545.

- Din, J., Khan, S. U., Ali, I., & Gurmani, A. R. (2011). Physiological and agronomic response of canola varieties to drought stress. *J Anim Plant Sci*, 21(1), 78-82.
- Doan Cong Dien, Toshihiro Mochizuki & Takeo Yamakawa (2019) Effect of various drought stresses and subsequent recovery on proline, total soluble sugar and starch metabolisms in Rice (*Oryza sativa* L.) varieties, *Plant Production Science*, 22:4, 530-545.
- Dossa, K., Wei, X., Li, D., Fonceka, D., Zhang, Y., Wang, L., Yu, J., Boshou, L., Diouf, D., Cissé, N., & Zhang, X. (2016). Insight into the AP2/ERF transcription factor superfamily in sesame and expression profiling of DREB subfamily under drought stress. *BMC plant biology*, 16(1), 171.
- Dubey, R. S., Srivastava, R. K., & Pessarakli, M. (2021). Physiological mechanisms of nitrogen absorption and assimilation in plants under stressful conditions. *In Handbook of plant and crop physiology* (pp. 579-616). CRC Press.
- Fahad, S., Bajwa, A. A., Nazir, U., Anjum, S. A., Farooq, A., Zohaib, A., ... & Huang, J. (2017). Crop production under drought and heat stress: plant responses and management options. *Frontiers in plant science*, 1147.
- Farooq, M., Basra, S. M. A., Wahid, A., Ahmad, N., & Saleem, B. A. (2009). Improving the drought tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) by exogenous application of salicylic acid. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 195(4), 237-246.
- Farooq, M., Basra, S. M. A., Wahid, A., Cheema, Z. A., Cheema, M. A., & Khaliq, A. (2008). Physiological role of exogenously applied glycinebetaine to improve drought tolerance in fine grain aromatic rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Agronomy and Crop Science*, 194(5), 325-333.
- Foyer, C. H., & Noctor, G. (2005). Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant, Cell & Environment*, 28(8), 1056-1071.
- Garg, N., & Manchanda, G. J. P. B. (2009). ROS generation in plants: boon or bane?. *Plant Biosystems*, 143(1), 81-96.

- Ghafar, M. A., Akram, N. A., Saleem, M. H., Wang, J., Wijaya, L., & Alyemeni, M. N. (2021). Ecotypic morphological and physio-biochemical responses of two differentially adapted forage grasses, *Cenchrus ciliaris* L. and *Cyperus arenarius* Retz. to drought stress. *Sustainability*, 13(14), 8069.
- Grover, A., Kapoor, A., Kumar, D., Shashidhar, H. E., & Hittalmani, S. (2004). Genetic improvement for abiotic stress responses. *Plant Breeding: Mendelian to Molecular Approaches*, 167-193.
- Gujjar, R. S., Akhtar, M., & Singh, M. (2014). Transcription factors in abiotic stress tolerance. *Indian Journal of Plant Physiology*, 19, 306-316.
- Gupta, A., Rico-Medina, A., & Caño-Delgado, A. I. (2020). The physiology of plant responses to drought. *Science*, 368(6488), 266-269.
- Harb, A., Awad, D., & Samarah, N. (2015). Gene expression and activity of antioxidant enzymes in barley (*Hordeum vulgare* L.) under controlled severe drought. *Journal of Plant Interactions*, 10(1), 109-116.
- Hayat, S., Hayat, Q., Alyemeni, M. N., Wani, A. S., Pichtel, J., & Ahmad, A. (2012). Role of proline under changing environments: a review. *Plant signaling & behavior*, 7(11), 1456–1466.
- Hirayama T, Shinozaki K. Research on plant abiotic stress responses in the post-genome era: past, present and future. *Plant J.* 2010;61(6):1041–52.
- Hoagland, D. R. and Arnon, D. I. 1950. The water-culture method for growing plants without soil. Circular. California agricultural experiment station, 347 (2nd edit).
- Hossain, M. A., Mostofa, M. G., & Fujita, M. (2013). Cross protection by cold-shock to salinity and drought stress-induced oxidative stress in mustard (*Brassica campestris* L.) seedlings. *Mol Plant Breed*, 4(7), 50-70.
- Hsiao, T. C., & Xu, L. K. (2000). Sensitivity of growth of roots versus leaves to water stress: biophysical analysis and relation to water transport. *Journal of experimental botany*, 51(350), 1595-1616.

- Hu, Y., & Schmidhalter, U. (2005). Drought and salinity: a comparison of their effects on mineral nutrition of plants. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 168(4), 541-549.
- Hu, Y., Burucs, Z., von Tucher, S., & Schmidhalter, U. (2007). Short-term effects of drought and salinity on mineral nutrient distribution along growing leaves of maize seedlings. *Environmental and Experimental Botany*, 60(2), 268-275.
- Huang, Xing; Song, Xiupeng; Chen, Rongfa; Zhang, Baoqing; Li, Changning; Liang, Yongsheng; et al. (2020). Genome-Wide Analysis of the DREB Subfamily in *Saccharum spontaneum* Reveals Their Functional Divergence During Cold and Drought Stresses.
- Huq MA, Akter S, Nou S, Kim HT, Jung YJ and KyooKang K, 2016. Identification of functional SNPs in genes and their effects on plant phenotypes. *Journal of Plant Biotechnology* 2016; 43(1): 1-11.
- Hussain, S., Khalid, M. F., Saqib, M., Ahmad, S., Zafar, W., Rao, M. J., ... & Anjum, M. A. (2018). Drought tolerance in citrus rootstocks is associated with better antioxidant defense mechanism. *Acta Physiologiae Plantarum*, 40, 1-10.
- Ibraheem, O., Dealtry, G., Roux, S., & Bradley, G. (2011). The Effect of Drought and Salinity on the Expressional Levels of Sucrose Transporters in Rice ('*Oryza sativa*' Nipponbare) Cultivar Plants. *Plant Omics*, 4(2), 68-74.
- Irshad, A., Guo, H., Ur Rehman, S., Wang, X., Gu, J., Xiong, H., Xie, Y., Zhao, L., Zhao, S., Wang, C., & Liu, L. (2021). Identification of Single Nucleotide Polymorphism in *TaSBEIII* and Development of KASP Marker Associated With Grain Weight in Wheat. *Frontiers in genetics*, 12, 697294.
- Islam, M. M., Kayesh, E., Zaman, E., Urmi, T. A., & Haque, M. M. (2018). Evaluation of rice (*Oryza sativa* L.) genotypes for drought tolerance at germination and early seedling stage. *The Agriculturists*, 16(1), 44-54.
- Jafarnia, S.H., Akbarinia, M., Hosseinpour, B., Sanavi, S., & Salami, S.A. (2018). Effect of drought stress on some growth, morphological, physiological, and biochemical

parameters of two different populations of *Quercus brantii*. *Iforest - Biogeosciences and Forestry*, 11, 212-220.

Jaleel, C. A., Manivannan, P. A. R. A. M. A. S. I. V. A. M., Wahid, A., Farooq, M., Al-Juburi, H. J., Somasundaram, R. A. M. A. M. U. R. T. H. Y., & Panneerselvam, R. (2009). Drought stress in plants: a review on morphological characteristics and pigments composition. *Int. J. Agric. Biol*, 11(1), 100-105.

Javed T, Shabbir R, Ali A, Afzal I, Zaheer U, Gao SJ. Transcription Factors in Plant Stress Responses: Challenges and Potential for Sugarcane Improvement. *Plants (Basel)*. 2020 Apr 10;9(4):491.

Jian-Kang Zhu, Regulation of ion homeostasis under salt stress, *Current Opinion in Plant Biology*, Volume 6, Issue 5, 2003, Pages 441-445, ISSN 1369-5266.

Kachare, S., Tiwari, S., & Tripathi, N. (2022). Expression of DREB 1, RBCL, PIP, SGR genes and morpho-physiological changes under water stress in soybean. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 1-18.

Kapoor, D., Bhardwaj, S., Landi, M., Sharma, A., Ramakrishnan, M., & Sharma, A. (2020). The Impact of Drought in Plant Metabolism: How to Exploit Tolerance Mechanisms to Increase Crop Production. *Applied Sciences*, 10(16), 5692.

Karcicio, M. 2006. Yerel Durum Buğdayı Çeşitlerinde (*Triticum durum* Desf.) RAPD-PCR Tekniği ile Genetik Çeşitlilik Analizi Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi. 80s.

Kasote DM, Katyare SS, Hegde MV, Bae H. Significance of antioxidant potential of plants and its relevance to therapeutic applications. *Int J Biol Sci*. 2015 Jun 11;11(8):982-91.

Khodabin, G., Tahmasebi-Sarvestani, Z., Rad, A. H. S., & Modarres-Sanavy, S. A. M. (2020). Effect of drought stress on certain morphological and physiological characteristics of a resistant and a sensitive canola cultivar. *Chemistry & biodiversity*, 17(2), e1900399.

- Kim G, Ryu H, Sung J. Hormonal Crosstalk and Root Suberization for Drought Stress Tolerance in Plants. *Biomolecules*. 2022 Jun 9;12(6):811.
- Kim, I.-S. Current Perspectives on the Beneficial Effects of Soybean Isoflavones and Their Metabolites for Humans. *Antioxidants* 2021, 10, 1064.
- Kim, S.-H.; Subramanian, P.; Hahn, B.-S.; Ha, B.-K. High-Throughput Phenotypic Characterization and Diversity Analysis of Soybean Roots (*Glycine max* L.). *Plants* 2022, 11, 2017
- Kinney, A. J., & Clemente, T. E. (2005). Modifying soybean oil for enhanced performance in biodiesel blends. *Fuel processing technology*, 86(10), 1137-1147.
- Korsa F, Feyissa T (2022) Effects of Functional Single Nucleotide Polymorphisms on Plant Phenotypes. *Arch Crop Sci* 5(2):185-192.
- Kozłowski, T. T., & Pallardy, S. G. (2002). Acclimation and adaptive responses of woody plants to environmental stresses. *The botanical review*, 68(2), 270-334.
- Kudo, M., Kidokoro, S., Yoshida, T., Mizoi, J., Todaka, D., Fernie, A. R., ... & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2017). Double overexpression of DREB and PIF transcription factors improves drought stress tolerance and cell elongation in transgenic plants. *Plant biotechnology journal*, 15(4), 458-471.
- Kunert, K. J., Vorster, B. J., Fenta, B. A., Kibido, T., Dionisio, G., & Foyer, C. H. (2016). Drought stress responses in soybean roots and nodules. *Frontiers in plant science*, 7, 1015.
- Lee, B. R., Jin, Y. L., Avice, J. C., Cliquet, J. B., Ourry, A., & Kim, T. H. (2009). Increased proline loading to phloem and its effects on nitrogen uptake and assimilation in water-stressed white clover (*Trifolium repens*). *The New phytologist*, 182(3), 654–663.
- Li, Z., Wang, G., Liu, X. et al. Genome-wide identification and expression profiling of DREB genes in *Saccharum spontaneum*. *BMC Genomics* 22, 456 (2021).
- Liu, Y., Ye, N., Liu, R., Chen, M., & Zhang, J. (2010). H₂O₂ mediates the regulation of ABA catabolism and GA biosynthesis in *Arabidopsis* seed dormancy and germination. *Journal of experimental botany*, 61(11), 2979-2990.

- Liu, J. H., Peng, T., & Dai, W. (2014). Critical cis-acting elements and interacting transcription factors: key players associated with abiotic stress responses in plants. *Plant molecular biology reporter*, 32, 303-317.
- Liu, Z., Li, H., Gou, Z., Zhang, Y., Wang, X., Ren, H., ... & Qiu, L. (2020). Genome-wide association study of soybean seed germination under drought stress. *Molecular Genetics and Genomics*, 295, 661-673.
- Díaz-López, L., Gimeno, V., Simón, I., Martínez, V., Rodríguez-Ortega, W. M., & García-Sánchez, F. (2012). *Jatropha curcas* seedlings show a water conservation strategy under drought conditions based on decreasing leaf growth and stomatal conductance. *Agricultural water management*, 105, 48-56.
- Mahajan, S., & Tuteja, N. (2005). Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Archives of biochemistry and biophysics*, 444(2), 139-158.
- Manna, M., Thakur, T., Chirom, O., Mandlik, R., Deshmukh, R., & Salvi, P. (2021). Transcription factors as key molecular target to strengthen the drought stress tolerance in plants. *Physiologia Plantarum*, 172(2), 847-868.
- Maury, G. L., Rodríguez, D. M., Hendrix, S., Arranz, J. C. E., Boix, Y. F., Pacheco, A. O., Díaz, J. G., Morris-Quevedo, H. J., Dubois, A. F., Aleman, E. I., Beenaerts, N., Méndez-Santos, I. E., Ratón, T. O., Cos, P., & Cuypers, A. (2020). Antioxidants in Plants: A Valorization Potential Emphasizing the Need for the Conservation of Plant Biodiversity in Cuba. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 9(11), 1048.
- Mizoi, J., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2012). AP2/ERF family transcription factors in plant abiotic stress responses. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1819(2), 86-96.
- Morgil, H., Can Gercek, Y., & Tulum, I. (2020). Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) in Plant Genetics and Breeding. *IntechOpen*.
- Mostofa, M. G., Hossain, M. A., Fujita, M., & Tran, L. S. (2015). Physiological and biochemical mechanisms associated with trehalose-induced copper-stress tolerance in rice. *Scientific reports*, 5, 11433.

- Muhammad, I., Shalmani, A., Ali, M., Yang, Q. H., Ahmad, H., & Li, F. B. (2021). Mechanisms regulating the dynamics of photosynthesis under abiotic stresses. *Frontiers in plant science*, 11, 615942.
- Mukarram, M., Choudhary, S., Kurjak, D., Petek, A., & A. Khan, M. M. (2021). Drought: Sensing, signalling, effects and tolerance in higher plants. *Physiologia Plantarum*, 172(2), 1291-1300.
- Murata, Y., & Mori, I. C. (2013). Stomatal regulation of plant water status. Plant abiotic stress, 47-67.
- Muthiah, S., Longer, D. E., & Harris, W. M. (1994). Staging soybean seedling growth from germination to emergence. *Crop science*, 34(1), 289-291.
- Muthusamy, M., Uma, S., Backiyarani, S., Saraswathi, M. S., & Chandrasekar, A. (2016). Transcriptomic Changes of Drought-Tolerant and Sensitive Banana Cultivars Exposed to Drought Stress. *Frontiers in plant science*, 7, 1609.
- Nawaz, F., Shehzad, M. A., Majeed, S., Ahmad, K. S., Aqib, M., Usmani, M. M., & Shabbir, R. N. (2020). Role of mineral nutrition in improving drought and salinity tolerance in field crops. *Agronomic Crops: Volume 3: Stress Responses and Tolerance*, 129-147.
- Neill, S. J., Desikan, R., Clarke, A., Hurst, R. D., & Hancock, J. T. (2002). Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *Journal of experimental botany*, 53(372), 1237-1247.
- Nezhadahmadi, A., Prodhan, Z. H., & Faruq, G. (2013). Drought tolerance in wheat. *The Scientific World Journal*, 2013.
- Osakabe, Y., Osakabe, K., Shinozaki, K., & Tran, L. S. P. (2014). Response of plants to water stress. *Frontiers in plant science*, 5, 86.
- Pandey, V., & Shukla, A. (2015). Acclimation and tolerance strategies of rice under drought stress. *Rice science*, 22(4), 147-161.
- Pareek, A., Sopory, S. K., & Bohnert, H. J. (2009). Abiotic stress adaptation in plants. Dordrecht, The Netherlands: Springer.

- Partigöç, N. S. & Soğancı, S. (2019). Küresel İklim Değişikliğinin Kaçınılmaz Sonucu: Kuraklık. *Resilience*, 3 (2), 287-299.
- Pérez-Clemente, R. M., Vives, V., Zandalinas, S. I., López-Climent, M. F., Muñoz, V., & Gómez-Cadenas, A. (2013). Biotechnological approaches to study plant responses to stress. *BioMed research international*, 2013.
- Pinheiro, C., & Chaves, M.M. (2011). Photosynthesis and drought: can we make metabolic connections from available data? *Journal of experimental botany*, 62 3, 869-82.
- Plazas, M., Nguyen, H. T., González-Orenga, S., Fita, A., Vicente, O., Prohens, J., & Boscaiu, M. (2019). Comparative analysis of the responses to water stress in eggplant (*Solanum melongena*) cultivars. *Plant Physiology and Biochemistry*, 143, 72-82.
- Poudel, S., Vennam, R. R., Shrestha, A., Reddy, K. R., Wijewardane, N. K., Reddy, K. N., & Bheemanahalli, R. (2023). Resilience of soybean cultivars to drought stress during flowering and early-seed setting stages. *Scientific Reports*, 13(1), 1277.
- Qin, F., Sakuma, Y., Li, J., Liu, Q., Li, Y. Q., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2004). Cloning and functional analysis of a novel DREB1/CBF transcription factor involved in cold-responsive gene expression in *Zea mays* L. *Plant and Cell Physiology*, 45(8), 1042-1052.
- Qin, F., Kakimoto, M., Sakuma, Y., Maruyama, K., Osakabe, Y., Tran, L. S. P., ... & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2007). Regulation and functional analysis of ZmDREB2A in response to drought and heat stresses in *Zea mays* L. *The Plant Journal*, 50(1), 54-69.
- Ramesh, R., Ramesh, T., Rao, P., Shankar, V. ve Bhave, M., 2017, High Temperature Stress Effected the Biochemical Parameters of Rice (*Oryza sativa* L.) Varieties and Hybrids, *Int. J. Pure App. Biosci.*, 5(4): 1478-1490. Rahdari, P., & Hoseini, S. M. (2012). Drought stress: a review. *International Journal of Agronomy and Plant Production*, 3(10), 443-446.
- Rasool, N. (2023). Role of Plant Hormones in Mitigating Abiotic Stress.

- Rasool, S., Ahmad, A., Siddiqi, T. O., & Ahmad, P. (2013). Changes in growth, lipid peroxidation and some key antioxidant enzymes in chickpea genotypes under salt stress. *Acta physiologiae plantarum*, 35, 1039-1050.
- Reinders, J., Wulff, B. B., Mirouze, M., Marí-Ordóñez, A., Dapp, M., Rozhon, W., Bucher, E., Theiler, G., & Paszkowski, J. (2009). Compromised stability of DNA methylation and transposon immobilization in mosaic *Arabidopsis* epigenomes. *Genes & development*, 23(8), 939–950.
- Rostamza, M., Chaichi, M. R., Jahansooz, M. R., Mashhadi, H. R., & Sharifi, H. R. (2011). Effects of water stress and nitrogen fertilizer on multi-cut forage pearl millet yield, nitrogen, and water use efficiency. *Communications in soil science and plant analysis*, 42(20), 2427-2440.
- Saeidi, M., & Abdoli, M. (2015). Effect of drought stress during grain filling on yield and its components, gas exchange variables, and some physiological traits of wheat cultivars. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 17(4), 885-898.
- Sah, S. K., Reddy, K. R., & Li, J. (2016). Absciscic acid and abiotic stress tolerance in crop plants. *Frontiers in plant science*, 7, 571.
- Sakuma, Y., Maruyama, K., Qin, F., Osakabe, Y., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2006). Dual function of an *Arabidopsis* transcription factor DREB2A in water-stress-responsive and heat-stress-responsive gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(49), 18822-18827.
- Saleh, A. B. D. E. L. A. T. Y., Lumreras, V. I. C. T. O. R. I. A., Pages, M. O. N. T. S. E. R. R. A. T., Tuberosa, R., Phillips, R. L., & Gale, M. (2005). Functional role of DRE-binding transcription factors in abiotic stress. In *Proceedings of the international congress in the wake of the double helix from the green revolution to the gene revolution*. Bologna, Italy (pp. 193-205).
- Salehi-Lisar, S. Y., & Bakhshayeshan-Agdam, H. (2016). Drought stress in plants: causes, consequences, and tolerance. *Drought stress tolerance in plants, Vol 1: physiology and biochemistry*, 1-16.

- Sapeta, H., Costa, J. R., Lourenço, T., Maroco, J., Linde, P. V. d., Oliveira, M. J. (2013). Drought Stress Response In *Jatropha Curcas*: Growth and Physiology. *Environmental and Experimental Botany*, (85), 76-84.
- Seleiman, M. F., Al-Suhaibani, N., Ali, N., Akmal, M., Alotaibi, M., Refay, Y., Dindaroglu, T., et al. (2021). Drought Stress Impacts on Plants and Different Approaches to Alleviate Its Adverse Effects. *Plants*, 10(2), 259.
- Singh, D., Singh, C. K., Taunk, J., Tomar, R. S., Chaturvedi, A. K., Gaikwad, K., & Pal, M. (2017). Transcriptome analysis of lentil (*Lens culinaris* Medikus) in response to seedling drought stress. *BMC genomics*, 18(1), 206.
- Singh, T. N., Aspinall, D., & Paleg, L. G. (1972). Proline accumulation and varietal adaptability to drought in barley: a potential metabolic measure of drought resistance. *Nature New Biology*, 236, 188-190.
- Singh, D., & Laxmi, A. (2015). Transcriptional regulation of drought response: a tortuous network of transcriptional factors. *Frontiers in plant science*, 6, 895.
- Shahzad, R., Jamil, S., Ahmad, S., Nisar, A., Amina, Z., Saleem, S., Zaffar Iqbal, M., Muhammad Atif, R., & Wang, X. (2021). Harnessing the potential of plant transcription factors in developing climate resilient crops to improve global food security: Current and future perspectives. *Saudi journal of biological sciences*, 28(4), 2323–2341.
- Sharma, S., Kaur, M., Goyal, R., & Gill, B. S. (2014). Physical characteristics and nutritional composition of some new soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) genotypes. *Journal of food science and technology*, 51(3), 551–557.
- Sheikh Shanawaz Bashir, Anjuman Hussain, Sofi Javed Hussain, Owais Ali Wani, Sheikh Zahid Nabi, Niyaz A. Dar, Faheem Shehzad Baloch & Sheikh Mansoor (2021) Plant drought stress tolerance: understanding its physiological, biochemical and molecular mechanisms, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 35:1, 1912-1925.
- Shi, D., Wang, J., Bai, Y. et al. Transcriptome sequencing of okra (*Abelmoschus esculentus* L. Moench) uncovers differently expressed genes responding to drought stress. *J. Plant Biochem. Biotechnol.* 29, 155–170 (2020).

- Shao, H. B., Chu, L. Y., Shao, M. A., Jaleel, C. A., & Mi, H. M. (2008). Higher plant antioxidants and redox signaling under environmental stresses. *Comptes rendus biologies*, 331(6), 433–441.
- Shurtleff, W. and Aoyagi, A. (2007) History of Soybean Crushing: Soy Oil and Soybean Meal—Part 1. A Chapter from the Unpublished Manuscript, History of Soybeans and Soyfoods, 1100 B.C. to the 1980s.
- Szalai, G., Kellös, T., Galiba, G., & Kocsy, G. (2009). Glutathione as an antioxidant and regulatory molecule in plants under abiotic stress conditions. *Journal of Plant Growth Regulation*, 28, 66-80.
- Sobko, O., Zikeli, S., Claupein, W., & Gruber, S. (2020). Seed Yield, Seed Protein, Oil Content, and Agronomic Characteristics of Soybean (*Glycine max* L. Merrill) Depending on Different Seeding Systems and Cultivars in Germany. *Agronomy*, 10(7), 1020.
- SoyStats A reference guide to important soybean facts and figures. American Soybean Association. 2017 Available from: <http://soystats.com/>.
- Stewart C. R. (1973). The effect of wilting on proline metabolism in excised bean leaves in the dark. *Plant physiology*, 51(3), 508–511. <https://doi.org/10.1104/pp.51.3.508>.
- Stewart, R.R.C. ve Bewley, J.D., 1980, Lipid-Peroxidation Associated with Accelerated Aging of Soybean Axes, *Plant Physiology*, 65(2): p. 245-248.
- Taiwo, A. F., Daramola, O., Sow, M., & Semwal, V. K. (2020). Ecophysiology and responses of plants under drought. *Plant Ecophysiology and Adaptation under Climate Change: Mechanisms and Perspectives I: General Consequences and Plant Responses*,
- Tan, M., Liao, F., Hou, L. et al. Genome-wide association analysis of seed germination percentage and germination index in *Brassica napus* L. under salt and drought stresses. *Euphytica* 213, 40 (2017). 231-268.
- Tramblay, Y., Koutroulis, A., Samaniego, L., Vicente-Serrano, S. M., Volaire, F., Boone, A., ... & Polcher, J. (2020). Challenges for drought assessment in the Mediterranean region under future climate scenarios. *Earth-Science Reviews*, 210, 103348.

- Tsutsui, T., Kato, W., Asada, Y., Sako, K., Sato, T., Sonoda, Y., ... & Yamaguchi, J. (2009). DEAR1, a transcriptional repressor of DREB protein that mediates plant defense and freezing stress responses in Arabidopsis. *Journal of plant research*, 122, 633-643.
- Tůmová, L., Tarkowská, D., Řehořová, K., Markova, H., Kočová, M., Rothova, O., ... & Hola, D. (2018). Drought-tolerant and drought-sensitive genotypes of maize (*Zea mays* L.) differ in contents of endogenous brassinosteroids and their drought-induced changes. *PloS one*, 13(5), e0197870.
- Verbruggen, N. ve Hermans, C., 2008, Proline accumulation in plants: a review, *Amino Acids*, 35(4): 753-759.
- Verma, V., Ravindran, P. & Kumar, P.P. Plant hormone-mediated regulation of stress responses. *BMC Plant Biol* 16, 86 (2016).
- Wang, Z., Yang, Y., Yadav, V., Zhao, W., He, Y., Zhang, X., & Wei, C. (2022). Drought-induced proline is mainly synthesized in leaves and transported to roots in watermelon under water deficit. *Horticultural Plant Journal*, 8(5), 615-626.
- Weerasekara, I., Sinniah, U. R., Namasivayam, P., Nazli, M. H., Abdurahman, S. A., & Ghazali, M. N. (2021). The Influence of Seed Production Environment on Seed Development and Quality of Soybean (*Glycine max* (L.) Merrill). *Agronomy*, 11(7), 1430.
- Widuri, L. I., Lakitan, B., Sodikin, E., Hasmeda, M., Meihana, M., Kartika, K., & Siaga, E. (2018). Shoot and root growth in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) exposed to gradual drought stress. *AGRIVITA, Journal of Agricultural Science*, 40(3), 442-452.
- Wu, Y., Zhang, L., Nie, L., Zheng, Y., Zhu, S., Hou, J., Li, R., Chen, G., Tang, X., Wang, C., & Yuan, L. (2022). Genome-wide analysis of the DREB family genes and functional identification of the involvement of BrDREB2B in abiotic stress in wucaï (*Brassica campestris* L.). *BMC genomics*, 23(1), 598.
- Wu, J., Wang, J., Hui, W., Zhao, F., Wang, P., Su, C., & Gong, W. (2022). Physiology of plant responses to water stress and related genes: A review. *Forests*, 13(2), 324.

- Wu, Q.S., Xia, R.X. and Zhou, Y.N. (2008) Improved Soil Structure and Citrus Growth after Inoculation with Three Arbuscular Mycorrhizal Fungi under Drought Stress. *European Journal of Soil Biology*, 44, 122-128.
- Yang, H., Schmuke, J. J., Flagg, L. M., Roberts, J. K., Allen, E. M., Ivashuta, S., ... & Christian, A. T. (2009). A novel real-time polymerase chain reaction method for high throughput quantification of small regulatory RNAs. *Plant biotechnology journal*, 7(7), 621-630.
- Yang, X., Lu, M., Wang, Y., Wang, Y., Liu, Z., & Chen, S. (2021). Response Mechanism of Plants to Drought Stress. *Horticulturae*, 7(3), 50.
- Yılmaz, M. B. & Kısakürek, Ş. (2021). *Lolium perenne* L. Çeşitlerinde Kuraklık Stresinin Çimlenme ve Erken Fide Gelişimi Üzerine Etkisi. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi*, 24 (3), 529-538.
- You, J., Zhang, Y., Liu, A., Li, D., Wang, X., Dossa, K., Zhou, R., Yu, J., Zhang, Y., Wang, L., & Zhang, X. (2019). Transcriptomic and metabolomic profiling of drought-tolerant and susceptible sesame genotypes in response to drought stress. *BMC plant biology*, 19(1), 267.
- Zaidi, P. H., Seetharam, K., Krishna, G., Krishnamurthy, L., Gajanan, S., Babu, R., Zerka, M., Vinayan, M. T., & Vivek, B. S. (2016). Genomic Regions Associated with Root Traits under Drought Stress in Tropical Maize (*Zea mays* L.). *PloS one*, 11(10), e0164340.
- Zhang, M., Chen, Q., & Shen, S. (2011). Physiological responses of two Jerusalem artichoke cultivars to drought stress induced by polyethylene glycol. *Acta Physiologiae Plantarum*, 33, 313-318.
- Zhang, L., Fang, W., Chen, F., & Song, A. (2022). The Role of Transcription Factors in the Regulation of Plant Shoot Branching. *Plants (Basel, Switzerland)*, 11(15), 1997.
- Zhang, Y., & Xia, P. (2023). The DREB transcription factor, a biomacromolecule, responds to abiotic stress by regulating the expression of stress-related genes. *International Journal of Biological Macromolecules*, 125231.

- Zhou, Y., Chen, M., Guo, J., Wang, Y., Min, D., Jiang, Q., ... & Ma, Y. (2020). Overexpression of soybean DREB1 enhances drought stress tolerance of transgenic wheat in the field. *Journal of Experimental Botany*, 71(6), 1842-1857.
- Zou, Y. N., Wu, Q. S., & Kuča, K. (2021). Unravelling the role of arbuscular mycorrhizal fungi in mitigating the oxidative burst of plants under drought stress. *Plant Biology*, 23, 50-57.
- Zörb, C., Geilfus, C. M., & Dietz, K. J. (2019). Salinity and crop yield. *Plant biology (Stuttgart, Germany)*, 21 Suppl 1, 31–38.
- Zhu J. K. (2002). Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual review of plant biology*, 53, 247–273.

