

T.C. İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

NFYA5 TRANSKRİPSİYON FAKTÖRÜNÜN MUTANT
SOYA BİTKİLERİNDE (*Glycine Max* [L.] Merr) KURAKLIK STRESİ
ÜZERİNE ETKİSİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TUĞÇE AYDIN

1700004262

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Program: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Tez Danışmanı: Prof. Dr. ÇİMEN ATAK

ŞUBAT 2025

T.C. İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

NFYA5 TRANSKRİPSİYON FAKTÖRÜNÜN MUTANT
SOYA BİTKİLERİNDE (*Glycine Max* [L.] Merr) KURAKLIK STRESİ
ÜZERİNE ETKİSİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TUĞÇE AYDIN

1700004262

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Program: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Tez Danışmanı: Prof. Dr. ÇİMEN ATAK

Jüri Üyeleri: Dr. Öğretim Üyesi Sinan MERİÇ

Doç. Dr. Alper YILMAZ

ŞUBAT 2025

ÖNSÖZ

İstanbul Kültür Üniversitesi'nde tamamladığım lisans eğitimim boyunca verdiği dersleri büyük keyifle dinlediğim, beni her koşulda araştırmaya ve öğrenmeye yönlendiren, akademik hayatım ve gelecek planlarım için bana yol gösteren, bitirme tezi ve Tübitak 2209A kapsamında da danışmanım olarak tecrübeleri ve fikirleri ile bakış açımı değiştiren Sayın Prof. Dr. Çimen ATAĞ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İstanbul Kültür Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Bitki Biyoteknolojisi Laboratuvarı'nda görev aldığım tüm süre boyunca bilgi ve akademik birikimlerinden faydalandığım, ihtiyaç duyduğumda yardımlarını esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi, Sinan MERİÇ'e

Bitki Biyoteknolojisi Laboratuvarı'nda gerçekleştirdiğimiz çalışmalar ve projeler kapsamında yardıma ihtiyaç duyduğum her an düşünmeden yanımda olan, yüksek lisans eğitimim boyunca manevi desteklerini sonuna kadar hissettiğim, her konu hakkında fikirlerine önem verdiğim Araş.Gör. Tamer GÜMÜŞ'e çok teşekkür ederim.

Hem akademik hem özel hayatımda desteğini ve bana olan inancını sonuna kadar hissettiğim birlikte ağlayıp birlikte güldüğüm her alanda birbirimizi destekleyeceğimize sonuna kadar inandığım bu tez kapsamında da tüm süreçlerde desteğini esirgemeyen Burcu GÜNDÜZ'e sonsuz teşekkür ederim.

Bu süreçte bana inanan, desteklerini her koşulda bana hissettiren, iyi ve kötü her anımda yanımda olan tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Hayatım boyunca bana inanan, yaptığım her işte arkamda olan, desteğini eksik etmeyen, her düştüğümde elimden tutup kaldıran, hayallerimi gerçekleştirmek için hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan başta annem Meryem AYDIN ve babam Mehmet AYDIN olmak üzere tüm aileme çok teşekkür ederim.

Şubat,2025

Tuğçe AYDIN

Bu tez BAP-2311 numaralı proje ile T.C İstanbul Kültür Üniversitesi BAP Birimi tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	i
KISALTMALAR	iv
SEMBOL VE BİRİM LİSTESİ.....	vi
ŞEKİL LİSTESİ.....	vii
TABLO LİSTESİ	ix
ÖZET.....	x
ABSTRACT	xi
GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Soya (<i>Glycine max</i> [L.] Merr.).....	4
2.2. Abiyotik ve Biyotik Stres Faktörleri.....	12
2.2.1. Kuraklık Stresi	13
2.2.2. Fotosentetik Tepkiler	20
2.2.3. Biyokimyasal ve Antioksidan Tepkiler	21
2.2.4. Rehidrasyon	24
2.2.5. Kuraklıkta Fitohormonlar ve Genler	25
2.2.5.1. ABA Bağımlı Sinyal Yolu	25
2.2.5.2. ABA Bağımsız Sinyal Yolu	25
2.3. Kuraklık Stresinde Rol Alan Önemli Transkripsiyon Faktörler	34
2.3.1. NFYA5 Ailesi.....	36
2.4. Kuraklık Stresi ve Transkriptomik Çalışmalar	42
2.4.1. RNA Dizilemesi.....	44
3. MATERYAL - METOT	47
3.1. Bitki Materyallerinin Yetiştirilmesi ve Kuraklık Stres Uygulamaları.....	47
3.2. Biyokimyasal Analizler	48
3.2.1. Malondialdehit (MDA) Analizi	48
3.2.2. Fotosentetik Pigment Analizi	49
3.2.3. Prolin Analizi.....	49

3.3. RNA Ekstraksiyonu ve cDNA Sentezi	50
3.4. GmNFYA5 Anlatımının Qrt-Pzr İle Saptanması.....	53
3.4.1. Gradient PZR	53
3.4.2. qRT- PZR.....	54
3.5. mRNA Sekanslama.....	55
3.6. RNA Dizileme Sonrası Veri Setlerinin Oluşturulması ve RNASTAR ile Anlatım Normalizasyonu	56
3.7. GmNFYA5 ile İlişkili Hem Aba Bağımlı Hem De Aba Bağımsız Sinyal Yollarında Görev Alan Genlerin Anlatım Profillerinin Belirlenmesi	57
3.8. İstatistiksel Analiz	57
4. SONUÇLAR	58
4.1. Bitki Materyallerinin Yetiştirilmesi ve Kuraklık Stres Uygulamaları.....	58
4.2. Biyokimyasal Analizler	66
4.2.1. Malondialdehit (MDA) Tayini	66
4.2.2. Klorofil Tayini	68
4.2.3. Prolin Konsantrasyon Tayini	71
4.3. RNA Ekstraksiyonu ve cDNA Sentezi	73
4.4. mRNA Sekanslama.....	73
4.4.1. GO ve KEGG İle DEG'lerin Fonksiyonel Zenginleştirme Analizi	83
4.4.2. Kuraklık Stresi Altında ABA Biyosentezi ve Sinyal Yollarında Yer Alan DEG'ler.....	94
4.4.3. Kuraklık Stresi Altında Askorbat ve Glutasyon Mekanizmalarında Yer Alan DEG'ler.....	96
4.4.4. Yeniden Sulama Uygulamasındaki DEG'ler.....	96
5. TARTIŞMA	103
6. KAYNAKÇA	121

KISALTMALAR

AA: Askorbik asit

ABA: Absisik asit

ABF: ABRE bağlama faktörleri

AP2/ERF: APETALA2/Etilen Tepki Elemanı Bağlayıcı Faktör

APX: Askorbat peroksidaz

ASC: Askorbat

AUX: Oksin

BR: Brassinosteroidler

bZIP: Temel lösin fermuar

CAT: Katalaz

CBF: C tekrar bağlanma faktörü

CK: Sitokinin

CO₂: Karbondioksit

CPK: Kalsiyum bağımlı protein kinaz

DEG: Diferansiyel olarak anlatım yapan genler

DHAR: Dehidroaskorbat redüktaz

DNA: Deoksiribonükleik asit

DREB: Dehidrasyona duyarlı element bağlayıcı protein

ET: Etilen

GO: Gen ontolojisi

GR: Glutasyon redüktaz

Gs: Stoma iletkenliği

GSH: İndirgenmiş Glutasyon

H₂O₂: Hidrojen peroksit

HAP: Hem aktivatör faktörü

HTH: Heliks turn heliks

JA: Jasmonik asit

JAZ: Jasmonat Zim Domain

KEGG: Kyoto Genler ve Genomlar Ansiklopedisi

MDA: Malondialdehit

MDHAR: Monodehidroaskorbik asit redüktaz

MYC2: Miyelositomatozis

NF-Y: Nükleer faktör Y alt ünite

O₂⁻: Süperoksit anyon radikalleri

O₂: Singlet oksijen

·OH: Hidroksil radikalleri

P5CS: Prolin-5-karboksilat sentaz

PZR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Pn: Net fotosentez

POD: Peroksidaz

PP2C: Protein fosfataz 2C

qRT-PZR: Gerçek zamanlı kantitatif revers-transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu

R: Generatif gelişim

RNA-Seq: RNA dizileme

ROS: Reaktif oksijen türevleri

SA: Salisilik asit

SOD: Süperoksit dismutaz

TF: Transkripsiyon faktörü

Tr: Terleme oranı

V: Vejetatif gelişim

SEMBOL VE BİRİM LİSTESİ

%: Yüzde

µg: mikrogram

µL: Mikrolitre

µmol: Mikromolar

°C: Santigrat derece

A: Absorbans

dH₂O: Distile su

dk: Dakika

g: Gram

Kg: Kilogram

mg: Miligram

Mha: Milyon hektar

mL: Mililitre

nm: Nanometre

sn: Saniye

TA: Taze ağırlık

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2. 1. Vejetatif dönemdeki soya bitkisi	5
Şekil 2. 2. Soya bitkisinin vejetatif gelişme aşamaları	6
Şekil 2. 3. Soya bitkisinin generatif dönemi	7
Şekil 2. 4. Soyada çiçeklenme, bakla gelişimi, tohum gelişimi ve olgunlaşma süreçleri	8
Şekil 2. 5. Dünya genelindeki soya ekim alanları.....	9
Şekil 2. 6. Türkiye’de soya üretimi yapan önemli iller.....	10
Şekil 2. 7. Soyanın dünya çapındaki üretim kapasitesi ve ekim alanı	11
Şekil 2. 8. Bitkilerin abiyotik strese karşı verdikleri cevaplar ve adaptasyon stratejileri.....	13
Şekil 2. 9. Bitkilerin kuraklık stresinin olumsuz etkilerine karşı geliştirdiği adaptif mekanizmalar	15
Şekil 2. 10. Kuraklık stresinin etkileri ve bitkilerde morfo-fizyolojik tepkiler	17
Şekil 2. 11. Su stresi nedeniyle bitki yaprak ve köklerinin morfolojik ve anatomik yapısındaki değişimler.	20
Şekil 2. 12. Kuraklık stresinde antioksidan mekanizmanın düzenlenmesi.....	23
Şekil 2. 13. Kuraklık stresinde sinyal iletimi.....	26
Şekil 2. 14. Kuraklık stres tepkisinde yer alan ana transkripsiyon faktörlerinin ve transkripsiyonel ağın şematik gösterimi	29
Şekil 2. 15. Stres cevabının oluşumunda görevli transkripsiyon faktörleri ve sinyal yolları	32
Şekil 2. 16. NF-Y'nin gen ifadesini modüle ettiği moleküler mekanizmalar	36
Şekil 2. 17. Günümüzde kullanılan omik teknolojiler	44
Şekil 4. 1. 14 günlük Ataem/150-43/Üstün/101-15 bitki gelişimi.....	58
Şekil 4. 2. 10 günlük kuraklık stresine Ataem ve Üstün kontrol bitkileri ve mutantlarının cevapları.....	59
Şekil 4. 3. 13 günlük kuraklık stresine Ataem ve Üstün kontrol bitkileri ve mutantlarının cevapları.....	60
Şekil 4. 4. Yeniden sulama uygulaması sonrası Üstün ve 101-15 bitkilerinde iyileşme yetenekleri	61
Şekil 4. 5. Yeniden sulama uygulaması sonrası Ataem-07 ve 150-43 bitkilerinde iyileşme yetenekleri	62
Şekil 4. 6. Üstün soya çeşidinin Kuraklık stresine ve yeniden sulamaya karşı verdikleri cevaplar	64
Şekil 4. 7. 101-15 soya çeşidinin Kuraklık stresine ve yeniden sulamaya karşı verdikleri cevaplar.....	64

Şekil 4. 8. Ataem soya çeşidinin Kuraklık stresine ve yeniden sulamaya karşı verdikleri cevaplar.....	65
Şekil 4. 9. 150-43 soya çeşidinin Kuraklık stresine ve yeniden sulamaya karşı verdikleri cevaplar.....	65
Şekil 4. 10. Tüm Bitkilere ait Kontrol, Kuraklık ve Yeniden Sulama MDA İçeriklerinin Oranı.....	68
Şekil 4. 11. Tüm Bitkilere ait Kontrol, Kuraklık ve Yeniden Sulama Klorofil A İçeriğinin Oranı.....	70
Şekil 4. 12. Tüm Bitkilere ait Kontrol, Kuraklık ve Yeniden Sulama Klorofil B İçeriğinin Oranı.....	71
Şekil 4. 13. Tüm Bitkilere ait Kontrol, Kuraklık ve Yeniden Sulama Total Klorofil İçeriğinin Oranı.....	71
Şekil 4. 14. Tüm Bitkilere ait Kontrol, Kuraklık ve Yeniden Sulama Prolin İçeriğinin Oranı.....	73
Şekil 4. 15. Örnekler arasında en fazla varyasyon gösteren ilk 50 genin ekspresyon profili.....	77
Şekil 4. 16. Kontrol, kuraklık ve yeniden sulama için transkriptomik analizler	82
Şekil 4. 17. Üstün ve 101-15 için KEGG analizleri.....	84
Şekil 4. 18. Ataem ve 150-43 için KEGG analizleri.....	85
Şekil 4. 19. Üstün ve 101-15 için GO:MF analizleri.....	87
Şekil 4. 20. Ataem ve 150-43 için GO:MF analizleri.....	88
Şekil 4. 21. Üstün ve 101-15 için GO:BP analizleri.....	89
Şekil 4. 22. Ataem ve 150-43 için GO:BP analizleri.....	90
Şekil 4. 23. Üstün ve 101-15 için GO:CC analizleri	91
Şekil 4. 24. Ataem ve 150-43 için GO:CC analizleri	92
Şekil 4. 25. Üstün, 101-15, Ataem ve 150-43 soya bitkilerinde kuraklık stresi ardından yeniden sulama uygulamasındaki DEG'ler.....	97
Şekil 4. 26. Soya bitkilerinde kuraklık stresi ve yeniden sulama ile birlikte NFYA5 gen anlatımı değişimi	102
Şekil 5. 1. ABA biyosentezi yolağı ve yolak ile ilişkili genler.....	107
Şekil 5. 2. Kuraklık stresinde ABA bağımlı yolak ve yolak ile ilişkili genler	110
Şekil 5. 3. Kuraklık stresinde glutatyon metabolizmasında rol oynayan genler.....	114

TABLO LİSTESİ

Tablo 2. 1. Soyada kuraklık ile ilişkili transkripsiyon faktörleri.....	30
Tablo 2. 2. Kuraklık stresinde rol oynayan NF-Y genleri	41
Tablo 3. 1. Tezde kullanılan soya çeşitleri mutantlara ait uygulamalar.....	48
Tablo 3. 2. RNA İzolasyonlarına ait Konsantrasyon-Safılık Grafiği	51
Tablo 3. 2. RNA İzolasyonlarına ait Konsantrasyon-Safılık Grafiği(devamı).....	52
Tablo 3. 3. cDNA sentezi için kullanılan amplifikasyon koşulları	53
Tablo 3. 4. GmNFYA5 Anlatımı için q-RT-PZR'da Kullanılan Primerler	53
Tablo 3. 5. Gradient PZR amplifikasyon koşulları	54
Tablo 3. 6. qRT-PZR amplifikasyon koşulları	54
Tablo 4. 1. Üstün, 101-15, Ataem ve 150-43 Ortalama Boy ve Kök Uzunlukları.....	63
Tablo 4. 2. Üstün,101-15, Ataem ve 150-43 Ortalama MDA İçeriği	67
Tablo 4. 3. Üstün,101-15, Ataem ve 150-43 Ortalama Total Klorofil İçeriği	69
Tablo 4. 4. Tüm Bitkilere ait Prolin İçerikleri.....	72
Tablo 4. 5. RNA sekanslama örneklerinin kalite ve hizalama oranları.....	74
Tablo 4. 5. RNA sekanslama örneklerinin kalite ve hizalama oranları (devamı)	75
Tablo 4. 6. En fazla varyasyon gösteren il 50 genin ekspresyonlarına ait kat değişimleri.....	78
Tablo 4. 6. En fazla varyasyon gösteren il 50 genin ekspresyonlarına ait kat değişimleri(devamı)	79
Tablo 4. 6. En fazla varyasyon gösteren il 50 genin ekspresyonlarına ait kat değişimleri (devamı)	80
Tablo 4. 7. Kuraklık ile ilişkili genlerin Üstün,101-15, Ataem ve 150-43 kuraklık gruplarındaki ekspresyon değişimi	93
Tablo 4. 7. Kuraklık ile ilişkili genlerin Üstün,101-15, Ataem ve 150-43 kuraklık gruplarındaki ekspresyon değişimi (devamı).....	94
Tablo 4. 8. Kuraklık stresi ilişkili genlerin yeniden sulama uygulaması sonrası Üstün,101-15, Ataem ve 150-43 gruplarındaki ekspresyon değişimi.....	99
Tablo 4. 9. Yeniden sulama uygulamasındaki DEG'lerin Üstün,101-15, Ataem ve 150-43 gruplarındaki ekspresyon değişimi	100
Tablo 4. 9. Yeniden sulama uygulamasındaki DEG'lerin Üstün,101-15, Ataem ve 150-43 gruplarındaki ekspresyon değişimi (devamı).....	101

ÖZET

Soya (*Glycine max* [L.] Merr.), dünya çapında önemli ekonomik kazançların elde edildiği yağ bitkilerinden birisi olarak bilinmektedir. Kuraklık, küresel iklim koşullarının değişmesiyle birlikte artışa geçmekte ve dünya çapında soya verimliliğini olumsuz etkileyen en önemli abiyotik stres faktörü olarak değerlendirilmektedir. Transkripsiyon faktörleri, stres tipine bağlı olarak çeşitli transkript düzenlemeleri sağlar ve stresle ilgili çok sayıda genin bitkilerde doğrudan veya dolaylı olarak devreye girmesini kontrol eder. NF-YA transkripsiyon faktörleri, soyada verimi önemli ölçüde etkileyen kuraklığa karşı tolerans sağlamaktadır. GmNFYA5, tüm GmNFYA'lar arasında kuraklık stresinde gen anlatımı yüksek olan bir transkripsiyon faktörüdür.

Mutant soya hatlarında kuraklık stresinin GmNFYA5 aracılı etkisini araştırmayı amaçlayan bu çalışmada, optimum koşullarda 14 gün boyunca yetiştirilen mutant ve mutantın kökenlendiği orjinal çeşide ait bitkiler kuraklık stresi için 14 gün boyunca sudan kesilmiştir. Bitkinin stresten kurtulmasını değerlendirmek için yeniden su uygulamasından 24 saat sonra yeniden sulamanın bitkilerde neden olduğu değişiklikler gözlenmiştir. Kuraklık stresi ve yeniden sulamanın etkisinin araştırılması için biyokimyasal analizler gerçekleştirilmiştir. Aynı zamanda hasat edilen yapraklardan total RNA izolasyonu ve cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. İzolasyon sonucu elde edilen RNA'ların dizilemesi (RNA-seq) gerçekleştirilmiş ve transkriptom analizi sonucunda kuraklık stresinde anlatımı artan ve azalan genler tespit edilmiştir. Tespit edilen genlerin gen ontolojisi (GO) ve KEGG analizleri gerçekleştirilmiştir. Kuraklık stresinin bitki boy uzunluklarında azalmaya ve soya yapraklarında ciddi hasarla neden olduğu görülmüştür. MDA ve prolin içerikleri kuraklık stresinde artarken klorofil miktarında azalma tespit edilmiştir. Tüm biyokimyasal analizlerde yeniden sulama uygulamasında 150-43 soya mutantında kuraklık stresi etkilerinin iyileştiği gözlemlenmiştir. NFYA ilişkili hem ABA'ya bağımlı hem de ABA'ya bağımsız sinyal yollarında rol oynayan genlerin anlatımları belirlenmiştir. Elde edilen RNA-seq verileri içerisinde kuraklık ile ilişkili genlerin stres yanıtında rol oynadıkları mekanizmalar ABA biyosentezi, ABA bağımlı sinyal yolu ve glutatyon metabolizması başta olmak üzere açıklanmıştır. Kuraklık stresine yanıtta hem ABA bağımlı hem de ABA bağımsız yolda rol oynadığı bilinen GmNFYA5 geninin farklı soya çeşitleri ve mutantlarında gen anlatımları qRT-PZR ile belirlenmiştir. Kuraklık stresi altında NFYA5 gen anlatımı en yüksek 150-43 mutantlarında belirlenirken yeniden sulama uygulaması sonrası en az gen anlatımı yine 150-43 mutantlarında tespit edilmiştir. Soyada GmNFYA5'in anlatım profilleri, transkriptomdaki değişimler ile birlikte değerlendirilerek mutant hatların kuraklık stresine karşı gen anlatım düzeyleri belirlenmiştir. Çalışmanın sonucunda soyada kuraklık stres toleransına sahip çeşitlerin geliştirilmesine yönelik olarak mutant hatlarda var olan stres ilişkili yollar ve yeniden sulamanın kuraklık stresi etkisini iyileştirme yeteneği belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Kuraklık, Soya, NFYA5, RNA sekanslama, ABA bağımlı, ABA bağımsız

ABSTRACT

Soybean (*Glycine max* [L.] Merr.) is known as one of the oil crops from which significant economic gains are obtained worldwide. Drought is increasing with the change in global climatic conditions and is considered to be the most important abiotic stress factor that negatively affects soybean productivity worldwide. Transcription factors provide various transcript regulations depending on the type of stress and control the direct or indirect activation of numerous stress-related genes in plants. NF-YA transcription factors confer drought tolerance in soybean, which significantly affects yield. GmNFYA5 is the transcription factor that shows high gene expression under drought stress.

In this study, which aimed to investigate the GmNFYA5 under drought stress in mutant soybean lines and the original variety from which the mutant originated. These plants grown under optimum conditions for 14 days, were withheld from water for 14 days for drought stress. To evaluate the plant's recovery from stress, the changes caused by re-watering in the plants were observed 24 hours after re-watering. Biochemical analyzes were carried out to investigate the effect of drought stress and rewatering. Total RNA isolation and cDNA synthesis were also performed from harvested leaves. Sequencing (RNA-seq) of the RNAs was performed and as a result of transcriptome analysis, genes whose expression increased and decreased under drought stress were identified. Gene ontology (GO) and KEGG analyses of the identified genes were performed. It was observed that drought stress caused a decrease in plant height and severe damage to soybean leaves. MDA and proline contents increased under drought stress while chlorophyll content decreased. In all biochemical analyses, it was observed that drought stress effects were improved in the 150-43 soybean mutant under rewatering. The expression of NFYA-related genes involved in both ABA-dependent and ABA-independent signaling pathways were determined. From the RNA-seq data obtained, the mechanisms by which drought-associated genes play a role in stress response were explained, particularly ABA biosynthesis, ABA-dependent signaling pathway and glutathione metabolism. Gene expression of GmNFYA5, which is known to play a role in both ABA-dependent and ABA-independent pathways in drought stress response, was determined by qRT-PZR in different soybean cultivars and mutants. Under drought stress, the highest NFYA5 gene expression was detected in 150-43 mutants, while the lowest gene expression was detected in 150-43 mutants after rewatering. Expression profiles of GmNFYA5, were evaluated together with the changes in the transcriptome to reveal the molecular responses of the mutant lines under drought stress. As a result of the study, the stress-related pathways present in the mutant lines and the ability of rewatering to ameliorate the drought stress effect were determined for the development of soybean varieties with drought stress tolerance.

Keywords: Drought, Soybean, NFYA5, RNA sequencing, ABA dependent, ABA independent

GİRİŞ

Günümüzde ekimi gerçekleştirilen soya (*Glycine max*) yaklaşık 5000 yıl önce Çin’de yabani soyadan kökenlenmiştir. Soya ekonomik açıdan en önemli baklagillerden biri haline gelmiştir. Önemli bir yağlı tohum ürünü olmakla birlikte gıda ve hayvan yemi için toplam proteinin dörtte birinden fazlasını sağlamaktadır (Liu ve ark., 2020). Başlıca üreticileri ve ihracatçıları arasında yer alan ülkeler Brezilya, Amerika Birleşik Devletleri ve Arjantin’dir (Freitas ve ark., 2022). Türkiye’de soya üretiminin büyük kısmı Çukurova Bölgesi’nde yapılmakla birlikte verim yıllara göre değişiklik göstermektedir. Son yıllarda kuraklık gibi stres faktörlerinin artması ve nüfus artışıyla birlikte toleranslı soyaya olan talep giderek artmaktadır.

Kuraklık soyanın yaşam döngüsünde çimlenmeden tohum oluşumuna kadar tüm aşamalarda verimi etkileyen en önemli faktördür. Kuraklık altında soya veriminin %50’den fazla azaldığı bilinmektedir (Yang ve ark., 2023). Kuraklık, su eksikliğinden kaynaklanan önde gelen abiyotik streslerden biridir. Topraktaki su eksikliği nedeniyle bitkiler su ihtiyacını karşılamak için su bulmakta zorlanır (Seleiman ve ark., 2021). İlk olarak köklerin yeterli su emmesi zorlaşır ve bitkiler su içeriğini kaybeder. Bunun sonucunda kuraklık stresi yaprakların solup sarkmasına, hücre su potansiyelinde ve diğer fizyolojik süreçlerde değişikliklere sebep olmaktadır (Wang ve ark., 2022). Bitkiler abiyotik streslere ve adaptasyon süreçlerine moleküler, hücresel, fizyolojik ve biyokimyasal seviyelerde yanıt verir. Şiddetli su eksiklikleri, bitki hücrelerinin zar yapısını düzensiz hale getirebilmektedir. Hücre zarı bütünlüğü, organellerde meydana gelen tüm fizyolojik ve biyokimyasal süreçleri yürütmek için önemlidir. Kuraklık stresi ayrıca reaktif oksijen türlerinin (ROS) aşırı üretimine neden olur, bu da hücre yapısında oksidatif hasara neden olur ve böylece hücresel metabolizmayı bozar. Bitkiler, kuraklık stresinin normal bitki metabolizması üzerindeki zararlı etkilerini hafifletmek amacıyla hücre içi antioksidan enzim aktivitesi yoluyla fazla ROS’u uzaklaştırır (Feng ve ark. 2019; Shaffique ve ark.,2024). Soyada kuraklığa yanıtın anlaşılmasında özellikle en önemli fitohormon olarak değerlendirilen ABA, stres sinyalinin algılanıp iletilmesi ve yanıt oluşumuna kadar pek çok hücresel süreçte rol

oynamaktadır. Stoma hareketi, antioksidan savunma sisteminin aktivasyonu ve gen ifadesini düzenleyerek bitkilerin kuraklık stresine verdiği tepkilerde temel görevler üstlenmektedir (Li ve ark., 2022b). Kuraklık stresinde ABA aracılı yanıtlar ABA bağımlı ve ABA bağımsız olmak üzere iki ana yoldan oluşmaktadır. Bu yollar farklı transkripsiyon faktörleri aracılığıyla stres yanıtında rol oynarken aynı zamanda yollar arası etkileşimle de stres yanıtını düzenleyebilir. ABA bağımlı yolda AREB, NF-YA, WRKY ve MYB gibi farklı transkripsiyon faktörleri görev alır. ABA bağımsız yolda ise DREB2A, MYC2 ve NAC gibi stres yanıtının oluşumunda rol oynamaktadır. ABA sinyal yollarının düzenlenmesinde kilit roller oynayan NF-YA transkripsiyon faktörleri, verim için ciddi tehdit oluşturan abiyotik streslere karşı toleransı sağlanmaktadır. Tüm GmNFYA'lar arasında kuraklık koşulları altında transkripsiyon düzeyi en yüksek olan GmNFYA5'in olarak belirlenmiştir. NF-YA5'in aşırı ifadesi, yaprak su kaybını azaltarak yabancı tip bitkilere kıyasla kuraklık stresine karşı direnci arttırdığı NF-YA5 geninin susturulduğu mutantların ise kuraklık stresine karşı daha hassas olduğu gösterilmiştir. Yapılan bu çalışmalarda NF-YA5'in kuraklık stresi tepkilerini pozitif olarak düzenlediği tespit edilmiştir. Bu nedenle, kuraklık stresinde metabolik süreçlerin ve fonksiyonel genlerin transkripsiyonel düzenlenmesinde ABA etkileşimlerinin açıklanması gerekmektedir (Wu ve ark., 2022).

Bu etkileşimleri ortaya çıkarmak için transkriptomik, proteomik ve metabolomik çalışmalar yaygın olarak kullanılmaktadır. Geçtiğimiz on yılda, yüksek verimli omikler, sistem biyolojisi ve genom düzenleme teknikleri de dahil olmak üzere birçok yüksek verimli teknoloji geliştirilmiştir. Birçok transkriptomik çalışma ile bitkilerin çevresel strese yanıt veren moleküler mekanizmaları anlaşılma çalışılmıştır. Transkriptom, stres yanıtında çok önemli bir rol oynamasının yanı sıra, vejetatif büyüme ve gelişmeye de katkıda bulunmaktadır. Bitkiler, çevresel değişikliklere yanıt olarak düzenleyici mekanizmalar aracılığıyla çeşitli transkriptler üretir. Son zamanlardaki soya transkriptomuyla ilgili araştırmalar transkript izoformlarını tanımlama ve belirli genlerin potansiyel rollerini açıklamak amacıyla gerçekleştirilmiştir. Bu tür RNA-seq tabanlı izoform tahminleri, soyada abiyotik strese yanıt olarak genlerin ve proteinlerin değişen adaptasyon mekanizmalarını açıklayabilecek zengin fikirler sağlayacaktır (Kim ve ark., 2024).

Soyanın yaygın tarımsal kullanımı ve artan üretim talebi, daha yüksek verime ve çevresel stres faktörlerine karşı geliştirilmiş dirence sahip çeşitlerin geliştirilmesini gerektirmektedir (Xuan ve ark., 2022). Bu nedenle soyada kuraklığa verilen yanıtların ve kuraklığa tolerans mekanizmalarının anlaşılması daha verimli çeşitlerin geliştirilmesine yardımcı olabilir (Yang ve ark., 2023).

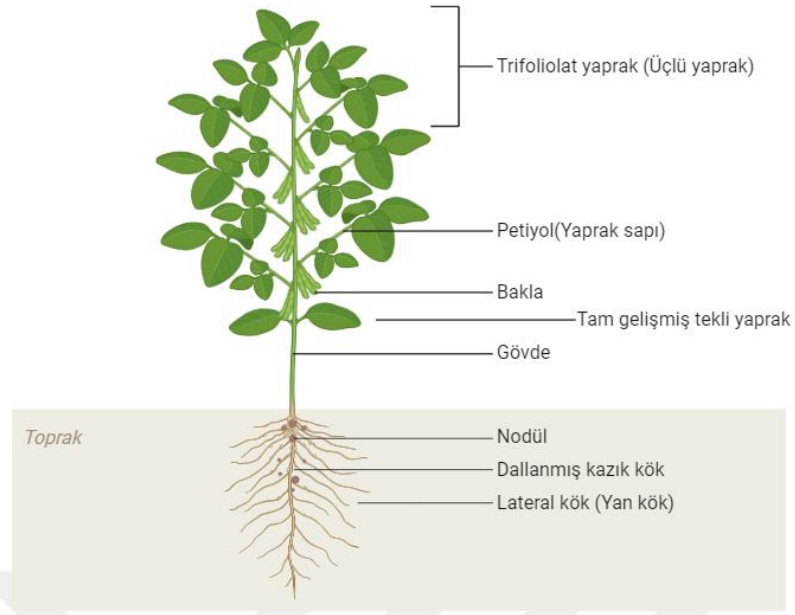
Bu tez kapsamında Üstün-1, Ataem-07 ve sırasıyla bu bitkilerden kökenlenen 101-15 ve 150-43 mutantların transkriptomik analizleri, kuraklık toleransında rol oynayan genleri belirlemek için normal, kuraklık ve yeniden sulama koşulları altında gerçekleştirilmiştir. Ayrıca farklı gruplara ait soya bitkilerinin kuraklık stresine verdiği yanıtların anlaşılması için gen anlatım profilleri ve bu genlerin rol oynadıkları mekanizmalar incelenmiştir. Soyada, kuraklık stresinde ABA bağımlı ve ABA bağımsız yollaklarda rol alan NFYA gen ailesine ait NFYA5 geni için qRT-PZR ile validasyon gerçekleştirilerek transkriptomik analizlerle doğrulanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. SOYA (*Glycine max* [L.] Merr.)

Soya (*Glycine max* [L.] Merr.), tropik, subtropikal ve ılıman iklimlerde yetişen, *Fabaceae* (*Leguminosae*) familyasına, *Fabales* takımına ve *Papilionaceae* alt familyasına ait bir baklagildir (Weerasekara ve ark., 2021; Arya ve ark., 2021). Soya yaklaşık 1100 Mb'lik orta büyüklükte bir genoma sahiptir ve 20 kromozom çifti halinde paketlenmiştir (Yang ve ark., 2008). Soya bitkisinde yapılan genomik çalışmalar doğrultusunda Williams 82 soya referans genomunda (Wm82.a2.v1) 56.044 protein kodlayan lokus ve 88.647 mRNA transkripti bulunmuştur (Gupta ve ark., 2021).

Soya bitkisinin gelişimi tohumların gelişimi ile başlamaktadır. Bunu vejetatif (V) ve generatif (R) dönemler takip eder. Vejetatif dönemdeki aşamalar tam gelişmiş üçlü yaprakların sayısına göre numaralandırılır. Generatif (R) aşamaları çiçeklenme ile başlamakla birlikte bakla gelişimini, tohum gelişimini ve bitki olgunlaşmasını içermektedir (Bastidas ve ark., 2008). Şekil 2.1'de soya bitkisinin vejetatif dönemdeki görünümü bulunmaktadır. Vejetatif aşamalar için bir nod üzerinde, açılmış veya katlanmamış yaprakçıkların bulunduğu bir yaprak çıkar.



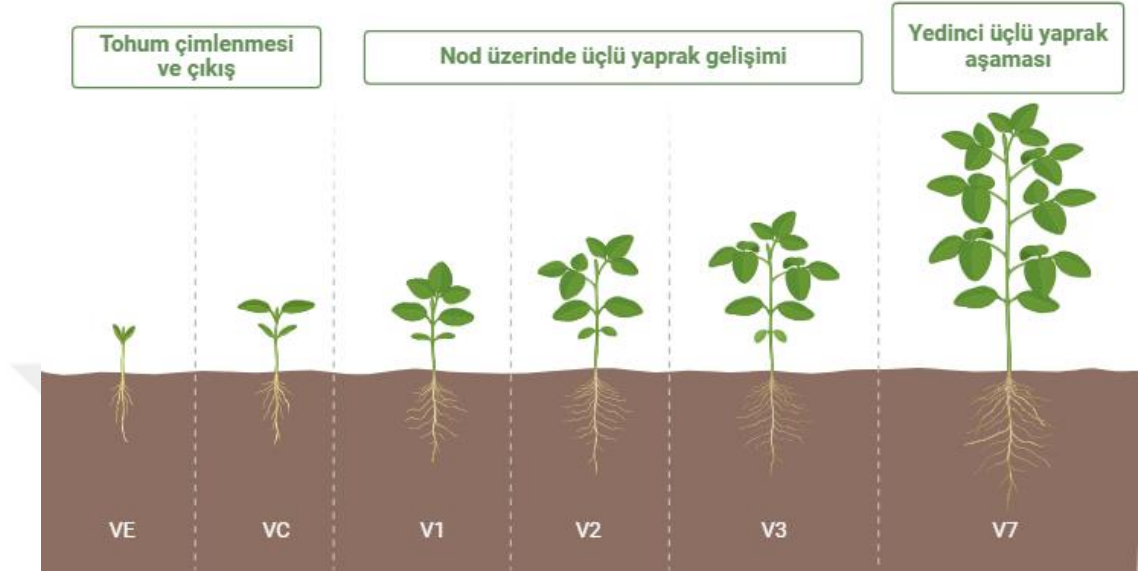
Şekil 2. 1. Vejetatif dönemdeki soya bitkisi (Endres ve ark., 1999)

Şekil 2.2’de gösterildiği gibi gelişim evreleri, tek yapraklı yaprak nodlarından yukarı doğru sayılmaktadır. V1’den Vn’ye kadar tüm evreler, üç yapraklı (trifoliolat) olan ve farklı düğümlerde tekil olarak üretilen gerçek yapraklara sahiptir. Bu yapraklar gövde üzerinde dönüşümlü olarak bulunmaktadır (Endres ve ark., 1999; Bastidas ve ark., 2008). Tohum çimlenmesi ve çıkış aşamasında (VE) emilen su tohum ağırlığının yaklaşık %50’sine eşit olduğunda çimlenmeye başlar. Tohumdan ilk olarak radikal veya birincil kök çıkmaktadır.

Vejetatif Aşamalar

1. VE (Tohum çimlenmesi ve çıkış)
2. VC (Kotiledon aşaması)
3. V1 (İlk üç yaprak)
4. V2 (İkinci üç yaprak)
5. V3 (Üçüncü üçlü yaprak)
6. V(n) (n’inci üç yaprak)

Kısa bir süre sonra hipokotil (gövde) ortaya çıkarak kotiledonlar ile birlikte toprak yüzeyine doğru büyümeye başlar. Aynı zamanda bu süre zarfında ana kökten yan kökler ve kök tüyleri de büyümeye başlar. Bu kökler bitkinin temel besin ve su emmesini sağlamaktadır (Nleya ve ark., 2013).



Şekil 2. 2. Soya bitkisinin vejetatif gelişme aşamaları (Nleya ve ark., 2013)

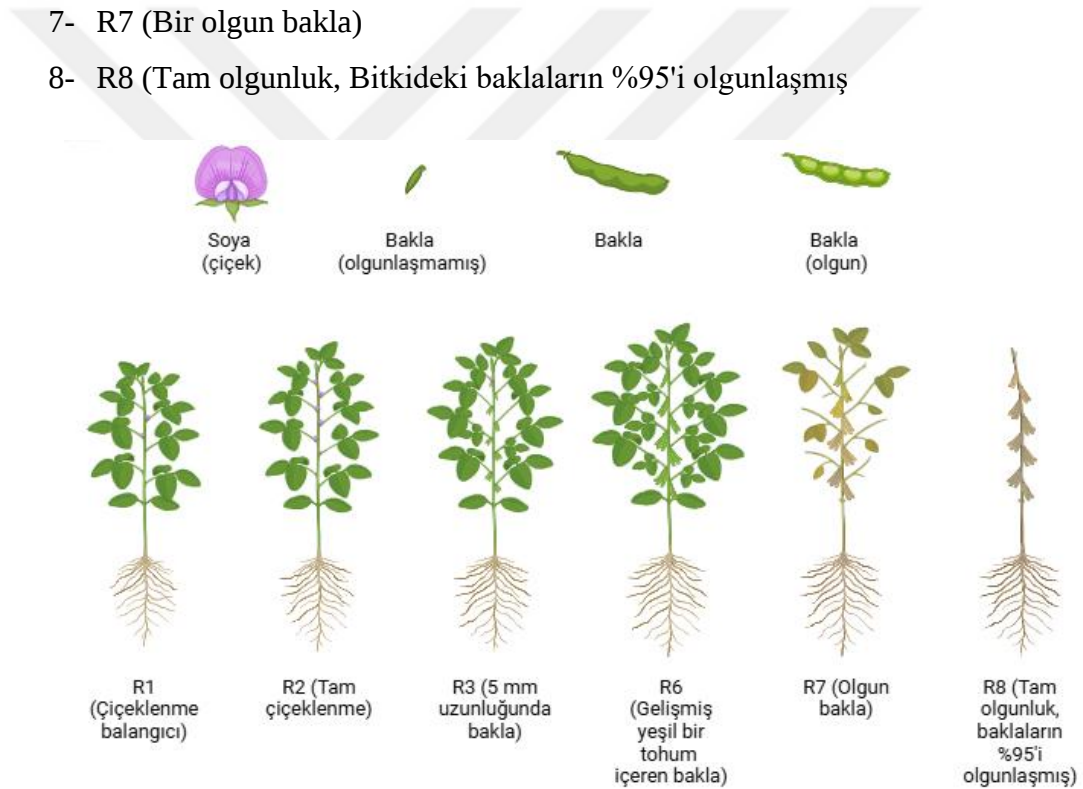
Kotiledon aşamasına gelindiğinde (VC) tek yapraklı yapraklar tamamen büyümüştür. Bu aşamada bitkinin besin ihtiyacı kotiledonlar tarafından karşılanmaktadır. Bu aşama ilk üçlü yaprak (V1) tamamen ortaya çıkıp açıldığında başlamaktadır. V1'den sonra gelişen yapraklardaki fotosentez ile bitkinin gelişimi sağlanmaktadır. Yeni üçlü yapraklar ortalama 3-5 gün içinde açmaktadır. VC'den sonraki V aşamaları, tek yapraklı yaprakların üzerindeki ana gövdedeki üst, tam gelişmiş yaprak nodu tarafından tanımlanır ve numaralandırılır (V1'den Vn'ye kadar olan aşamalar, tam gelişmiş üçlü yapraklarla numaralandırılır). V aşamaları belirlenirken dallardaki üç yapraklı yapraklar sayılmaz; Sayımda yalnızca ana gövdedeki üçlü yapraklar kullanılır. V5'ten sonra nod sayısının genellikle maksimuma ulaştığı R5'ten kısa bir süre sonraya kadar her 2-3 günde bir görünmeye başlamaktadır (Bastidas ve ark., 2008).

Vejetatif aşamaları dört kısma ayrılır: R1 ve R2 çiçeklenmeyi, R3 ve R4 bakla gelişimini, R5 ve R6 tohum gelişimini ve R7 ve R8 bitki olgunlaşmasını

tanımlamaktadır (Bastidas ve ark., 2008; Nleya ve ark., 2013). Generatif aşamaları Şekil 2.3'te belirtilmiştir.

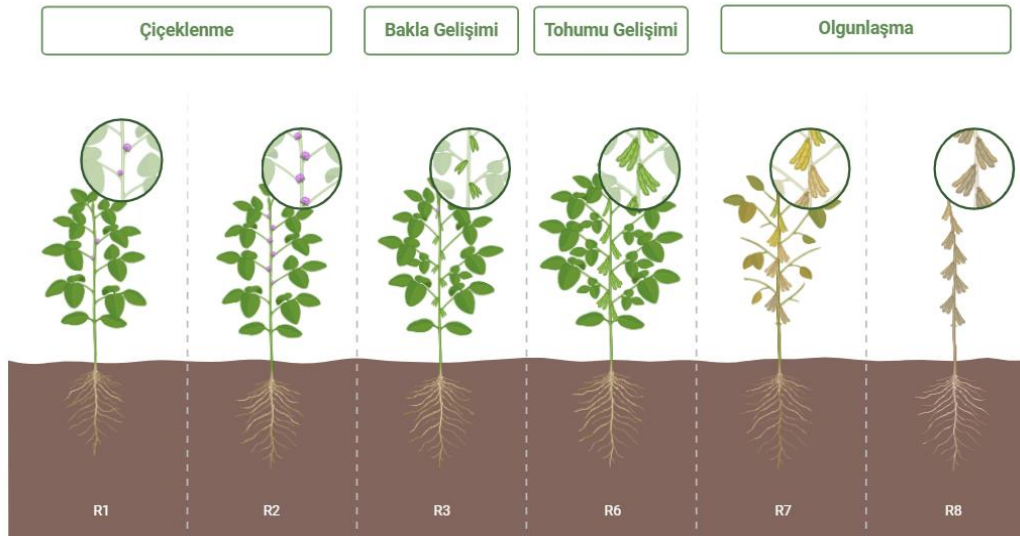
Generatif (Reprodüktif)Aşamaları

- 1- R1 (Çiçeklenme başlangıcı, ilk çiçek)
- 2- R2 (Tam çiçeklenme, Ana gövdede en üst iki boğumda çiçek)
- 3- R3 (5mm uzunluğunda bakla)
- 4- R4 (2cm uzunluğunda bakla)
- 5- R5 (3mm uzunluğunda tohum)
- 6- R6 (Gelişmiş yeşil bir tohum içeren bakla)
- 7- R7 (Bir olgun bakla)
- 8- R8 (Tam olgunluk, Bitkideki baklaların %95'i olgunlaşmış)



Şekil 2. 3. Soya bitkisinin generatif dönemi (Hodgson ve ark., 2012; Nleya ve ark., 2013)

Bitkinin ana gövdesindeki herhangi bir nod üzerinde en az bir çiçek bulunur. Soyanın çiçeklenmesi, çiçeklenmenin başladığı vejetatif aşamaya bağlı olarak her zaman ana gövdenin üçüncü ila altıncı nodunda başlamaktadır. R2 aşamasında ana gövdenin üstteki iki nodunun birinde açık bir çiçek görülür. Bu iki üst noddan en az biri tam gelişmiş bir yaprak göstermektedir. Bitkide yeni çiçeklerin görülmesi R2 ile R3 arasında yavaşlamaya başlamakla birlikte R5'e kadar tamamlanmaktadır. Ana yan kökler toprakta aşağıya doğru dönmüştür ve kök nodülleri tarafından azot fiksasyonu hızla artmaktadır. R4 aşaması, hızlı bakla büyümesini ve tam bakla aşamasının başlangıcında tohum gelişiminin başlangıcını göstermektedir. Bu dönem tohum verimi açısından en önemli dönemdir. R4'ten R6'ya kadar olan herhangi bir stres, diğer zamanlara göre daha fazla verim azalmasına neden olmaktadır. R4.5'te geç bakla oluşumu ve R5.5'te erken tohum dolumu en kritik olanıdır. Şu anda verim azalması esas olarak daha az bakladan kaynaklanmaktadır. Bu, verim kayıplarını azaltmak için gerekirse sulamanın dikkate alınması gereken kritik bir dönemdir. Son çiçeklenme ana gövde ucunda (R5'e kadar) meydana gelmektedir (Endres ve ark., 1999; Nleya ve ark., 2013).

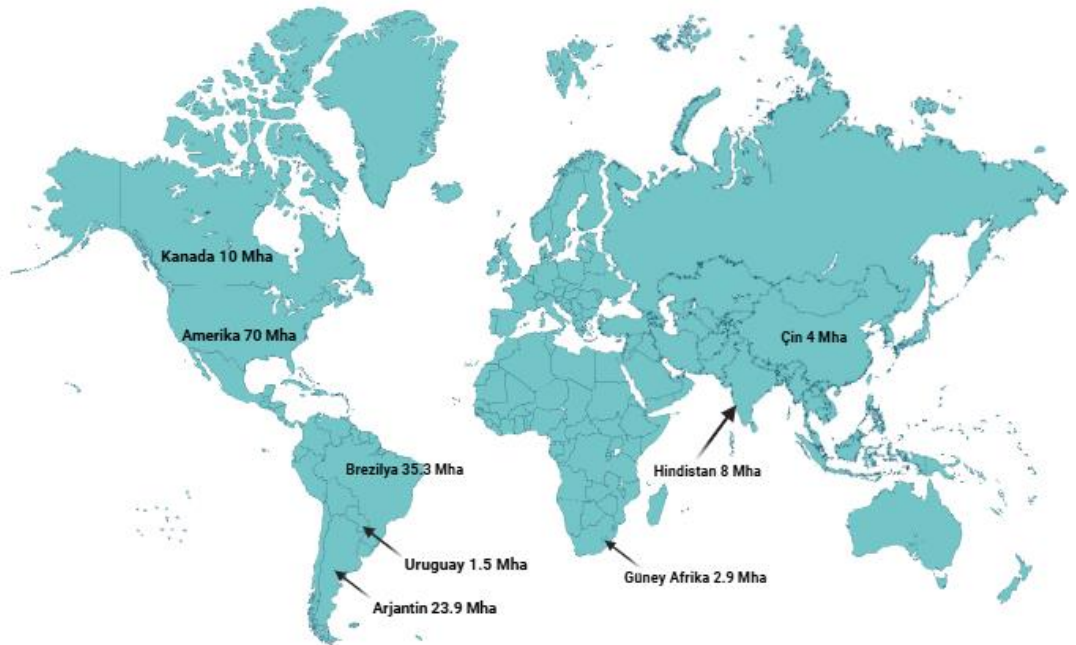


Şekil 2. 4. Soyada çiçeklenme, bakla gelişimi, tohum gelişimi ve olgunlaşma süreçleri (Endres ve ark., 1999; Nleya ve ark., 2013)

Genellikle R5 aşamasının yarısında bitki maksimum yüksekliğe, boğum sayısına ve yaprak alanına ulaşmaktadır. Şekil 2.4'te gösterildiği gibi R6 aşaması tam tohum aşaması olarak belirtilmektedir. Bu aşamada toplam bakla ağırlığı zirveye ulaşır.

Soyanın büyüme hızı hızlıdır ancak R6,5 kadar yavaşlayacak ve R7'de zirveye ulaşacaktır. Bu aşamada, yaprak sararmadan önce bitkinin en alt boğumlarından üç ila altı adet üçlü yaprak düşebilir. R7 aşaması, ana gövde üzerinde olgun rengi (kahverengi veya ten rengi) elde eden normal bir bakla ile başlamaktadır. Yaprakların sararması ve dökülmesi bu aşamada gözlemlenebilmektedir. R8 aşaması tam olgunluk aşaması olarak nitelendirilmektedir. Bu aşamada baklaların % 95'i olgun renge ulaşmıştır (Endres ve ark., 1999; Hodgson ve ark., 2012; Nleya ve ark., 2013)

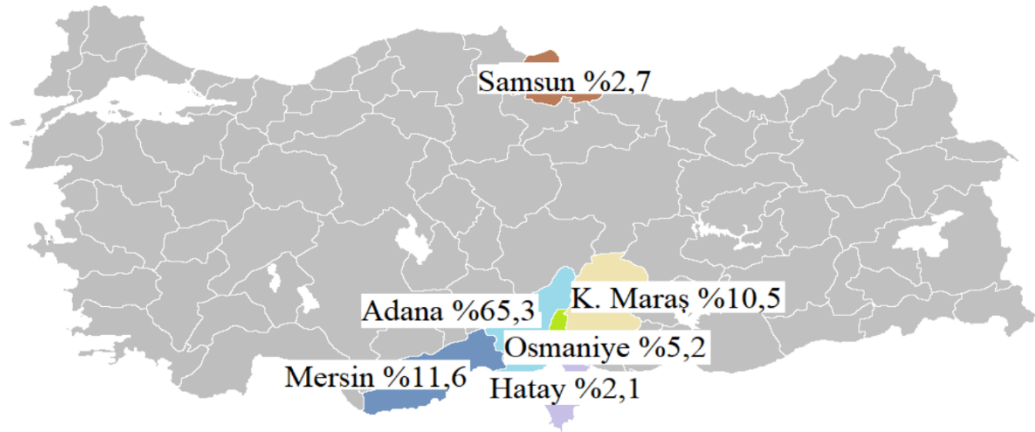
Günümüzde soya (*Glycine max* [L.] Merr.), dünya çapında en önemli ekonomik ve yağlı bitkilerden biri olarak bilinmektedir. Kolza tohumu, yer fıstığı, pamuk tohumu, ayçiçeği tohumu, keten tohumu gibi başlıca yağ bitkileri arasında birinci sırada (% 53) soya yer almaktadır (Gupta ve ark., 2021). Dünyadaki başlıca üreticileri arasında Şekil 2.5'te belirtildiği gibi ABD, Brezilya, Arjantin, Çin ve Hindistan yer almaktadır. Bu ülkeler küresel üretimin yaklaşık %90'ına katkıda bulunmaktadır (Rizzo ve Baroni, 2018). Dünya çapında hasat edilen toplam soya fasulyesinin % 35'i Amerika Birleşik Devletleri, % 34'ü Brezilya ve % 11'i Arjantin tarafından üretilmektedir (Shaffique ve ark., 2024).



Şekil 2. 5. Dünya genelindeki soya ekim alanları. Mha: Milyon hektar (Shaffique ve ark., 2024)

Türkiye’de soya üretimi ilk defa 1930’lu yıllarda Karadeniz Bölgesi’nde yapılmıştır. Günümüzde ise soya üretimi için Akdeniz Bölgesi öne çıkmaktadır. Dünya çapında yağ bitkileri arasında üretiminin yaklaşık % 50’sini oluşturmalarına rağmen Türkiye için bu oran yalnızca % 4 olarak belirlenmiştir.

Akdeniz Bölgesi ekim alanlarının % 92,3’ünü oluşturmaktadır. 2023 yılı Türkiye’ de soya ekim alanları il kapsamında ele alındığında % 59,3 ile Adana ilk sırada yer alırken, ikinci sırada Mersin (% 13,6), üçüncü sırada Kahramanmaraş (% 11,7) yer almaktadır. Türkiye’deki soya üretiminde Adana, Mersin, Kahramanmaraş, Osmaniye, Samsun ve Hatay en önemli illerdir. Bu altı il ülkedeki toplam soya üretiminin % 94,7’sini karşılamaktadır (Şekil 2.6). 2023 yılında 90 bin tonluk üretim ile Adana birinci sırada yer almaktadır. Mersin (16 ton) ikinci sırada yer alırken, Kahramanmaraş (14 ton) üçüncü sırada yer almaktadır. Soya verimi Türkiye’de yıllara göre değişiklik göstermektedir. 2023 yılına ait verilerde soya ekim alanı önceki yıla kıyasla % 14 oranında, üretim miktarı ise % 11,3 oranında azalmıştır (Özcan, 2024).

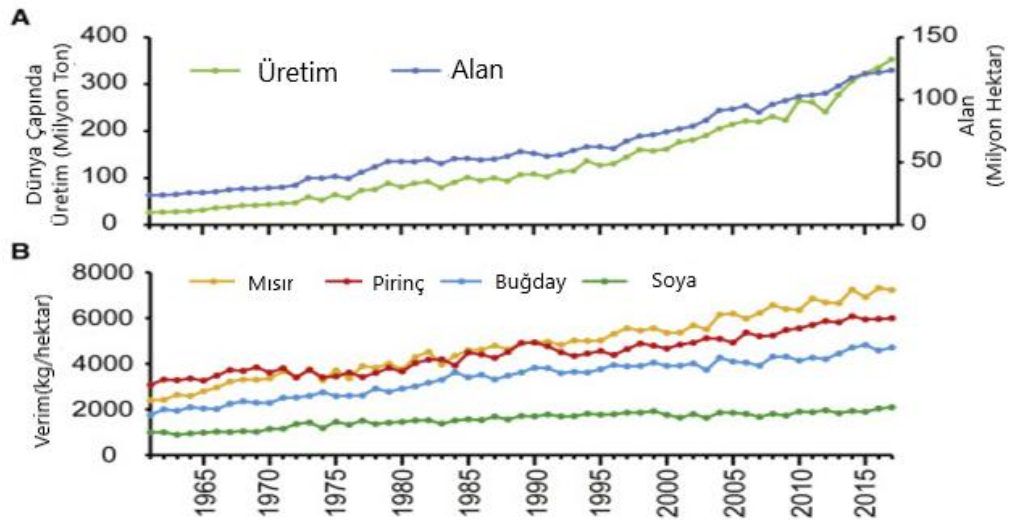


Şekil 2. 6. Türkiye’de soya üretimi yapan önemli iller (Özcan, 2024)

Soya karbonhidratlar, yağlar, proteinler, vitaminler, α -tokoferol ve mineraller gibi birçok besin içeriğine sahiptir (Arya ve ark., 2021). Soya tohumları yüksek oranda protein ve yağ içermesi sebebiyle besleyici bir bitki olarak değerlendirilmektedir. İnsan beslenmesinde % 69'a kadar protein ve % 30'a kadar yağ sağlamaktadır (Lam ve ark., 2010; Lu ve ark., 2021). Ayrıca yağ, karbonhidrat, C vitamini ve mineral içeriği açısından zengin olmasının yanı sıra antikanser özellikleri nedeniyle de dikkat çekmektedir (Feng ve ark., 2019).

Soya aynı zamanda hayvancılık, su ürünleri yetiştiriciliği, endüstriyel kullanım için de yüksek kalitede protein ve yağın ana kaynağıdır. Gıda, ilaç, yem ve biyoenerji üretiminde önemli rol oynayan önemli bir tahıl ve yağ bitkisi olduğu bilinmektedir (Wang ve ark., 2022). Ayrıca köklerdeki doğal nitrojen fiksasyonu yoluyla toprağın iyileştirilmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Son zamanlarda potansiyel bir biyoyakıt kaynağı olarak benimsenmiştir (Feng ve ark., 2019). Bu kadar çeşitlendirilmiş kullanım, soyaı giderek daha popüler bir ürün türü haline getirmektedir.

Toplumsal gelişme ve nüfus artışı ile birlikte soya bitkisine olan talep giderek artmaktadır. Dünya nüfusunun 2050 yılına kadar 9,8 milyara ulaşacağı tahmin edilirken, artan küresel nüfusun, mevcut gıda üretiminin iki katını gerektireceği düşünülmektedir. İstatistiksel veriler, dünya soya fasulyesi üretiminin 1961'den 2017'ye kadar yaklaşık 13 kat arttığını göstermiştir (Ray ve ark., 2013; Liu ve ark., 2020). Bu veriler Şekil 2.7'de belirtilmiştir. Ancak küresel soya üretim oranı ihtiyaç duyulandan çok altındadır (Ray ve ark., 2013; Poudel ve ark., 2023).



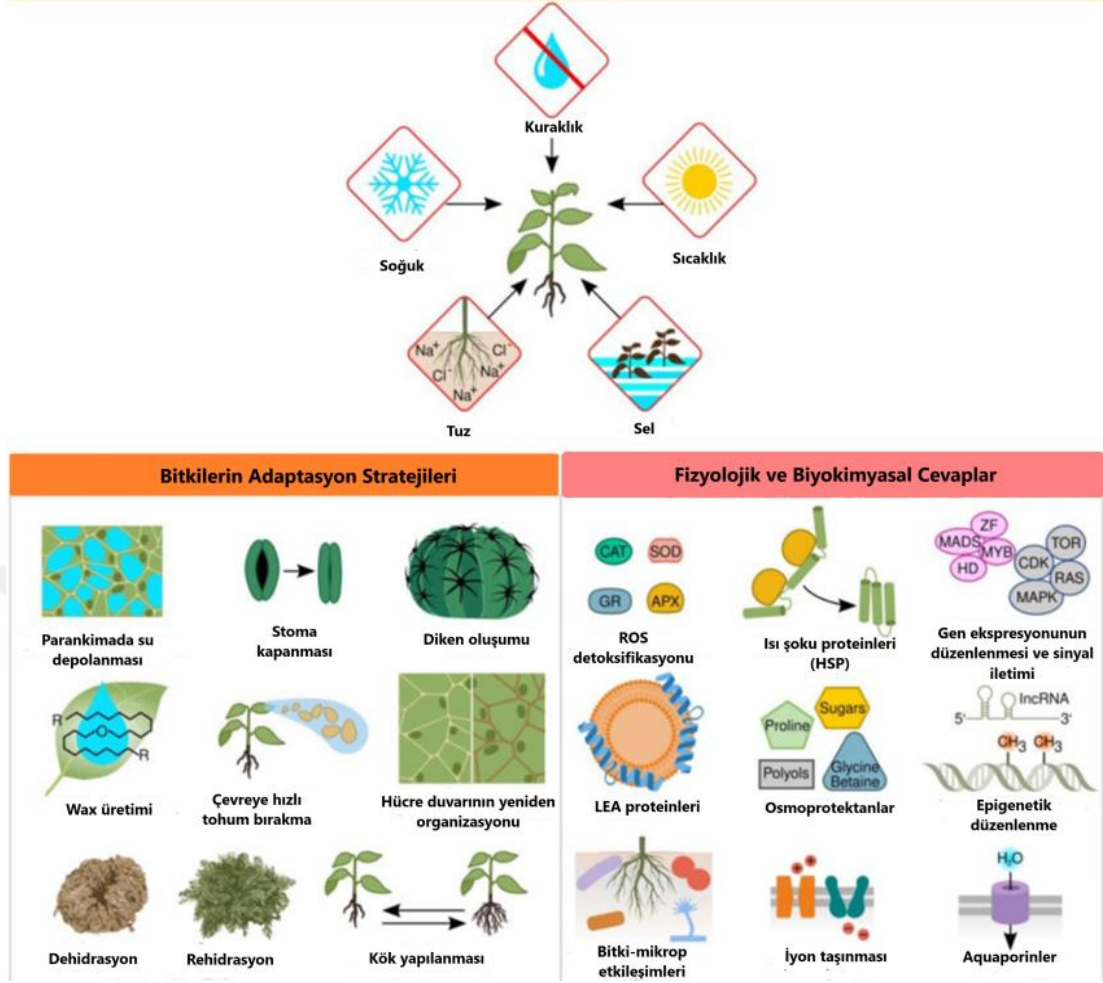
Şekil 2. 7. Soyanın dünya çapındaki üretim kapasitesi ve ekim alanı (Liu ve ark., 2020)

İklim ciddi biçimde değişmeye devam ettikçe yeterli verim elde etmek daha da zorlaşmaktadır. Bu nedenle, soya üretimini artırmak için kuraklık, sel, aşırı sıcaklık ve ağır metal kirliliği gibi çevresel streslerin meydana getirdiği zorlukların dikkate alınması gerekmektedir (Poudel ve ark., 2023).

2.2. ABİYOTİK ve BİYOTİK STRES FAKTÖRLERİ

Bitkiler, büyüme ortamlarındaki değişikliklere yanıt olarak uyum sağlaması gereken hareketsiz organizmalardır. Doğada sürekli karşılaştıkları stresler bitkilerin hayatta kalması için potansiyel tehditler olarak değerlendirilmektedir. Bu stres faktörleri iki ana sınıfa ayrılmaktadır. Mantarlar, virüsler, bakteriler, nematodlar ve böcekler gibi çeşitli canlı organizmaların neden olduğu stres faktörleri biyotik stres grubunda yer alırken kuraklık, soğuk, sıcak, yüksek tuzluluk ve ağır metal gibi çevresel stres faktörleri abiyotik stres grubunda yer almaktadır. Bu zorlu çevre koşullarına dayanmak için bitkiler, Şekil 2.8’de gösterildiği gibi farklı abiyotik stres koşullarında hayatta kalmak için biyokimyasal ve moleküler mekanizmaları ortaya çıkaran sinyal yollarının yanı sıra morfolojik ve fizyolojik adaptasyonlar geliştirmektedir. Bu stresler, bitki büyümesini, gelişimini, hayatta kalmasını ve biyokütle üretimini engellemektedir. Bu stres faktörleri dünya çapında gıda güvenliği için büyük bir tehdit oluşturduğu için önemli verim kayıplarına neden olur. Özellikle iklim değişikliği sebebiyle abiyotik stresler birçok üründe mahsul verimliliğini arttırmanın önündeki en büyük zorluklardan biri olarak görülmektedir (Iqbal ve ark., 2020; Dubey ve ark, 2021).

İklim Değişikliği ve Abiyotik Stres Faktörleri



Şekil 2. 8. Bitkilerin abiyotik strese karşı verdikleri cevaplar ve adaptasyon stratejileri (Villalobos-López ve ark., 2022)

2.2.1. Kuraklık Stresi

Kuraklık stresi, uzun süreli yağışların azlığı ve sulama suyunun eksikliğinden kaynaklanır, bu da topraktaki suyun azalmasına ve sonuç olarak bitkinin kullanımı için bir su eksikliğine yol açabilmektedir. Yağıştan kaynaklanan yetersiz su genellikle kuraklık stresinin ana faktörü olsa da yüksek sıcaklık olayları, yüksek ışık yoğunluğu ve kuru rüzgar tarafından yönlendirilen buharlaşma yoluyla topraktan su kaybı, kuraklık stresini daha da kötüleştirebilmektedir. Küresel iklim değişikliği genellikle küresel ölçekte geniş alanlarda yaygın kuraklık stresi koşullarına neden olur.

Bununla birlikte kuraklık bitki büyümesi ve verimi üzerinde olumsuz etkileri olan mevcut iklim değişikliği altında bitkilerin karşılaştığı en yaygın çevresel stres olarak değerlendirilmektedir (Seleiman ve ark., 2021).

İklim değişikliğine bağlı olarak yağışların azalması ve/veya buharlaşmanın artması ile birlikte 21. yüzyılın ikinci yarısında dünya genelinde kuraklık stresinin şiddetini arttırması beklenmektedir. Yapılan çalışmalara göre bitkinin kuraklığa herhangi bir adaptasyonu olmadan kuraklıktan kaynaklanan verim kaybının 21. yüzyılın sonuna kadar %16 civarında artacağı öngörülmektedir (Sintaha ve ark., 2022; Xuan ve ark., 2022; Iqbal ve ark., 2020). Pek çok bitki, kuraklık stresini tolere etmek için direnç mekanizmalarını geliştirmiştir ancak bu mekanizmalar çeşitlidir ve bitki türlerine ve stresin şiddetine bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Bitkiler, maruz kaldığı strese direnmek için uzun vadede olumsuz ortamlara uyum sağlayacak mekanizmalar geliştirmiş ve strese uyum sağlamak ve yaşam döngülerini başarıyla tamamlamak için fiziksel, fizyolojik ve biyokimyasal değişikliklere uğramıştır (Dubey ve ark., 2021).

Bitkiler kuraklık stresinin olumsuz etkilerine karşı farklı adaptif mekanizmalar geliştirmiştir. Stresten kaçınma, kaçma ve tolerans bitkilerin kuraklık stresine maruz kaldıklarında kullandıkları üç ana hayatta kalma stratejisidir (Seleiman ve ark., 2021).

Kaçış Mekanizması

Kuraklık stresinin etkilerinden kurtulmak için bitkiler en kurak dönemin başlangıcından önce hızlı bitki gelişimi ile birlikte yaşam döngüsünü kısaltma, kendi kendine üreme ve mevsimsel büyüme gibi mekanizmaları kullanmaktadır. Bu mekanizmalar arasında erken çiçeklenme bitkilerde en iyi kaçış adaptif mekanizmasıdır. Bu mekanizma kuraklık stresinin olumsuz etkilerinden kaçmak için yararlı olsa da verimlilikte önemli bir azalmaya sebep olabilmektedir.

Kaçınma ve Tolerans

Kuraklıktan kaçınma, su eksikliği sırasında stoma düzenlenmesi, kök sistemi gelişimi ve diğer süreçler gibi fizyolojik süreçlerin sürekliliğidir. Kaçınma stratejisi altında, stoma terleme kayıplarının azaltılması ve kök sistemlerinden su alımının artırılması yoluyla bitki su potansiyeli yüksek tutulmaktadır. Tüylü yaprakların ve kütiküllerin gibi özellikler bitki dokularında yüksek su potansiyellerinin korunmasına yardımcı

olabilir. Ancak, bu yapıların aşırı gelişmesi bitki verimliliğinde azalma, bitkinin vejetatif ve generatif kısımlarının ortalama boyutunun azalması gibi etkilere de sebep olabilmektedir.

Fotosentetik düzeyde adaptif bir tolerans mekanizması, bitki yaprak alanındaki azalmaları ve yeni yaprakların genişlemesi, artan trikom üretimini içermektedir. Bu yapılar, yapraktaki ışık yansıma oranını artırarak yaprak sıcaklığını azaltmaktadır. Dolayısıyla, yaprak terlemesi yoluyla su kaybı oranı azalmaktadır. Ancak, kök boyutu, yoğunluğu, uzunluğu, çoğalması, genişlemesi ve büyüme oranı dahil olmak üzere kök sistemindeki değişikliklerin, kuraklığa dayanıklı bitkilerin su eksiklikleriyle başa çıkmak için ana stratejisi olarak kabul edilmektedir. Ozmotik ayarlama, antioksidan savunma mekanizması, çözünen madde birikimi, stoma kapanmasının metabolik ve biyokimyasal tepkiler gibi diğer mekanizmalar, bitkilerin kuraklık stresinin olumsuz etkisine tolerans göstermesini sağlayan diğer yaygın stratejilerdendir. Bitkilerin kuraklık stresinden kaçmak, kaçınmak veya tolerans sağlamak için verdiği morfolojik fizyolojik tepkiler Şekil 2.9'da özetlenmiştir (Seleiman ve ark., 2021; Ilyas ve ark., 2021).



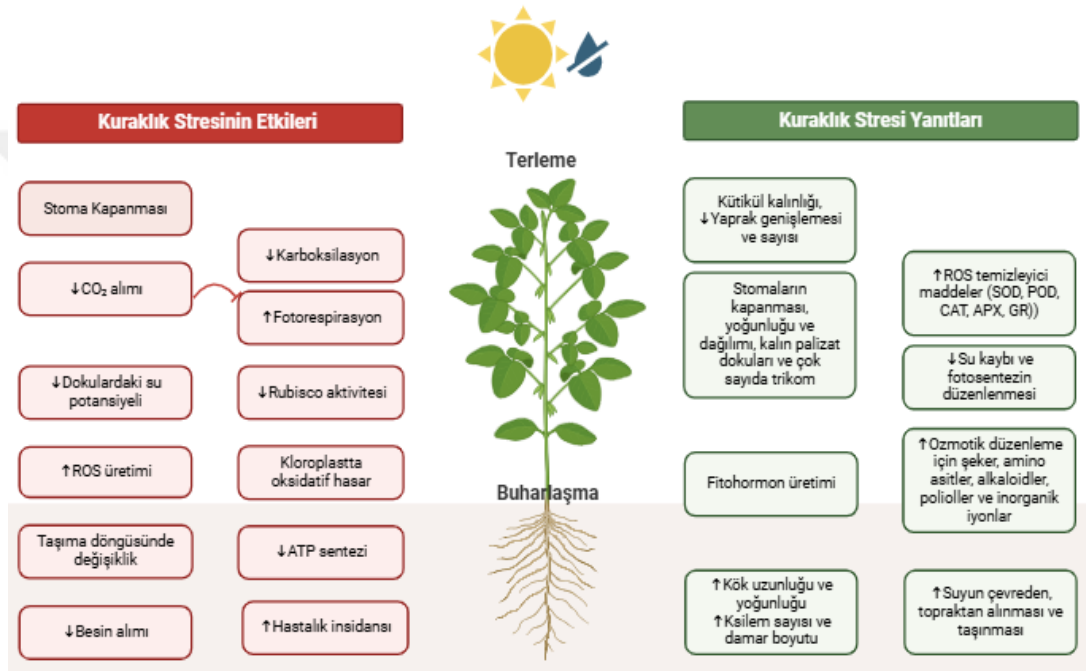
Şekil 2. 9. Bitkilerin kuraklık stresinin olumsuz etkilerine karşı geliştirdiği adaptif mekanizmalar (Seleiman ve ark., 2021)

Kuraklık stresi bitkilerde ozmotik dengesizlik, zar sistemi hasarı, solunum ve fotosentetik hızın azalması, reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumu, lipid peroksidasyonu gibi birçok olumsuz etkiye neden olabilmektedir. Kuraklık stresiyle başa çıkmak için bitkilerin, absisik asit (ABA), etilen (ET), oksin (AUX), salisilik asit (SA), jasmonatlar (JA) ve brassinosteroidler (BR) dahil olmak üzere çeşitli bitki büyüme düzenleyicilerinin biyosentezini ve ozmotik düzenleyicilerin sentezini teşvik ederek kuraklığa dayanıklı genlerin anlatımını düzenlemek gibi morfolojik, fizyolojik ve moleküler seviyelerde çoklu kuraklık tepki stratejilerini başlattığı bilinmektedir (Dubey ve ark., 2021; Xuan ve ark., 2022; Singh ve ark., 2022; Haghpahan ve ark., 2024).

Kuraklığın bitki verimi üzerindeki etkisi, önemli ticari bir bitki olan soya üretimini de sınırlayan ana faktörlerden biridir. Kuraklığın yıllık toplam bitkisel üretimde neden olduğu azalma, tüm stres faktörlerinin neden olduğu verim kayıplarının % 50'sinden fazlasını oluşturmaktadır (Wang ve ark., 2022). Yeterli bir su kaynağının bulunması soyanın büyümesi, gelişmesi ve verimi için çok önemlidir. Özellikle soya su eksikliğinin verimi en ciddi şekilde etkileyeceği çiçeklenme döneminde su eksikliğine karşı oldukça hassastır. Bunun yanında soyada su ihtiyacı üreme aşamasında vejetatif aşamaya göre iki katına çıkmaktadır (Poudel ve ark., 2023; Wang ve ark., 2022).

Soya bitkisinin kök sistemi az gelişmiş olması sebebiyle yaşam döngüsü boyunca suya olan ihtiyacı oldukça yüksektir. Kuraklık aynı zamanda çimlenmeden çiçeklenmeye kadar bitki gelişiminin tüm aşamalarını etkilemekte ve tohum kalitesinin düşürmektedir. Çoğu soya genotipinde üreme aşamasındaki kuraklık stresi, doğrudan çiçek dökülmesine ve genç baklaların erken düşmesine bağlı olarak onarılamaz hasarlara yol açar ve verimin düşmesine sebep olmaktadır. Bu sebeple soya su eksikliğine karşı oldukça hassastır. Kök sistemi kuraklık gibi olumsuz koşullara karşı daha hassastır ve bu durum % 25 ile % 50 arasında değişen verim kayıplarına neden olabilir. Çalışmalar, kuraklığın soyadaki verimi daha ciddi şekilde % 80 oranında veya daha fazla azaltabileceğini de bildirmiştir. 2006'dan 2022'ye kadar 16.806 bin hektarlık bir alan kuraklıktan etkilenmiş ve tahmini olarak 21,92 milyar kg gıda kaybına neden olmuştur (Yang ve ark., 2023).

Kuraklığın neden olduğu etkiler, soyanın büyüme ve gelişmesinin tüm aşamalarında belirgin olmakla birlikte morfolojik düzeyden moleküler düzeye kadar etkisini göstermektedir (Du ve ark., 2020; Poudel ve ark., 2023). Şekil 2.10’da belirtildiği gibi soyada kuraklık veya su eksikliği, besin alımını, karbon asimilasyonunu, stoma hareketini ve fotosentezi etkileyerek ciddi verim kayıplarına neden olmaktadır. Soya bitkisinin kuraklık stresine verdiği en önemli tepkiler yaprak senesensi, oksidatif hasar, fotosentez hızında değişim, bitki büyümesinde ve tane veriminde azalmadır (Gupta ve ark., 2021).



Şekil 2. 10. Kuraklık stresinin etkileri ve bitkilerde morfo-fizyolojik tepkiler (Ilyas ve ark., 2021)

Kuraklık, soyada bakla sayısında, tohum sayısında, tohum ağırlığında ve tohumların biyokimyasal bileşiminde bir azalma ile birlikte vejetatif biyokütlede kayıp gibi morfolojik değişikliklere neden olmaktadır. Hücreler, hücre zarı bütünlüğünü korumak için ozmotik potansiyeli dengelemek üzere prolin ve şeker alkollerini gibi ozmolitleri sentezleyerek kuraklığın etkisini düzenleyebilmektedir. Bunların yanında birçok kuraklığa dayanıklı soya çeşidinde, kökler daha fazla toprak nemi emmek için kök uzunluğunu, dallanmayı ve diğer fenotipleri değiştirerek su eksikliği koşullarına yanıt olarak yapılarını ayarlamaktadır. Ayrıca, şiddetli kuraklık stresini, biyomolekülleri

oksitleyerek hücre ve doku hasarına neden olabilen ROS birikimine yol açmaktadır. Hücresel düzeyde, büyük ölçüde örtüşen sinyal mekanizmaları ve fitohormon çapraz konuşmaları bitkilerde kuraklık tepkisinin düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Yüksek verimli dizileme tekniklerinin ortaya çıkmasıyla birlikte, soya için kuraklık stresi ile ilişkili birkaç gen veya gen ailesi tanımlanmış ve karakterize edilmiştir. (Arya ve ark., 2021).

2.2.1. Kuraklık Stresinde Morfolojik ve Fizyolojik Değişiklikler

Bitkilerin su eksikliğine verdiği tepki ilk olarak yapraklara ve köklere yansımaktadır. Yapraklar çevreye uzun süreli adaptasyonda en değişken bitki organlarıdır. Kuraklık stresi altında; etiolasyon, atrofi, kıvrılma, yaşlanma ve hatta absisyon belirtileri göstermektedir. Bazı durumlarda stres, yaprak büyümesinin durmasına ve yaprak sayısının ve alanının azalmasına neden olmaktadır (Wu ve ark.,2022). Kuraklık stresi altındaki bitkilerin en yaygın fizyolojik tepkileri yaprak dökülmesi, yaprak alanında azalma, fotosentez hızı, turgor, kök büyümesi ve su kullanım verimliliğini artırmak için yaprak stomalarının kapanmasıdır. Kuraklık stresi altında, bitkiler su kaybını önlemek için stomalarını kapatır ve bu da hücrelerde daha düşük CO₂ konsantrasyonu ile sonuçlanmaktadır. Bu, fotosentez oranını azaltır ve oksidatif stresi artırır. Daha az fotosentez, daha az enerjik substratlara yol açar ve bu da amino asitlerin karbonhidratlara dönüşmesine neden olmaktadır (Anzano ve ark., 2022). Kuraklık koşulları altında soya bitkileri su içeriğini kaybetmektedir. Bu, yaprakların solmasına ve sarkmasına, bitkinin su durumunun dengesizleşmesine, hücre su potansiyelinin ve turgorunun azalmasına neden olmaktadır. Kuraklık, yaprak meristematik dokusunun hücre bölünmesini ve uzama alanlarındaki hücre genişlemesini engellemenin yanı sıra yaprak kalınlığında, palizat dokusunda ve süngerimsi dokuda karmaşık değişikliklere neden olarak bitki büyümesini sınırlayabilmektedir (Wu ve ark., 2022). Bitki yeterince uzun süre kuraklık stresine maruz bırakılırsa hücrenin su kaybetmesi gittikçe artar ve bu durum bitki dokularında geri dönüşü olmayan hasara neden olmaktadır. Bu süreç bitkinin ölümüne yol açmaktadır. Kuraklık stresine uyum sağlamak için bitkiler mumsu ve kalın yaprak kütikül tabakasının gelişimi yoluyla terlemeyi azaltmaktadır (İlyas ve ark., 2021). Bitki yaprakları daha küçük ve daha az sayıda stoma, kalın palizat dokuları, çok sayıda trikom, daha kalın ve küçük yapraklar ve gelişmiş damar dokuları gibi kuraklık

toleransını artırmak için yapılarını değiştirebilmektedir (Iqbal ve ark., 2013). Kuraklık stresine yanıt olarak, stoma kapanması terlemeyi azaltmanın ilk adımıdır, stoma iletkenliği kuraklık toleransının sağlanabilmesi için önemli bir etmen olarak değerlendirilmektedir. Kuraklık toleransı ile stoma iletkenliği arasında ters bir ilişki vardır, yani stomaların kapanması kuraklık toleransını artıran terlemeyi azaltırken, stomaların açılması terlemeyi artırır ve sonrasında bitki kuraklık toleransını azalmasına sebep olmaktadır. Fakat stoma iletkenliği ile fotosentez arasında doğrudan bir orantı vardır, çünkü stoma düzenlenmesi kuraklık stresi altında bitkilerin fotosentetik kapasitesinin korunmasında rol oynamaktadır. Stomaların açılması CO₂'nin mezofil dokularına geçmesini ve fotosentez sürecinin devam etmesini sağlar; ancak stomaların kapanması fotosentezi azalmasına neden olmaktadır. Stoma sayısındaki azalma kuraklık stresine verilen bir diğer fizyolojik yanıttır.

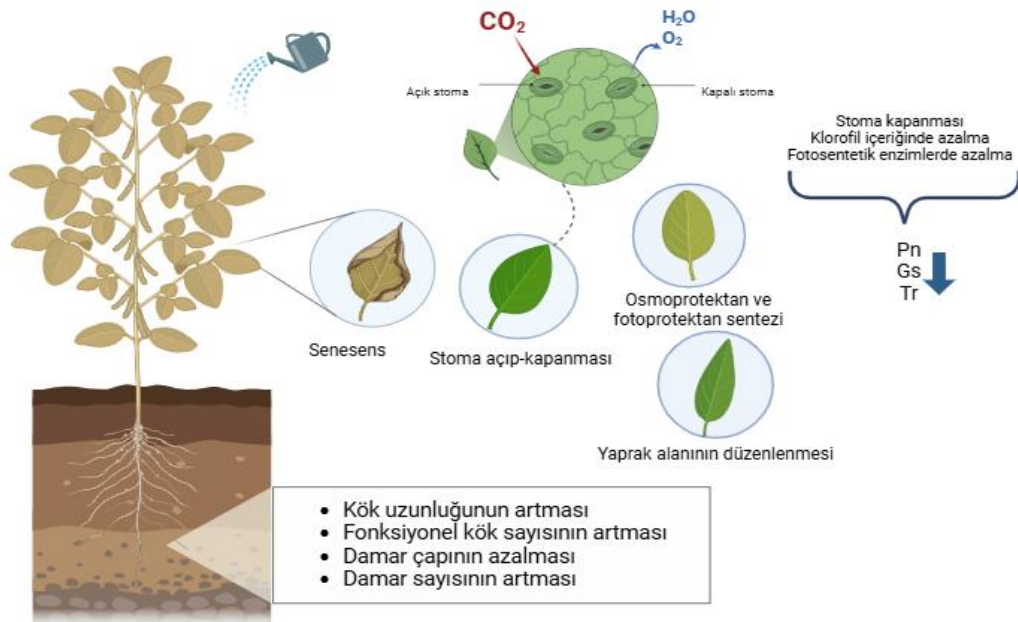
Özellikle şiddetli kuraklık koşullarında stoma sayısı önemli ölçüde azalmaktadır. Daha düşük terleme oranı, kalın kütikül ve küçük stoma açıklığı bitkilerde kuraklık toleransının artırılmasında etkilidir (İlyas ve ark., 2021).

Köklerin kuraklık stresini algılayan ilk organ olduğu düşünülmektedir. Bu sebeple kök sistemi kuraklık stresine yanıt olarak kritik bir role sahiptir. Kök, bitkiler için topraktaki maddelerin emilimini sağlayan önemli bir organdır. Kuraklık stresi stel (merkezi silindir) alanını, damar çapını ve ikincil kök korteks hücrelerini azaltır ve su akışını kolaylaştırmak için steldeki damar sayısını artırır. Su tutma ve kuraklığa karşı direnci geliştirmek için bitkiler sadece fonksiyonel köklerin sayısını artırarak kök sistemini genişletmekle kalmaz, aynı zamanda kök kılıfının su emme kapasitesini de arttırmaktadır. Ayrıca bitkiler, kökün uzaysal dağılımını, toprağın sabitlenmesini ve besin emilimini etkilemek için kök yapısını (kök tüyleri ve kök yoğunluğu gibi) değiştirerek direnci arttırmaktadır. Bu nedenle kuraklık stresi koşullarında bitkiler kök uzunluğunu ve iç yapısını değiştirerek su emme kapasitesini geliştirebilmektedir (Wu ve ark., 2022). Daha uzun kökler, daha kısa köklere kıyasla kuraklığa dayanıklılık için daha uygundur. Su kıtlığı altında verimliliği korumak için bitkinin, özellikle su daha derin olduğunda yüksek yoğunluklu uzun köklere ihtiyacı vardır. Daha yoğun kök sistemi ayrıca, daha fazla sayıda kökün toprakta bulunan daha fazla su buharıyla temas edebilmesi nedeniyle daha ince köklerden daha fazla miktarda su emer (İlyas ve ark., 2021).

Kuraklık stresi tohumların çimlenme oranını azaltabilir, fotosentetik organlara zarar verebilir ve bitki boyunu, bakla sayısını ve verimi azaltabilir (Wang ve ark., 2022).

2.2.2. Fotosentetik Tepkiler

Bitkiler fotosenteze devam etmek için strese uyum sağlama sürecinde fotosentetik organlarını hasardan korumak amacıyla bir dizi savunma mekanizması oluşturmaktadır (Yang ve ark., 2020; Sharma ve ark., 2020). Çoğu bitki stres koşulunda stomaları ve terlemeyi kontrol edebilir, doğrudan yaprak su potansiyelini düzenleyebilir ve normal su kaynağına döndükten sonra kendi kendini onarabilmektedir. Klorofil içeriği, fotosentetik enzim aktivitesi ve aktif oksijen metabolizması da dahil olmak üzere stoma dışı faktörlerin çoğu, orta ve şiddetli kuraklık stresiyle tetiklenmektedir. Çoğu bitki için hafif su stresi stomaları ve terlemeyi kontrol edebilir, yaprak su potansiyelini doğrudan düzenleyebilir ve normal su kaynağına döndükten sonra kendi kendini onarabilir; bazı bitkiler fotosentezi bile artırabilir (Wu ve ark., 2022). Hafif kuraklık stresi genellikle stoma iletkenliğinde ve terlemede artışa yol açarken, orta ve şiddetli kuraklık stresi net fotosentez oranında (Pn), stoma iletkenliğinde (Gs) ve terleme oranında (Tr) azalmaya neden olur (Şekil 2. 11).



Şekil 2. 11. Su stresi nedeniyle bitki yaprak ve köklerinin morfolojik ve anatomik yapısındaki değişimler. Pn: net fotosentez hızı; Gs: stoma iletkenliği; Tr: terleme hızı (Wu ve ark., 2022 referans alınarak düzenlenmiştir)

Kuraklık stresi klorofil a, b ve toplam klorofil içeriğini önemli ölçüde azaltabilir (Dong ve ark., 2019). Kuraklık sadece klorofil oluşumunu doğrudan engellemekle kalmaz aynı zamanda topraktan mineral elementlerin emilmesinde zorluğa neden olmaktadır. Elementlerin emilmesindeki zorluk ile birlikte yaprakta besin eksikliği (yaprak etiolasyonu) gözlemlenebilir. Fotosentetik enzimlerin düzenlenmesi çok karmaşık bir süreçtir. Hafif kuraklık stresi, fotosentetik karboksilasyon verimliliğini düşük seviyede etkileyebilir. Ancak şiddetli kuraklık stresi altında RuBPCase aktivitesini inhibe edebilir, bu da fotosentetik karboksilasyon verimliliğinde bir azalmaya neden olabilir (Wu ve ark., 2022).

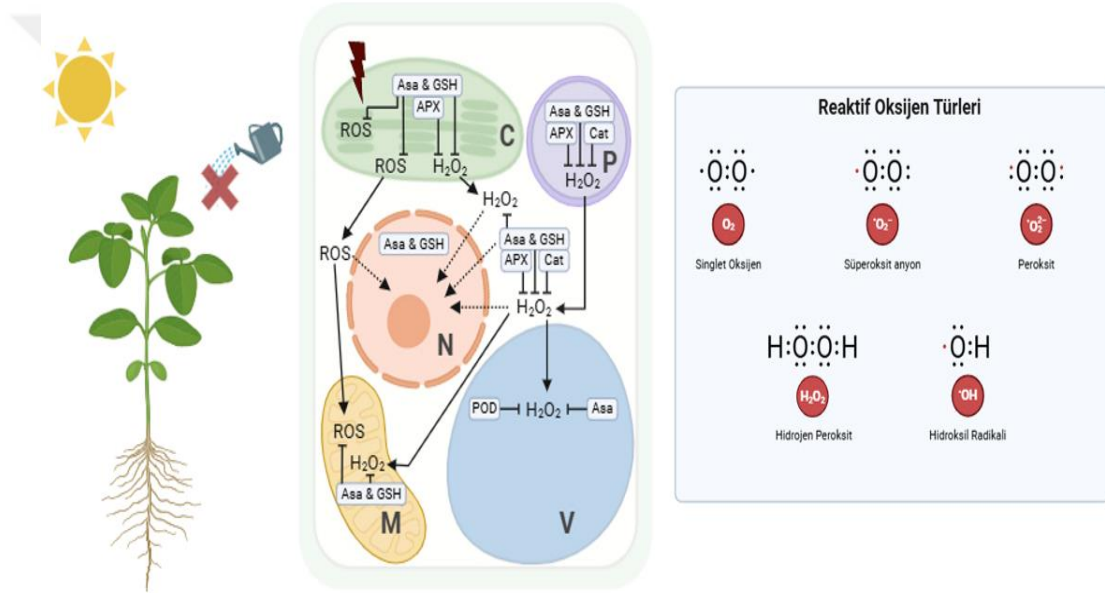
2.2.3. Biyokimyasal ve Antioksidan Tepkiler

Normal bitki metabolizmasını sürdürmek için bitkiler, hücre içi antioksidan enzim aktivitesi yoluyla fazla reaktif oksijen türlerini (ROS) uzaklaştırmaktadır (Feng ve diğerleri, 2019). Stres koşullarında, ROS üretiminin artmasıyla birlikte bitki hücreleri hasar görmektedir. Stres koşullarına uyum sağlamak için bitkilerin çözünen madde (şeker ve prolin gibi) birikimi, enzim aktivasyonu (Peroksidaz (POD), Süperoksit dismutaz (SOD), Askorbat (ASC) ve katalaz (CAT)) ve enzimatik olmayan (indirgenmiş glutatyon (GSH)) maddeler dahil olmak üzere çok sayıda mekanizması vardır (Ilyas ve ark., 2021). Antioksidan savunma sisteminin bileşenleri enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlardır. Enzimatik antioksidanlar arasında SOD, CAT, POD, askorbat peroksidaz (APX), glutatyon redüktaz (GR), dehidroaskorbat redüktaz (DHAR) ve monodehidroaskorbik asit redüktaz (MDHAR) bulunur. Enzimatik olmayan antioksidanlar arasında glutatyon (GSH), askorbik asit (AA), karotenoidler ve tokoferoller (lipitte çözünür) bulunur. Her iki bileşen de reaktif oksijen türlerinin neden olduğu zararı ortadan kaldırmaktadır (Wu ve ark., 2022). Su eksikliği veya ozmotik stres altında, bitkiler normalde hücre altı yapıları stabilize etmek ve homeostazı dengelemek için trehaloz , şekerler ve prolin dahil olmak üzere hücrel ozmolitlerin birikimini sağlamaktadır (Wang ve ark., 2022). Osmoregülasyon, bitkiler stres altındayken üretilen membran lipid peroksidasyonunun bir ürünü olan malondialdehit (MDA) içeriğinin hücre zarı hasarının derecesini yansıtmaktadır. Bu sayede kuraklık stresinde önemli bir belirteçtir. (Dong ve ark., 2019).

Prolin, bitkilerde su eksikliği stresi altında birikerek ROS temizleyicisi ve karbon ve azot depolamasında görev yapan önemli bir amino asittir. Bir sinyal molekülü gibi davranarak stresi azaltmada eşsiz bir biyolojik işlev üstlenmektedir. Ayrıca bir ozmolit gibi davranarak ozmoregülasyonu korumaktadır. Prolin, protein biyosentezinde doğal olarak yer alan küçük bir halkasal amino asittir. Küçük boyutu ve ozmoprotektan kapasitesi nedeniyle stresle ilişkili önemli bir molekül olarak değerlendirilmektedir. Bu nedenle, serbest prolin birikimi kuraklık, soğuk, sıcak, tuzluluk, besin eksikliği ve ağır metaller gibi çeşitli çevresel streslerle başa çıkan bitkilerde görülen yaygın bir fizyolojik olgudur. MDA içeriği gibi prolinde genellikle kuraklık stresi ile birlikte artmaktadır. Farklı streslerde prolin artışı gözlemlenmiş olsa da özellikle kuraklık stresine yanıt olarak arttığı bulunmuştur. Kuraklık stresi altında hidroksil prolin ve prolin birikimlerinin diğer amino asitlerden daha hızlı olması dikkat çekicidir. Bitki stresli koşullara maruz kaldığında, prolin seviyesi stresli olmayan koşullara göre 100 kat artabilir. Prolin birikim düzeyi farklı bitki türleri arasında değişiklik göstermektedir. Prolin aktivitesi bir antioksidan etki olarak önerilmiştir, ancak prolinin doğrudan ROS ile etkileşime girmesi olası değildir. Prolinin bitki hücrelerinde oksidatif stresi azalttığı mekanizma hala kesin değildir. Prolinin önemi, kuraklık stresine maruz kalan bitki hücrelerinin ozmotik potansiyelini ayarlamaya yardımcı olan ozmolit aktivitesinden kaynaklanmaktadır. Ozmotik basınç, topraktan su toplamak için gereklidir ve bu nedenle ozmoprotektanlar kuraklık ve tuzluluk stresine başa çıkmak için en önemli faktörler olarak değerlendirilmektedir (Anzano ve ark., 2022; Shaffique ve ark., 2024). Kuraklık stresine yanıt olarak, prolin yapısal stabilite sağlar ve antioksidan savunma mekanizmasını güçlendirir. Birkaç çalışma prolin biyosentezinde yer alan genin, yani P5CS'nin (prolin-5-karboksilat sentaz) aşırı ifadesinin soya bitkilerinde kuraklığa dayanıklılık sağladığını desteklemektedir. Kuraklık stresine yanıt olarak, prolini takiben γ -aminobütirik asit (GABA) de hızla birikir. Stresi azaltmaya yardımcı olan ve azot metabolizmasında düzenleyici olarak görev yapan çok önemli bir metabolittir (Shaffique ve ark., 2024).

Bitkilerde stres ile birlikte antioksidan sistem ROS'ları aktif olarak kontrol edebilir ve ortadan kaldırabilir. Normal fizyolojik aktiviteler altında bitkiler sinyal olarak süperoksit anyon radikalleri (O_2^-), singlet oksijen (O_2), hidroksil radikalleri ($\cdot OH$) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi ROS üretirler. Bitkiler kuraklık stresine maruz

kaldığında hidrojen peroksit, hidroksil iyonları ve peroksit gibi serbest radikaller hızla birikmektedir. Şekil 2.12’de belirtildiği gibi tüm serbest radikaller ve H_2O_2 gibi radikal olmayan moleküller bitki hücrelerinde birikerek reaktif oksijen türlerinin aşırı üretimi nedeniyle oksidatif strese neden olmaktadır. Serbest radikaller bitki hücresinde birikir ve lipid membran, kloroplast, mitokondri, hücre duvarı vb. gibi bitki hücresel yapılarına zarar vermektedir (Shaffique ve ark., 2023). Bitki hücrelerinde gen ve protein anlatımının düzenlenmesi, ROS'un üretimi ve eliminasyonu her zaman dinamik bir denge halindedir. Bitki strese girdiğinde denge bozulur, bitki hücre zarında fizyolojik ve biyokimyasal fonksiyonlar değişime uğrar ve reaktif oksijen türlerinin üretimi arttırır (Wu ve ark., 2022).



Şekil 2. 12. Kuraklık stresinde antioksidan mekanizmanın düzenlenmesi. C: Kloroplast, V: Vakuol, P: Peroksizom, M: Mitokondri, N: Nükleus, SOD: Süperoksit dismutaz GSH: Glutatyon, APX: Askorbat peroksidaz, CAT: Katalaz, H_2O_2 : Hidrojen peroksit (Shaffique ve ark., 2024)

Soyada su stresi altındayken SOD, POD ve CAT genellikle artar ve aynı zamanda MDA içeriği de önemli ölçüde artar. Yüksek seviyelerde SOD, APX ve CAT enzim aktivitesi sayesinde ROS, membran hasarını ve membran lipid peroksidasyonunu azaltmak için etkili bir şekilde uzaklaştırılabilir. Ayrıca prolin, çözünebilir şekerler ve MDA gibi hücrelerde biriken antioksidanlar hızla azalmaktadır (Dong ve ark., 2019)

2.2.4. Rehidrasyon

Soya, büyüme sürecinde yeterli su kaynağına ihtiyaç duyan önemli bir üründür. Ancak belirli bir kuraklık stresi seviyesinden sonra ve rehidrasyondan kısa bir süre sonra soya bitkileri, kuraklık stresi sırasında oluşan hasar ve kayıpları telafi etmek için metabolizma, büyüme, gelişme açısından pozitif düzeyde fizyolojik ve biyokimyasal olarak bir telafi gösterebilmektedir (Dong ve ark.,2019; Li ve ark., 2022b). Birçok çalışma, kuraklık stresi ve rehidrasyonun bitkilerde bir dizi fizyo-biyokimyasal telafiyi tetikleyebileceğini göstermiştir. Bieloriai ve Hopmans (1975) tarafından pamuk (*Gossypium hirsutum*) ve Xu ve Bland (1993) *Sorghum bicolor* (L.) bitkilerinde gerçekleştirilen çalışmalarda yaprak su potansiyelinin kuraklık stresi ve rehidrasyondan 2-3 gün sonra hızla iyileştiğini bulmuştur. Zhang ve ark. tarafından 2004 yılında gerçekleştirilen çalışmada soya ve buğdayda, kuraklık stresi ve rehidrasyondan sonra bitkilerin, ROS'u etkili bir şekilde uzaklaştırmak amacıyla membran hasarını ve membran lipid peroksidasyonunu azaltmak için yüksek düzeyde SOD, APX ve CAT aktivitesini koruduğunu göstermiştir (Zhang ve ark., 2004). Kuraklık stresinden sonra rehidrasyonun, stres sırasında biriken prolin, çözünebilir şekerler ve MDA gibi antioksidan maddelerin içeriğini önemli ölçüde azalabilmektedir. *Glycyrrhiza* fideleri üzerinde 6 günlük kuraklık stresi ve rehidrasyondan sonra fidelerin SOD, CAT ve APX aktiviteleri, prolin ve çözünür protein içeriklerinin önemli ölçüde arttığını, MDA, çözünür şeker içerikleri ve POD aktivitesinin önemli ölçüde azaldığını tespit etmiştir (Dong ve ark., 2019).

Bazı soya genotipleri, vejetatif aşamada kuraklık stresiyle karşılaşmalarına rağmen yaprak alanı ve klorofil içeriği gibi yüksek değerdeki özellikleri korur ve bazıları, yeniden sulama sonrasında kuraklığın zararlarından kurtulabilir, hatta büyüme üzerinde telafi edici etkiler sergileyebilmektedir. Erken gelişim aşamalarında kuraklığa tolerans gösteren soya genotipleri çok az hasara uğrar ve verimde küçük düşüşler gösterir Erken vejetatif aşamalarda kuraklığa toleransın altında yatan moleküler mekanizmaların ortaya çıkarılması, bu nedenle kuraklığa dayanıklı soya çeşitlerinin geliştirilmesini kolaylaştıracaktır (Dong ve ark., 2019 ;Yan ve ark., 2020).

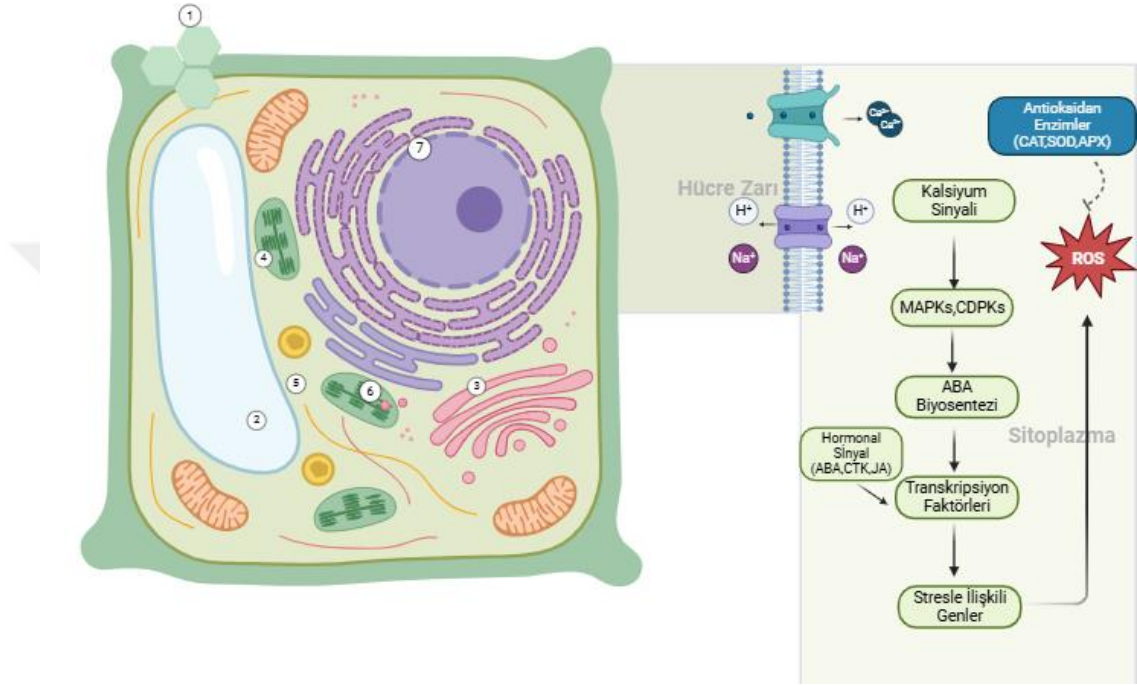
2.2.5. Kuraklıkta Fitohormonlar ve Genler

Abiyotik ve biyotik streslere yanıt veren bitki hormonları, bitki büyüme ve gelişiminde önemli rol oynamaktadır. Bitki gelişimi, çeşitli endojen hormonların ve fizyolojik kimyasal metabolizmanın koordinasyonu ile düzenlenmektedir. Aynı zamanda bitkiler stres altındayken stres sinyallerinin iletilmesinde de rol oynamaktadır. Endojen hormonlar arasındaki antagonistik düzenlemeler yoluyla, bu hormonlar bitkinin stresli bir ortama adaptasyonunu teşvik etmek için bitkinin fizyolojik-kimyasal metabolizmasını, büyümesini ve gelişmesini düzenlemektedir (Ha ve ark., 2012).

Stres altında, bu fitohormonlar çeşitli sinyal yolları aracılığıyla sekonder metabolitleri, antioksidan enzim üretimini ve stres yanıt genlerini artırmaktadır. Bu süreç Şekil 2.13'te gösterilmiştir. Bitkiler, hücre zarlarında bulunan birincil reseptörler aracılığıyla farklı stres sinyallerini algılamaktadır. Birincil sinyaller ayrıca hücre duvarından da kaynaklanabilir. Bu sensörlerin aktivasyonu genellikle zar boyunca iyon akışıyla sonuçlanır ve sitozole Ca^{2+} iyon geçişine sebep olmaktadır. Abiyotik stres etkileri kloroplastlardaki fotosistemlerin, mitokondrilerdeki elektron taşıma zincirinin enerji dengesinin bozulması, endoplazmik retikulumdaki protein katlanmasına ve peroksisomlardaki peroksidazların ve oksidazların aktivasyonu ile ROS üretimiyle sonuçlanmaktadır. Bu sinyaller, ROS ve Ca^{2+} ya yanıt olarak adenilat siklazın aktivasyonu ile üretilen siklik AMP (adenozin monofosfat) gibi diğer ikincil haberciler tarafından güçlendirilir. Kalsiyum bağımlı protein kinazlar (CDPK'ler) ve MAP kinaz kaskadları dahil olmak üzere protein kinazların aktivasyonuna ve bu da absisik asit (ABA) gibi hormon biyosentezi yollarını aktivasyonuna yol açar. Son olarak, hormonal sinyallemeyle güçlendirilen strese duyarlı transkripsiyon faktörleri, çekirdekteki çeşitli genlerin transkripsiyonel düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Bu yanıtlar ile birlikte bitki fizyolojisinin yeniden şekillenmesine ve stres altındaki bitkilerin karakteristik fenotiplerine yol açan adaptif yanıtlara neden olur (Melo ve ark., 2022).

Bitkilerde kuraklık toleransını artırmak için ekonomik kayıpları azaltmak amacıyla çok sayıda fitohormonla ilgili stratejinin incelenmesi ve geliştirilmesi gerekmektedir. Kuraklık stresinin çeşitli bitki hormonlarının, özellikle de absisik asidin (ABA) biyosentezine ve sinyal iletimine neden olabileceği iyi belgelenmiştir (Li ve ark., 2022b). ABA, kuraklık stresi söz konusu olduğunda en çok öne çıkan

fitohormonlardan biridir. Çünkü bitkilerin stres etkilerini hafifletmesine yardımcı olan hormonal bir molekül olarak kabul edilmektedir. Kuraklık, farklı bitki organlarında, özellikle kökten, yaprak koruma hücrelerine ulaşabilen ve ksilem taşınması ve terleme yoluyla sinyaller gönderebilen ABA üretimini uyarmaktadır. Stoma kapanmasını ve gen ifadesini düzenleyerek bitkilerin kuraklık stresine verdiği tepkilerde temel roller oynamaktadır.



Şekil 2. 13. Kuraklık stresinde sinyal iletimi. (1) Hücre duvarı ve zarından sinyalin algılanması (2) Mitokondrilerdeki elektron taşıma zinciri ve enerji dengesi (3) Kloroplastta fotosistem (4) ER’de protein katlanması (5) Peroksizomlarda peroksidaz ve oksidaz aktivasyonu (6) Nükleusta genlerde transkripsiyonel düzenlenme (ABA: Absisik asit, CTK: Sitokinin, JA: Jasmonik asit) (Melo ve ark., 2022 referans alınarak düzenlenmiştir)

ABA, stoma hareketini düzenlemek için sitokinin (CTK) ve jasmonik asidi (JA) birlikte çalışabilmektedir. Yaprak terleme hızını ve koruyucu hücre turgor basıncını azaltırlar, bu da stoma kapanmasının dış ortam stresine uyum sağlamasına neden olmaktadır (Ilyas ve ark., 2021). Jasmonik asit (JA), sinyal iletiminde rol oynayan bileşiklerin üretiminden hücre ölümüne kadar rol oynayan ve kloroplast membranlarında bulunan α -linolenik asitten üretilen fitohormondur. Jasmonik asidin aktif türevi, çeşitli biyotik ve abiyotik streslere verilen yanıtı kontrol etmede önemli bir role sahip olan jasmonatlar olarak da bilinmektedir. JA’lar, sinyal iletimi ve

savunma mekanizmasında sorumlu olan çeşitli gen ifadeleri dahil olmak üzere stres yanıtlarında önemli bir role sahiptir (Ahmad ve ark., 2016; Ilyas ve ark., 2021). Jasmonat sentezi plastidlerde, sitozolde ve peroksizomlarda meydana gelir. JAZ (Jasmonate Zim Domain) proteinlerinin JA sinyal yolunda başlıca bir rolü vardır çünkü JAZ, JA sinyalleme için bir anahtar görevi görür. Normal koşullarda, JA olmadığında veya çok düşük konsantrasyonda olduğunda, JAZ veya JAI3 proteinleri aktivitelerini en aza indirmek için Miyelositomatozis (MYC2) gibi çok sayıda transkripsiyon faktörüne (TF) bağlanır. Ancak stres koşullarında jasmonik asit ve türevleri büyük miktarda bulunur, JAZ proteini parçalanır ve strese yanıt veren çeşitli transkripsiyon faktörleri aktive olur ve bunlar stres yanıtında rol oynayan çok sayıda geni düzenlemektedir. JA, stomaların kapanması, kök gelişimi ve ROS'un temizlenmesi dahil olmak üzere farklı prosedürlerle kuraklık toleransını arttırmaktadır. JA'nın kuraklık stresi koşullarında bitkilerde ABA'yı da düzenlediği ileri sürülmektedir. Sitokinin (CK), hücre bölünmesini, kök nodül gelişimini, yaprak senesansını geciktirmeyi, besin tahsisini ve bitkinin patojen etkileşimlerine tepkisini teşvik eden bir bitki hormonudur. Ek olarak, kuraklık stresi tepkilerini de düzenlemektedir. Sitokininin kuraklık toleransını artırmaya katkıda bulunan beş mekanizması vardır; fotosentetik aktiviteyi korumak, antioksidan maddeleri artırmak, su dengesini düzenlemek, bitki büyümesini kontrol etmek ve stresle ilişkili hormonları düzenlemek. Kuraklık stresi altında Sitokinin, CO₂ asimilasyonunda, elektron taşıma oranında, fotosentez oranında ve klorofil seviyesinde yer alan genleri düzenlemektedir. CK, kuraklık stresi altında bitkiyi adapte etmek için ABA ile birlikte çalışır. Kuraklık stresi için, CK'nin bitkiler üzerinde hem olumsuz hem de olumlu etkileri olduğu bildirilmiştir (Ilyas ve ark., 2021).

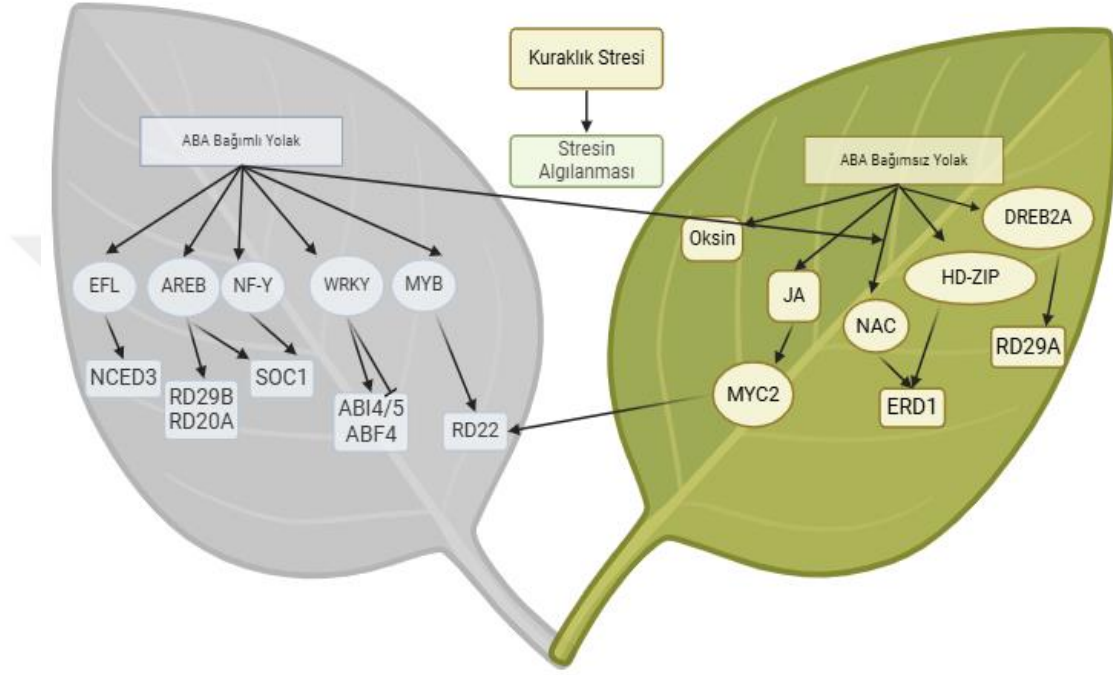
Birçok çalışma, kuraklık stresi ile birlikte ABA'da artış olduğunu bildirmiştir. ABA'nın stoma kapanma süreci ve gen ifadesinin düzenlenmesindeki rolü kuraklık için önemli bulunmuştur (Ali ve ark., 2020). Yaprak ABA'sı ile stoma iletkenliği arasında birkaç çalışmada korelasyon bulunmuştur, ancak ksilem ABA'sının stoma iletkenliği ile daha da iyi korelasyon gösterdiği belirtilmektedir. 2013 yılında gerçekleştirilen bir çalışmada yapraklara ekzojen ABA uygulanmaya çalışılmış ve kuraklık stresi durumunu taklit eden stoma kapanmasıyla sonuçlanmıştır (Dodd, 2013). Stoma kapanmasından sorumlu mekanizma her bitki türü için aynı değildir, bu

nedenle ABA her bitkide aynı rolü oynamamaktadır. ABA'nın prolin geni ve bazı durumlarda poliaminler, şeker ve şeker alkolleri gibi bazı genlerin transkripsiyonunda yer aldığı görülmektedir (Anzano ve ark., 2022). ABA birikimi ayrıca aşağı yöndeki (down stream) sinyal bileşenlerini aktive eder ve stres direncini artırmak için kök antioksidan kapasitesini arttırmaktadır. Bu sonuçlar, ABA'nın bitki hücrelerinin kuraklık sinyallerini almasında önemli bir rol oynayabileceğini göstermiştir. Bu nedenle, kuraklık stresi altında hücre metabolizmasının, enerji metabolizmasının, büyümenin ve fonksiyonel genlerin transkripsiyonel düzeyde anlatımının düzenlenmesinde ABA'nın rolünün anlaşılması büyük önem taşımaktadır. (Ilyas ve ark., 2021; Wu ve ark., 2022). ABA'nın ayrıca kuraklık stresi altında CPK6 anlatımını indükleyerek kalsiyum bağımlı protein kinaz (CPK) sinyallemesini düzenlediği bildirilmiştir. CPK'lar bazı temel ABA ile ilişkili TF'ler, ABF'ler/AREB'ler (ABA'ya duyarlı element bağlayıcı faktörler) ile etkileşime girer ve fosforile eder ve transkripsiyonel aktivitelerini arttırmaktadır (Muhammad Aslam ve ark., 2022).

Aynı zamanda kuraklık stresi, ABA'ya bağımlı ve ABA'dan bağımsız yollar dahil olmak üzere kuraklık stresi yanıtında yer alan birçok transkripsiyon faktörüyle genom çapında transkripsiyonel yeniden programlamayı tetikleyebilmektedir (Zhang ve ark., 2022b). Yüzlerce veya binlerce gen kuraklık, yüksek tuzluluk ve soğuk stresi tarafından ABA sinyallemesi yoluyla transkripsiyonel olarak düzenlenmesine rağmen, birçok strese duyarlı gen ABA'dan bağımsız mekanizmalar tarafından indüklenir. ABA'ya bağımlı genler, promotör bölgelerinde ABA'ya duyarlı cis elemanını (ABRE) içerir ve ABRE bağlama faktörleri (ABF'ler) tarafından düzenlenirken, ABA'dan bağımsız kuraklığa duyarlı genler sıklıkla dehidrasyona duyarlı cis elemanını (DRE) içerir ve AP2/ERF (Apetala2 ve etilene duyarlı faktörler) transkripsiyon faktörü ailesi tarafından düzenlenmektedir. Birçok ABA tarafından düzenlenen gen, promotör bölgelerinde ABA'ya duyarlı cis -element (ABRE) ACGTGG/TC içerirken, ABA'dan bağımsız soğuk-duyarlı ve kuraklığa duyarlı genler genellikle promotör bölgelerinde dehidratasyona duyarlı cis-element (DRE) TACCGACAT içermektedir.

CBF (DREB1) ve DREB2 proteinleri, DRE'ye bağlanan ve sonuç olarak hedef gen anlatımlarını aktive eden transkripsiyon faktörleridir (Zhang ve ark., 2022b; Singh ve ark., 2022). Şekil 2.14'te gösterildiği gibi WRKY, MYB, NF-Y'ler, AREB'ler ve NAC'ler gibi diğer birçok transkripsiyon faktörünün de kuraklık stresine ABA'ya

bağımlı bir şekilde veya bazı NAC'lerin ABA'dan bağımsız bir şekilde yanıt verdiği rapor edilmiştir. DREB2A, HD-ZIP, MYC2 ve birkaç NAC gibi kuraklık stresiyile ilgili ABA'dan bağımsız TF'ler vardır. Bu TF'ler, bireysel veya işbirliği içinde, bitki büyümesini ve gelişimini, metabolizmasını ve RD22 ve ERD1 gibi stresle indüklenebilir genlerin anlatımını düzenlemektedir (Yao ve ark., 2021; Singh ve Laxmi, 2015).



Şekil 2. 14. Kuraklık stres tepkisinde yer alan ana transkripsiyon faktörlerinin ve transkripsiyonel ağı şematik gösterimi (Yao ve ark., 2021 referans alınarak düzenlenmiştir)

ABA'ya duyarlı elementler bağlama faktörünün (ABF), kuraklığa duyarlı genlerin anlatımını düzenlediği ve kuraklık stresine karşı bitki direncini korumak için enzim aktivitesini arttırdığı bildirilmiştir (Kerr ve ark., 2018). ABA bağımlı ve ABA bağımsız yollar farklı transkripsiyon faktörleri ile kuraklık stresini yanıttırda rol oynarken aynı zamanda kuraklık yanıtı ABA bağımlı ve ABA'dan bağımsız yollar arasındaki etkileşimle de düzenlenebilmektedir (Singh ve ark., 2022). Son yıllarda özellikle soyada gerçekleştirilen çalışmalarda kuraklık mekanizmaları aydınlatılmaya çalışılmıştır. Bu çalışmalardaki hedef genler ve TF'nin kuraklık stresindeki etki mekanizması Tablo 2.1'de belirtilmiştir.

Tablo 2. 1. Soyada kuraklık ile ilişkili transkripsiyon faktörleri (Rasheed ve ark., 2022)

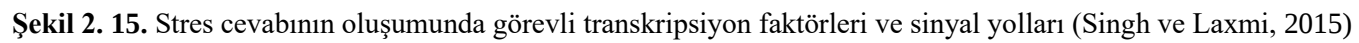
Gen/ Transkripsiyon Faktörü	Rol	Referans
GmDREB2A	Verim ve büyümede artış	Marinho ve diğerleri, 2022
GmEF8	Soyada kuraklığa dayanıklılık artışı	Zhang ve ark.,2022a
GmXTH1	Kök sisteminin, bağl su içeriğinin ve antioksidan enzimlerin aktivitesinin iyileştirilmesi	Zhang ve ark.,2022c
GmPOD40	Artan fotosentez ve antioksidan aktiviteler	Aleem ve ark., 2022
GmTGA15	Klorofil içeriğinde artış	Chen ve ark.,2021b
LHY	Arttırılmış kuraklık toleransı	Wang ve ark, 2021
GmMYB14	Yaprak boyutu, yaprak sapı uzunluğu, yaprak sapı açısı azalma ve verim artışı	Chen ve ark, 2021a
GmSOG1	Antioksidan enzim birikimi ve kuraklık stresine karşı toleransı artış	Poku ve ark.,2021
DREB	Kuraklık stresine karşı toleransın artması	Zhou ve ark., 2020
GmNFYA13	Stresle ilişkili genlerin transkript düzeylerinde artış gösterdi	Ma ve ak.,2020a
WRKY20	Arttırılmış verim, bitki boyu ve daha yüksek tohum oranı	Ning ve ark.,2017
GmWRKY27	Arttırılmış prolin içeriği	Wang ve ark.,2015

2.2.5.1. ABA Bağımlı Sinyal Yolu

Bitkilerde ABA sinyal yolu, kuraklık stresine yanıtta önemli bir yol oynamaktadır. Son on yılda, bitki kuraklığına tepkideki en önemli gelişmelerden biri, ABA reseptörünün tanımlanması ve ABA sinyal yollarının aydınlatılması olmuştur (Kishor ve ark., 2023). Fitohormon ABA, kuraklık stresine yanıt olarak esas olarak yapraklarda birikir ve daha sonra ABA sinyallemesinin temel fosfor düzenleyicileri olan alt sınıf III SNF1 ile ilişkili protein kinazlar 2'yi (SnRK2'ler) aktive etmektedir. ABA, ABA'ya duyarlı cis etkili element (ABRE), ABA'ya duyarlı element bağlayıcı proteinler (AREB) ABRE bağlayıcı faktörler (ABF) ve diğer birkaç transkripsiyon faktörü dahil olmak üzere strese duyarlı transkripsiyon faktörleri aracılığıyla çok çeşitli gen anlatım süreçlerinde rol oynamaktadır (Şekil 2.15). Fosforilasyon sürecinin ABA

sinyallemesinde önemli roller oynadığı gösterilmiş olup ABA Insensitive 1 (ABI1), ABA sinyallemesinde majör protein fosfataz 2C (PP2C) olarak tanımlanmıştır. *Arabidopsis* SNF1-ilişkili protein kinaz 2'nin (SnRK2) ABA'ya yanıt veren stoma kapanmasında ve ABA'ya bağımlı gen ifadesinde önemli roller oynadığı gösterilmiştir. SnRK2'ler I, II ve III olmak üzere 3 alt sınıfa ayrılır ve yalnızca ABA'ya yanıt veren düzenlemede değil aynı zamanda kuraklık stresi yanıtlarının ABA'dan bağımsız düzenlenmesinde de işlev gördüğü gösterilmiştir. Alt sınıf III SnRK2'ler ABA'ya bağımlı sinyal yollarında önemli roller oynamaktadır. (Soma ve ark., 2021). ABA sinyal yolu, reseptör RCAR/PYR/PYL'ler, protein fosfataz PP2C, kinaz SnRK2'ler (SnRK2.2, SnRK2.3 ve SnRK2.6) ve hedefleme substratlarından oluşur (Yao ve ark., 2021). Pyrabactin resistance1/PYR1-like/ABA reseptör düzenleyicisi bileşenleri (PYR/PYL/RCAR) ailesi, ABA yanıtlarını düzenlemek için ABA'ya bağlanan önemli ABA reseptörleri içermektedir. ABA yokluğunda, alt sınıf III SnRK2'lerin kinaz aktivitesi grup a protein fosfataz 2C (PP2C) tarafından inhibe edilir. Bitkiler kuraklık stresine maruz kaldığında, ABA bitki hücrelerinde büyük miktarlarda birikir ve ardından ABA reseptörleri PYR/PYL/RCAR ABA'ya bağlanır. ABA tarafından bağlanıp aktive edildikten sonra PYR/PYL/RCAR'lar, PP2C'lerle trimerik bir kompleks oluşturur. Bu kompleksler PP2C ile rekabetçi bir etkileşime girer. Bunun sonucunda da PP2C'lerin fosfataz aktivitesini inhibe eder. Etkileşim sonucu SnRK2'ler PP2C'ler tarafından serbest bırakılır. Serbest bırakılan SnRK2'ler otofosforilasyon veya diğer protein kinazlar tarafından fosforilasyon yoluyla aktive edilir (Soma ve ark., 2021).

Birçok kuraklık stresine duyarlı genin promotör bölgelerinde cis etkili ABRE'ler (PyACGTGGC) bulunmaktadır. ABRE motifi esas olarak bZIP tipi transkripsiyon faktörleri, AREB'ler/ABF'ler tarafından tanınmaktadır. SnRK2 hedefleri arasında, AREB'ler/ABF'ler ABA sinyal yolundaki aşağı akış TF'leridir. WRKY, MYB ve NF-Y'ler gibi diğer bazı TF aileleri de kuraklık tepkisi ve adaptasyonda rol oynar (Singh ve Laxmi, 2015; Yao ve ark., 2021). AREB1/ABF2, AREB2/ABF4 veya ABF3'ü aşırı ifade eden transgenik bitkiler, gelişmiş kuraklık toleransı ve artmış ABA duyarlılığı sergilemektedir. Bu dört AREB/ABF'nin, bu abiyotik stres koşulları altında ABRE'leri aracılığıyla ABA'ya bağlı transkripsiyonel aktivasyonda işbirlikçi bir şekilde işlev gören merkezi transkripsiyon faktörleri olduğu gösterilmiştir (Singh ve Laxmi, 2015).



2.2.5.2. ABA Bağımsız Sinyal Yolu

Her ne kadar birçok TF, ABA tarafından indüklense ve ABA'ya bağlı sinyal yolunda işlev görse de ifadesi büyük oranda su eksikliği tarafından indüklenen, ancak öncelikli olarak ABA biyosentezi veya sinyal yolu tarafından aracılık edilmeyen bazı TF'ler vardır (Yoshida ve ark.,2014). DREB2'ler ve bazı NAC'ler bu kategoriye aittir (Yao ve ark.,2021). Isı, kuraklık ve yüksek tuzluluk stresleri, AP2/ERF ailesi transkripsiyon faktörlerinin üyeleri olan susuzluğa duyarlı element bağlayıcı (DREB) proteinlerini indüklemektedir. DREB2A, bitkilerin abiyotik strese karşı toleransını artıran proteinleri kodlayan birçok geni indüklemekte önemli bir rol oynamaktadır (Ali ve ark.,2020). Dehidratasyona duyarlı element bağlayıcı protein 1 (DREB1)/CBF (C-tekrar bağlama faktörü) ve DREB2 düzenleyicileri kuraklık stresi altında gen ifadesinin ABA'dan bağımsız düzenlenmesinde görev alır (Singh ve Laxmi, 2015). Tohumlu bitkilerde, mRNA bozunma yolu ve kuraklık stresi altında bitki büyümesi yoluyla gen anlatımının stabilitesini ABA'dan bağımsız bir şekilde sağlayan ABA'ya yanıt vermeyen alt sınıf I SnRK2'ler olmak üzere başka bir SnRK2 türü bulunmaktadır. Hücrel sinyal iletiminde, alt sınıf I SnRK2 protein kinazları ABA'dan bağımsız sinyal yollarında önemli roller oynamaktadır. Dehidratasyona duyarlı element (DRE), ABA'dan bağımsız transkripsiyonda önemli bir cis etkili elementtir. DREB2A transkripsiyon faktörü dehidratasyon ve ozmotik stres altında ifade edilmektedir. DREB2A, kuraklık stresine duyarlı genlerin promotör bölgelerinde bulunan DRE motifine (A/GCCGAC) bağlanmaktadır (Soma ve ark., 2021).

ABA'dan bağımsız regülasyonda, dehidratasyona duyarlı element bağlayıcı protein (DREB), NAM, ATAF ve CUC2(NAC) düzenleyicileri birçok kuraklığa duyarlı geni düzenleyerek kuraklık yanıtında önemli bir rol oynamaktadır. Bu transkripsiyon faktörlerinden MYC2 ve NAC proteinleri özellikle JA sinyallemede rol oynamaktadır.

Son zamanlarda, AREB/ABF'lerin DREB2A'yı indükleyebildiği ve AREB/ABF'lerin DREB2A ile etkileşime girdiği bildirilmiştir. Bu gözlemlere dayanarak, ABA'ya bağımlı ve ABA'dan bağımsız yolların kuraklık stresi altında çapraz konuştuğu düşünülmektedir. RD29A geninin promotörü ABRE'ye ek olarak DRE/CRT cis elementini içermektedir. *Arabidopsis* RD22 geni, ABA'ya bağlı bir şekilde kuraklık stresıyla indüklenebilir. ABA tarafından indüklenmesine rağmen, promotör

bölgesinde ABRE cis elementi yoktur; buna rağmen anlatımı iki cis etkili element, MYC ve MYB tanıma elementleri tarafından düzenlenmektedir. MYC benzeri bir transkripsiyon faktörü olan MYC2 ve bir MYB transkripsiyon faktörü olan MYB2, bu cis etkili elementlere bağlanır ve bu genin transkripsiyonunu işbirliği içinde aktive eder. AtMYC2 ve AtMYB2'yi aşırı ifade eden transgenik bitkiler, daha yüksek ABA duyarlılığının yanı sıra ozmotik tolerans da sergilemektedir (Singh ve Laxmi, 2015).

2.3. KURAKLIK STRESİNDE ROL ALAN ÖNEMLİ TRANSKRİPSİYON FAKTÖRLERİ

Bitkiler, kuraklık stresine yanıt vermek için çok sayıda mekanizma geliştirmiştir; bunların arasında, transkripsiyonel düzenleme, anahtar mekanizmalardan biridir. Bitkiler, DREB'ler, AP2/ERF, MYB'ler, NAC'ler, bZIP'ler ve WRKY'ler gibi stres tepkilerinde yer alan çok sayıda transkripsiyon faktörü ailesini barındırmaktadır (Melo ve ark., 2020; Yao ve ark., 2021).

Temel lösün fermuarı (bZIP) ailesi, N-terminali oldukça temel bir nükleer lokalizasyon ve DNA bağlanma bölgesi ve C-terminali dimerizasyon için lösün açısından zengin bir motif içeren korunmuş bir bZIP alanı içermektedir Bitki büyümesini ve gelişimini düzenlemenin yanı sıra, bZIP TF'leri kuraklık gibi abiyotik stres tepkisi açısından da önemlidir (Joshi ve ark., 2016).

APETALA2/Etilen Tepki Elemanı Bağlayıcı Faktörler (AP2/ERF) ailesi, bitkiye özgü TF'lerin büyük bir grubunu kapsar ve çokça korunmuş bir AP2/ERF DNA bağlayıcı alanının varlığıyla karakterize edilmektedir. Bu alan, etilene tepkili transkripsiyonda rol oynayan bir DNA dizisi olan GCC kutusu ile bağlanmaktadır. AP2/ERFBP TF'leri, hücre çoğalması, vejetatif ve üreme gelişimi, bitki hormonu tepkileri ve abiyotik/biyotik stres tepkileri gibi bitki biyolojik süreçlerinde çeşitli roller üstlenmektedir (Joshi ve ark., 2016). AP2/ERF transkripsiyon faktörleri bitki stres direncinde önemli bir rol oynar ve önceki çalışmalar bunların bitkilerde kuraklık stresi direnci sürecine farklı yollarla katılabileceğini göstermiştir. AP2/ERF, bitki hormonlarının sentezini etkileyerek kuraklık stresi yanıtını düzenleyebilir. Jasmonik asit ve etilen sinyallerinin bileşeni olarak ERF1'in stres-spesifik gen regülasyonu yoluyla JA, ET ve absisik asit sinyallerini entegre edebileceğini ve kuraklık toleransında pozitif bir rol oynayabileceğini öne sürmüştür (Yang ve ark., 2021).

Son zamanlarda kuraklık stresinde WRKY transkripsiyon faktörlerinin rolü bildirilmiştir. WRKY transkripsiyon faktörleri, DNA bağlanmasında rol oynayan bir veya iki WRKY domainine sahip bir ailedir. WRKY transkripsiyon faktörleri, W kutusu adı verilen korunan bir diziye bağlanır ve gen ifadesini bu şekilde düzenlemektedir. W kutuları, bitki savunma tepkisiyle ilgili birçok genin promotörlerinde ve hatta bazı WRKY transkripsiyon faktörü genlerinin kendi kendini promotörlerinde bulunmaktadır. Bu nedenle, WRKY transkripsiyon faktörleri, W kutusuyla bağlanarak akış aşağı işlevsel genlerin veya diğer düzenleyici genlerin ifadesini düzenleyebilir ve böylece bitkilerdeki çeşitli fizyolojik aktivitelerin düzenleme sürecine katılabilir. Çeşitli WRKY transkripsiyon faktörlerinin ABA sinyallemede rol oynadığı bulunmuştur. WRKY18 ve WRKY60, tohum çimlenmesi ve stres tepkisi sırasında ABA sinyallemede pozitif düzenleyicileri olarak görev yaparken, WRKY40'ın ABA sinyallemede üzerinde tam tersi etkisi bulunmaktadır (Singh ve Laxmi, 2015).

MYB, bitkilerdeki en büyük transkripsiyon faktörü ailelerinden biridir. MYB transkripsiyon faktörünün N-terminali, 52 amino asitten oluşan korunan bir heliks-turn-heliks (HTH) protein DNA bağlanma alanıdır ve doğrudan hedef genlere bağlanmanın doğruluğunu belirler ve GCC kutusu, DRE, ABRE, W kutusu vb. gibi cis bileşenlerine bağlanabilmektedir. C-terminali, bir transkripsiyon faktörünün transkripsiyonel aktivitesini ve akış aşağı genlerin ifade verimliliğini düzenlemek için diğer genler veya bileşenlerle etkileşimini belirleyen transkripsiyonel başlatma bölgesi olarak görev almaktadır. MYB, ikincil metabolizmanın düzenlenmesinde, hormonlara ve çevreye yanıtta, hücre farklılaşmasının ve morfogenezin yönlendirilmesinde yaygın olarak yer almaktadır. Bunlara ek olarak MYB'nin kuraklığa ve diğer abiyotik streslere karşı dirençte önemli bir rol oynadığı bilinmektedir (Yang ve ark., 2021).

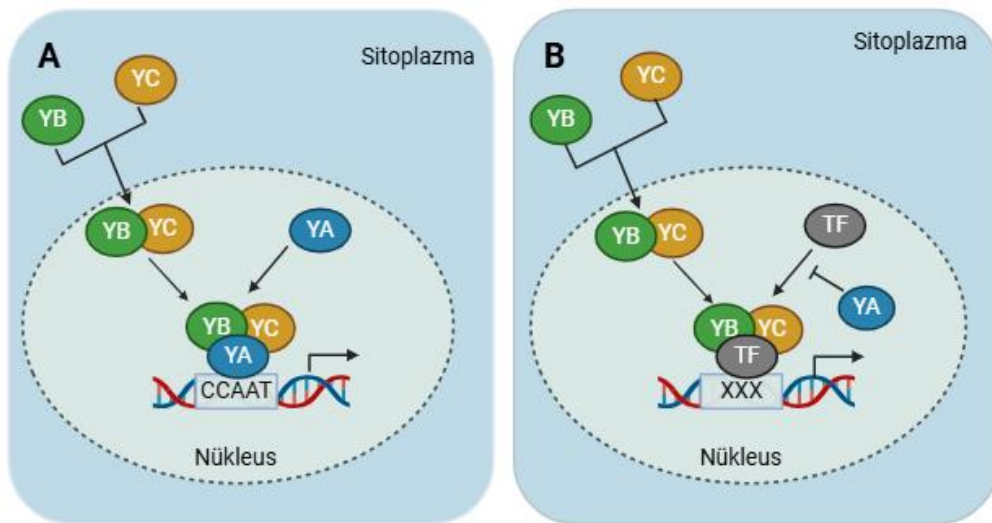
NAC gen ailesi en büyük ve bitkiye özgü TF ailesidir (Joshi ve ark., 2016). NAC transkripsiyon faktörleri ailesi, proteinlerin N-terminalindeki oldukça korunmuş ve spesifik NAC alanları ile değişken bir C-terminalde transkripsiyonel düzenleyici bölgeden karakterize edilen, çeşitli biyolojik işlevlere sahip bitkiye özgü bir transkripsiyon faktörü sınıfıdır.

NAC, kuraklık tepkisinde yer alan genlerin ifadesini doğrudan veya düzenleme aracılığıyla bitkinin kuraklık stresine karşı direncinde önemli bir rol oynamaktadır (Yang ve ark., 2021). Soyada senesensle ilişkili NAC genleri bitkinin senesense ve çoklu streslere karşı toleransını artırmak için potansiyel hedefler olarak belirlenmiştir (Melo ve ark., 2022; Fraga ve ark., 2021; Melo ve ark., 2021).

2.3.1. NFYA5 Ailesi

Bunlara ek olarak, NF-Y (nükleer faktör-Y) transkripsiyon faktörleri de kuraklık stresi yanıtı ve tolerans mekanizmalarında rol oynar. NF-Y transkripsiyon faktörleri, üç farklı alt birimi NF-YA, NF-YB ve NF-YC olan heterotrimerik proteinlerdir ve hedef genlerin promotör bölgesindeki CCAAT kutusuna bağlanmaktadır. Nükleer faktör Y (NF-Y), NF-YA (CBF-B ve HAP2), NF-YB (CBF-A ve HAP3) ve NF-YC (CBF-C ve HAP5) proteinlerinden oluşan heterotrimerik bir transkripsiyon faktörüdür. Memelilerde ve mayada her bir alt birim tek bir gen tarafından kodlanırken, bitkilerde her bir alt birim için birden çok gen ailesi bulunur (Singh ve Laxmi, 2015).

Hem aktivatör faktörü (HAP) veya C- tekrar bağlanma faktörü (C-repeat binding factor, CBF) olarak bilinen Nükleer Faktör-Y (NF-Y), hedef gen ifadesini ya doğrudan bağlayarak ya da CCAAT içeren promotörler veya transkripsiyonel aktivatörler/represörler olabilen diğer proteinlerin fiziksel olarak etkileşimi ve bağlanmasına aracılık ederek düzenlemektedir (Kishor ve ark., 2023).



Şekil 2. 16. NF-Y'nin gen ifadesini modüle ettiği moleküler mekanizmalar (Zhao ve ark., 2017)

Şekil 2.16'da belirtildiği gibi NF-YB-YC heterodimerleri çekirdeğe hareket ederek aktif bir heterotrimer oluşturmak için NF-YA ile etkileşime girer. Bu heterotrimer, hedef genlerin promotör bölgelerindeki CCCAAT kutusuna bağlanır ve anlatımlarına aracılık eder.

NF-YB-YC heterodimeri, bir NF-YB-YC-TF heterotrimeri oluşturmak için transkripsiyon faktörü (TF) ile etkileşime girer ve spesifik cis - elementine (XXX ile gösterilir) bağlanır. NF-YA, TF'nin NF-YB/NF-YC ile etkileşimini rekabetçi bir şekilde engelleyebilir (Zhao ve ark., 2017).

CCAAT sekansındaki herhangi bir mutasyon, DNA-NF-Y kompleksinin oluşumunu etkiler, bu da NF-Y'nin DNA'ya bağlanmasının spesifik CCAAT sekansı gerektirdiğini düşündürmektedir. Bununla birlikte, tüm CCAAT elementleri NF-Y kompleksi tarafından tanınmaz ve bağlanamaz, bu da CCAAT elementlerinin her iki tarafındaki nükleotit dizisinin ve kromatin yapısının NF-Y kompleksinin konformasyonunu etkileyebileceğini ve dolayısıyla NF-Y kompleksinin bağlanma yeteneğini etkileyebileceğini öne sürmektedir. NF-YA, NF-YB ve NF-YC'nin tümü CCAAT kutusuna bağlanmak için gerekli olsa da, doğrudan CCAAT kutusuna bağlanan NF-YA'dır. NF-YB ve NF-YC alt birimi, bir heterodimer oluşturmalarına izin veren histon katlama motiflerine sahiptir. Heterodimer oluştuktan sonra NF-YB/NF-YC, sitoplazmadan NF-YA'nın toplandığı çekirdeğe taşınmaktadır. NF-YA, CCAAT kutusuna bağlanmak için bir tripleks oluşturmak üzere NF-YB/NF-YC heterodimeri ile birleşmelidir ve daha sonra kompleksleri aşağı akış genlerinin (downstream) transkripsiyonunu düzenlemekte rol oynamaktadır. NF-YB/NF-YC heterodimeri, protein kompleksinin stabilize edilmesinde ve spesifik DNA bağlanma bölgelerinin tanınmasında rol oynayabilen DNA glikofosfat iskeletine bağlanmaktadır (Zhang ve ark., 2023; Kishor ve ark., 2023). NF-YA'lar kuraklık, sıcak ve soğuk stresi kaynaklı gen anlatımının negatif düzenleyicileri olarak işlev görebilir, çünkü indirgedikleri genlerin promotörlerinde CCAAT kutusu yoktur, bunun yerine ABRE veya ABRE benzeri motifler vardır. Dolayısıyla, AtNF-YA'ların, bazı bZIP ailesi proteinlerinin NF-YB/NF-YC heterodimer ile etkileşimini önleyerek ABA'ya yanıt veren genlerin anlatımını negatif olarak düzenlediği ileri sürülmektedir. Başka bir deyişle, NF-YA, NF-YB/NF-YC heterodimerinin birleşmesi engelleyerek ve promotörlerinde CCAAT olmayan cis-elementlere sahip genlerin anlatımını

düzenleyen diğer TF'lerle birleşmesini önleyen bir baskılayıcı aktiviteye sahiptir (Wenkel ve ark., 2006; Yamamoto ve ark., 2009). Genel olarak NF-YA ile oluşan kompleksin doğrudan CCAAT kutusuna bağlı olduğuna inanılmaktadır. Bununla birlikte, son çalışmalar NF-Y'lerin diğer transkripsiyon faktörleriyle etkileşime girdiğini göstermiştir. NF-YB'ler/YC'ler genellikle promotörlere doğrudan bağlanamadıklarından ve hedef, etkileşime girdikleri transkripsiyon faktörleri tarafından belirlendiğinden, NF-Y'ler için daha fazla potansiyel hedef bulunmalıdır (Zhang ve ark., 2023).

Son araştırmalar doğrultusunda NF-Y kompleksinin gen anlatımını bağımsız olarak düzenlediğine veya diğer transkripsiyonel düzenleyiciler ile stres cevabını oluşturduğuna dair önemli kanıtlar vardır. NF-Y kompleksi, NF-YA alt birimini, kompleksi CCAAT olmayan cis elementlerine bağlayan diğer proteinlerle değiştirerek işlevsel çeşitliliğini artırır ve NF-YA'nın aşırı anlatımı nedeniyle NF-YB/NF-YC kompleksinin diğer proteinlerle etkileşimini bozduğu bildirilmektedir (Kishor ve ark., 2023).

Gelişimsel ve çevresel stres sırasında bitki NF-Y'leri belirli görevleri üstlenmektedir. Bu görevler, spesifik genlerin CCAAT kutularına bağlanmasıyla gerçekleştirilmektedir. NF-YB nükleusa yalnızca NF-YC ile ilişkili bir heterodimer olarak dahil edilmektedir. NF-YA genleri, tohum gelişimi, kök yapısı, nitrojen fiksasyonu, çiçeklenme, biyotik/abiyotik stres tepkileri ve diğer süreçlerde yaygın olarak yer alan hedef genler olarak rol oynamaktadır (Siriwardana ve ark., 2014; Zhang ve ark., 2023). *Arabidopsis* NF-YA genleri NF-YA1, 3, 5, 6, 8 ve 9'un gametogenez, embriyogenez, tohum morfolojisi ve tohum çimlenmesini düzenlediği bilinmektedir. NF-YB'nin spesifik üyelerinin, özellikle LEC 1 grubunun, embriyogenez ve tohum gelişimini düzenlediği rapor edilmiştir. LEC1, özellikle somatik ve erken zigotik embriyogenez üzerine etki etmektedir. Üçüncü alt birim olan NF-YC de pek çok gelişimsel düzenlemede önemlidir. *Arabidopsis* NF-YC3, NF-YC4 ve NF-YC9, hem NF-YB2 hem de NF-YB3 ile fiziksel olarak in vivo etkileşime girer ve çiçeklenme zamanını düzenlemek için gereklidir (Quach ve ark., 2015). Stres altında genetik yolları düzenleyen birçok transkripsiyon faktörü arasında nükleer faktör Y (NF-Y), hem aktivatör protein (HAP) ve hayvan, maya ve bitki sistemlerinde NF-YA (HAP2 veya CBF-B), NF-YB (HAP3 veya CBF-A) ve NF-YC (HAP5 veya CBF-C) alt

birimlerinden oluşan korunmuş bir heterotrimerik kompleks olan CCAAT bağlayıcı faktör (CBF) bulunur (Myers ve Holt, 2018). NF-Y proteinleri, özellikle kuraklık stresine yanıt olarak bitki büyümesinde ve gelişiminde stres toleransının önemli düzenleyicileridir. Şimdiye kadar *Arabidopsis*, *Triticum aestivum*, *Zea mays*, *Oryza sativa*, *Glycine max* gibi bitkiler de birçok bireysel NF-Y alt birimi bulunmuştur. Ayrıca, stoma iletkenliği, klorofil içeriği, yaprak sıcaklığı, solmanın azalması ve fotosentezin sürdürülmesi dahil olmak üzere birçok stresle ilişkili parametrenin önerdiği gibi, ortolog bir mısır transkripsiyon faktörü ZmNFYB2 kuraklık toleransında rol oynamaktadır. *PdNFYB7'nin* aşırı anlatımını kuraklık toleransını teşvik eder ve *Arabidopsis*'te su kullanım verimliliğini iyileştirir; bu da su eksikliğinde bile üretimi artıran kuraklığa dayanıklı bitkilerin yetiştirilmesindeki potansiyel rolünü gösterir (Han ve ark., 2013; Sun ve ark., 2022).

Patateslerde StNF-YC9'u aşırı ifade etmek, kısa süreli kuraklık stresi altında kök uzunluğunu ve fotosentetik hızı artırmış ve su kaybı oranını azaltmıştır. Uzun süreli kuraklık stresi altında, malondialdehit içeriği azalırken, prolin birikimi ve süperoksit dismutaz, katalaz ve peroksidaz dahil olmak üzere antioksidan enzimin aktivitesi artmıştır.

Zhang ve arkadaşlarının yaptıkları kuraklık stresi deneyinde iki yaşında tatlı portakallar (*Citrus sinensis*) kullanılmıştır. Deneme 45 L'lik plastik saksılarda yetiştirilen bitkilerle sera koşullarında gerçekleştirilmiş ve CsNF-YA5'in su stresi altında yaprak ve kökte farklı roller oynadığı gösterilmiştir. CsNF-YA5'in tütünde aşırı ifade edilmesi, H₂O₂ üretimini önemli ölçüde azaltmıştır (Zhang ve ark., 2023). NF-YA5 transkriptleri, ABA'ya bağlı bir şekilde kuraklığa tepki olarak artmaktadır. Ayrıca, NF-YA5'in gen anlatımının yüksek olduğu bitkiler kuraklığa dayanıklıyken, NFYA5 mutantları duyarlı olarak tespit edilmiştir (Sirirwardana ve ark., 2014). *Arabidopsis*'te yapılan bir çalışmada AtNFYA5, stoma açıklığının ve kuraklık direncinin kontrol edilmesinde önemli olduğu bulunmuştur. Hem transkripsiyonel hem de transkripsiyon sonrası seviyelerde kuraklık stresi tarafından düzenlendiği belirtilmiştir. Bu çalışmalar, NF-Y'nin bitkilerde stres tepkilerinde önemli bir rol oynadığını göstermektedir (Li ve ark., 2008).

NF-YA5'in yanında, diğer NF -YA'nın aşırı ifadesi YA2, A3, A7 ve A10 gibi genler de kuraklığa karşı toleransı arttırmıştır. Bu sonuç NF-Y alt birimlerinin stres tepkilerinde örtüşen işlevleri paylaştığını göstermektedir (Zhao ve ark., 2017). 2015 yılında yapılan çalışmada 30 genin soya yaprağı ve kök örneklerinde kuraklık uygulamasına yanıt verdiği bulunmuştur. Bu genler arasında NF-YA üyelerinin kuraklığa daha duyarlı olduğu görülmektedir (Quach ve ark., 2015). Kuraklık stresine ve endoplazmik retikulum (ER) stresine yanıtın, NF-YA5 ve NF-YB1 ve ayrıca NF-YA4, NF-YB3 ve NF-YC2 aracılık ettiğini Hackenberg ve ark., bildirilmiştir. NF-Y, transkripsiyon faktörü bZIP28 ile birlikte, CCAAT-box elemanı ile kombinasyon halinde endoplazmik retikulum strese duyarlı eleman I'e (ERSE-I) bağlanır (Hackenberg ve ark., 2012). Tablo 2.2'de belirtildiği gibi Gma-miR169c'nin anlatımının arttığı transgenik bitkilerde AtRD29A, AtRD22, AtGSTU25 ve AtCOR15A seviyelerinin yabani tip bitkilerden daha düşük olduğu gösterilmiştir. Strese duyarlı genler AtNFTU25, AtCOR15A, AtRD29A ve AtRD22'nin transkript seviyelerini, hedeflerinin AtNF-YA1 ve AtNF-YA5'in transkript seviyelerini azaltarak negatif düzenleyici rol oynadığı, bunun transgenik *Arabidopsis*'te kuraklık stresine karşı toleransın azalmasına neden olduğu bulunmuştur (Yu ve ark., 2019). NF-YA5'in aşırı ifadesi, yaprak su kaybını azaltarak yabani tip bitkilere kıyasla kuraklık stresine karşı direnci arttırmıştır. NF-YA5 mutantları kuraklık stresine karşı daha hassas olmakla birlikte NF-YA5'in kuraklık stresi tepkilerini pozitif olarak düzenlediği tespit edilmiştir (Zhou ve ark., 2017). *Arabidopsis* ve pirinç bitkileriyle karşılaştırıldığında, soya genomu daha büyüktür ve 115 NF-Y geni ve 21 NF-YA üyesi içermektedir. Bununla birlikte, yalnızca GmNFYA3 (Ni ve ark., 2013) ve GmNFYA5 (Ma ve ark., 2020b) işlevsel olarak karakterize edilmiştir. Yapılan bu çalışmalarda GmNFYA3 ve GmNFYA5'in aşırı anlatımı, bitkilere kuraklık toleransı sağlayabilmektedir. NF-YA ailesinin bir soya üyesi olan GmNFYA5, kuraklık ve ABA ile indüklenmiştir. GmNFYA5'in transkripsiyon seviyesi, kuraklık koşulları altında tüm GmNFYA'lar arasında en yüksek olan NFYA ailesi üyesi olarak belirlenmiştir. GmNFYA5'in anlatımı yüksek olan transgenik *Arabidopsis* ve soya bitkileri hem ABA'ya bağımlı hem de ABA'dan bağımsız yollarla kuraklık stresine karşı gelişmiş tolerans göstermiştir. ABA'ya bağımlı genlerin (ABI2, ABI3, NCED3, LEA3, RD29A, P5CS1, GmWRKY46, GmNCED2 ve GmbZIP1) ve ABA'dan bağımsız genlerin (DREB1A, DREB2A, DREB2B, GmDREB1,

GmDREB2 ve GmDREB3), GmNFYA5 gen anlatımı yüksek olan transgenik bitkilerde kuraklık stresi altındaki yabancı tip bitkilerden daha yüksek olduğu ve GmNFYA5 transkriptinin baskılanması ile zıt sonuçlar ürettiği saptanmıştır (Ma ve ark., 2020b).

Tablo 2. 2. Kuraklık stresinde rol oynayan NF-Y genleri

Gen	Bitki	Etki Mekanizması	Referans
GmNF- YA16/YB2/YC14	<i>Glycine max</i>	Kuraklık stresine karşı toleransın ve ABA'ya karşı duyarlılığın artması	Yu ve ark.,2021
AtNF-YA5	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Kuraklık direnci ve erken embriyogenez	Li ve ark.,2008
GmNFYA5	<i>Arabidopsis thaliana</i> <i>Glycine max</i>	Kuraklık toleransı	Ma ve ark.,2020b
NFYA1 ve NFYA5	<i>Arabidopsis thaliana</i> <i>Glycine max</i>	miR169c aracılı kuraklık stresi yanıtı	Yu ve ark.,2019
GmNFYA3	<i>Glycine max</i>	Kuraklık toleransı için pozitif düzenleyici	Ni ve ark.,2013
GmNFYA13	<i>Glycine max</i>	Kuraklık ve tuz toleransı	Ma ve ark.,2020a
NF-YB7	<i>Populus</i>	Su kaybının azalması ve ABA'ya karşı duyarlılığın artması	Han ve ark.,2013
AtNF-YB1 (AtHAP3a)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Kuraklığa dayanıklılık	Wenkel ve ark.,2006
GmNFYB-17	<i>Glycine max</i>	Kök gelişimi ve kuraklığa dayanıklılık	Sun ve ark.,2022

GmNFYA5 muhtemelen promotörlere in vivo bağlanarak GmDREB2 ve GmbZIP1'in transkript bolluğunu düzenlemiştir. Bu çalışmada kullanılan tüm işaretleyici genlerin promotörlerinde bir ila altı CCAAT cis-etkili element tespit edilmiştir. Transkripsiyonel aktivasyon

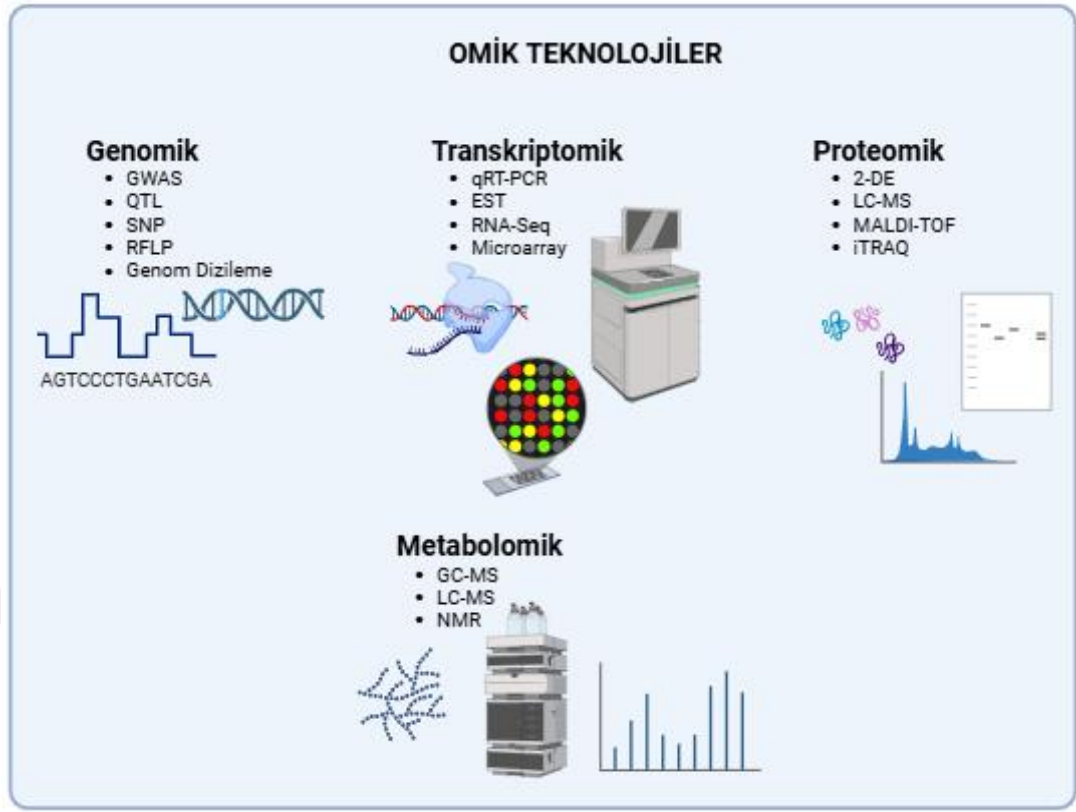
deneyleri, GmDREB2 ve GmbZIP1 promotörlerinin, LUC raportör geninin in vivo anlatımını arttırmak için GmNFYA5 ile bağlandığını göstermiştir. Sonuçlar, *Arabidopsis* ve soyada hem ABA'ya bağımlı hem de ABA'dan bağımsız yollar aracılığıyla GmNFYA5 tarafından kuraklık toleransının düzenlenmesine ilişkin daha fazla bilgi vermektedir. Bu sebeple NF-YA transkripsiyon faktörlerinin, verim için ciddi tehdit oluşturan abiyotik streslere karşı toleransı modüle etme işlevi gördüğü ifade edilmektedir (Ma ve ark., 2020b). NF-Y kompleksi tarafından yönetilen sinyal yolları ve düzenleyici modeller hala tam olarak anlaşılamamıştır. NF-Y'lerin bitki hormonlarına (oksin, sitokinin, etilen ve brassinolid) bağlı yollardaki abiyotik strese verdiği yanıtların mekanizmalarını ve diğer stres yanıtlarındaki rolünü daha fazla araştırılmasının üzerinde durulmaktadır (Zhang ve ark., 2023).

Son çalışmalar, NF-Y'lerin ABA sinyal yollarının düzenlenmesinde kilit roller oynadığını göstermiştir. NF-Y'ler, kuraklık stresine ABA'ya bağlı yanıt olarak bilinen ABA sentezini veya ABA sinyallerine yanıtı düzenlemede yer almaktadır (Kishor ve ark., 2023). NF-Y, sadece ABA'ya bağımlı yolu düzenleyerek değil, aynı zamanda ABA'ya bağımlı olmayan aktiviteyi de düzenleyerek, özellikle bitkinin fotosentetik etkinliğini iyileştirerek, antioksidan enzim aktivitesini artırarak ve aktif hidrojen peroksit içeriğini azaltarak bitkinin kuraklığa karşı toleransını arttırmaktadır (Ma ve ark., 2020b; Zhang ve ark., 2023). NF-Y geninin ABA, tuz ve kuraklık stresleri tarafından indüklenebildiğini ve bu genlerin ABA'ya bağımlı olduğu bu sebeple bazı NF-Y'lerin ABA ile ilişkili yollarda yer alabileceğini ortaya çıkarılmıştır. *Physcomitrella patens*, *S. bicolor* gibi çeşitli bitkilerde ABA'ya bağımlı ve bağımsız yollar yoluyla abiyotik strese yanıt veren birkaç NF-Y geni bulunmaktadır (Kishor ve ark., 2023).

2.4. KURAKLIK STRESİ ve TRANSKRİPTOMİK ÇALIŞMALAR

Bitkiler hareketsiz organizmalar olduğu için değişen çevresel koşullara uyum sağlamak amacıyla çeşitli stratejiler geliştirmişlerdir. Bitkilerin strese karşı biyolojik tepkileri, hücre zarlarındaki, hücre döngüsündeki, hücre bölünmesindeki, metabolizmadaki değişiklikleri içermektedir. Moleküler düzeyde, transkripsiyonel düzenlemeden başlayarak mRNA, translasyon, protein modifikasyonu ve protein üretimine kadar gen ifadesindeki değişiklikler bulunmaktadır. Stresle ilişkili

transkripsiyonel düzenleme, stresli çevresel koşullara maruz kaldığında bitkilerin transkriptomunu değiştirir. Transkripsiyonel olarak düzenlenen bu genler, sinyal molekülleri, transkripsiyon, translasyon, metabolizma ve strese yanıt verme gibi farklı işlevlerde rol oynamaktadır. 'Om' eki, bu süreçlerin genom, transkriptom, proteom metabolomu ve fenom alanları altında incelenmesini ifade etmektedir. Son yıllarda, omik yaklaşımlar, tarımı yapılan bitkilerin biyolojisinin genetik ve moleküler temellerini incelemek için tercih edilen bir strateji olarak ortaya çıkmıştır (Haq ve ark., 2024). Genomik, transkriptomik, proteomik ve metabolomik gibi çeşitli omik analizler, bitkilerin abiyotik streslere verdiği tepkiler hakkında çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır (Basim ve ark., 2021). Omikler, karmaşık biyolojik etkileşimlerine (genotip $\times$ çevre) ışık tutarak stres çalışmaları için bilgi edinilmesine katkı sağlamıştır. Omik yaklaşımlar biyotik ve abiyotik stres direnciyle ilişkili varsayımsal genlerin/kantitatif özellik lokuslarının (QTL'ler), dahil olan yolların ve üretilen ara veya son proteinlerin ve metabolitlerin işlevsel analizinin hızlı bir şekilde tanımlanmasını sağlamaktadır (Bisht ve ark., 2023). Şekil 2.17'de belirtildiği gibi çeşitli kalitatif ve kantitatif özelliklerin genetik temelleri, gen ifadesi, genler, proteinler ve metabolitler arasındaki karmaşık etkileşimlerin fenotipi nasıl etkilediğini açıklayan mekanizmalar hakkında anlayışımızın geliştirilmesi genomik, transkriptomik, proteomik ve metabolomik gibi omik teknolojiler sayesinde olmuştur. Genomik teknolojiler genom çapında ilişkilendirme (GWAS), tek nükleotit polimorfizmi (SNP), genom dizileme gibi tekniklere dayanmaktadır. Transkriptomik teknolojiler ise RNA genomik teknolojilerden farklı olarak sekanslama, microarray, qRT-PZR gibi tekniklerle birlikte gen anlatımı hakkında bilgi vermektedir. Proteomik teknolojiler bir organizmanın hücresinde, dokusunda veya organelinde protein ifadesini tanımlamak ve analiz etmek için kullanılmaktadır. Protein ifadesinin analizi için 2-DE, LC-MS, MALDI-TOF gibi tekniklerden faydalanılmaktadır (Haq ve ark., 2024).



Şekil 2. 17. Günümüzde kullanılan omik teknolojiler (Haq ve ark., 2024 referans alınarak düzenlenmiştir) GWAS: genom çapında ilişkilendirme, QTL: kantitatif karakter lokusu, SNP: tek nükleotit polimorfizmi, RFLP: Restriksiyon Fragment Length Polymorphism/Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi, qRT-PCR: Gerçek zamanlı kantitatif revers-transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu, EST: expressed sequence tags, 2-DE: iki boyutlu jel elektroforezi, LC-MS: sıvı kromatografisi- kütle spektrofotometresi, MALDI-TOF: Matriks-destekli lazer desorpsiyon/ionizasyonu, GC-MS: Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi, NMR: Nükleer manyetik rezonans

2.4.1. RNA Dizilemesi

RNA dizilemesi (RNA-seq), yüksek doğruluk ve düşük maliyete sahip yüksek verimli bir dizileme teknolojisidir. Bitkiler ile abiyotik stresler arasındaki etkileşimleri değerlendirmek için bitkilerde gen ifadesi analizinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Xu ve ark., 2023). Teknolojik gelişmeler ve azalan maliyetler nedeniyle, RNA-seq analizi, bitkiler ve abiyotik stresler arasındaki etkileşimi değerlendirmek için en etkili yöntemlerden biri haline gelmiştir (Li ve ark., 2022b). RNAseq, yeni nesil dizileme (NGS) teknolojilerini kullanarak bir organizmanın mRNA transkriptlerini dizileme tekniğidir.

Dizileme maliyetleri önemli ölçüde azalırken, yüksek verimli dizileme teknolojileri sayesinde doğruluk artmıştır. RNAseq tekniğinin geniş genom kapsamı sağlamasına yardımcı olan yeni nesil dizileme teknolojilerine Roche 454, Nanopore, Pac Bio, SOLiD ve Illumina örnek olarak verilebilir. RNAseq, mevcut genler ve belirli zamanlarda veya belirli koşullar altında aktivasyonları hakkında çok fazla bilgi verir. Son 10 yılda yayınlanan makale sayısının da gösterdiği gibi, NGS teknolojileri son yıllarda mikrodiziye göre RNAseq'i geliştirmiştir (Haq ve ark., 2024). Dizileme okumalarının Illumina/Solexa platformu kullanılarak üretilmesi günümüzde daha çok tercih edilmektedir. Illumina/Solexa dizilemeye dayalı Dijital Gen İfade Etiketli profili (DGE) teknolojisi, gen ifadesindeki değişiklikleri kapsamlı, ekonomik ve hızlı bir şekilde tespit etmek için kullanılabilir (Chen ve ark., 2013). Illumina/Solexa dizilemeye dayalı DGE teknolojisi, gen ifadesindeki değişiklikleri kapsamlı, ekonomik ve hızlı bir şekilde tespit etmek için kullanılmaktadır (Feng ve ark., 2010; Chen ve ark., 2013).

Transkriptomik analize dayanarak, kuraklık stresiyle ilişkili bitkilerde WRKY, MYB ve DREB, AP2/ERF bZIP ve NAC dahil olmak üzere birçok TF tespit edilmiştir. Ek olarak, KEGG analizine göre kuraklık stresi altında mitogenle aktive olan protein kinaz (MAPK) sinyal yolu ve Ca^{2+} sinyal yolunun rol oynadığı bulunmuştur (Zhao ve ark., 2020; Liu ve ark., 2022). 2018 yılında soyada kuraklık stresinin etkisini anlaşılması amacıyla gerçekleştirilen transkriptomik çalışmada en az iki kat değişiklik gösteren toplam 2771 genden, 1798 genin anlatımının arttığı ve 973 genin anlatımının azaldığı bulunmuştur. KEGG analizi yoluyla, bu genlerin ABA biyogenezi, sekonder metabolit sentezi, bitki transkripsiyon faktörleri dahil olmak üzere birden fazla moleküler süreçte rol oynadığı tespit edilmiştir. Çok sayıda farklı şekilde ifade edilen gen ve çeşitli yollar, soyanın kuraklık stresi ile başa çıkmak için karmaşık mekanizmalar kullandığını göstermektedir (Xu ve ark., 2018).

Li ve ark., tarafından 2022b yılında gerçekleştirilen çalışmada çiçeklenme aşamasında üç farklı seviyede kuraklık stresine maruz kalan soya bitkisinin tepki mekanizması araştırılmıştır. Fizyolojik, transkriptomik ve WGCNA (Weighted gene co-expression network analysis) analizleri gerçekleştirilmiş ve kuraklık stresi altındaki soyada TF'ler ve potansiyel gen yolları tanımlanmıştır.

Üç farklı kuraklık stresinde sırasıyla toplam 2214, 3684 ve 2985 diferansiyel olarak anlatım yapan gen (DEG) RNA-seq ile tanımlanmıştır. WGCNA ile birlikte WRKY (Glyma.15G021900 ve Glyma.15G006800), MYB (Glyma.15G190100 ve Glyma.15G237900) ve bZIP (Glyma.15G114800) gibi soyada kuraklık direncini düzenleyebilen kuraklığa yanıt TF'leri belirlenmiştir (Li ve ark., 2022b).

Fizyolojik, transkriptomik ve WGCNA analizleri sonucunda kuraklık stresi altındaki soya bitkisindeki TF'leri ve bu süreçte rol oynayan yollar belirlenmiştir. Bunlar antioksidan genlerin, hormonal sinyal yollarının, Glyma.08G176300 (NCED1), Glyma.03G222600 (SDR), Glyma.02G048400 (F3H), Glyma.14G221200 (CAD), Glyma.14G205200 (C4H) ve Glyma.19G105100 (CHS), Glyma.07G266200 (VTC5-2) ve Glyma.15G251500 (GST) genlerinin aktivasyonu aracılığıyla kuraklık stresi ile başa çıkmak için MDA birikimi, SOD ve CAT aktiviteleri ile yanıt verdiği belirlenmiştir (Li ve ark., 2022b). Önceki transkriptomik çalışmalar, kuraklık tepkilerinde yer alan gen kümeleri açısından zenginleştirilmiş gen ontoloji yollarını tanımlamış olsa da, bireysel genlerin kuraklık toleransını arttırmadaki işlevini doğrulamamıştır. Soyada kuraklığa toleransa aracılık eden moleküler modülleri araştırmak için daha kapsamlı biyolojik örneklerden elde edilen transkriptomik kaynaklara ihtiyaç vardır. Bu tür kaynaklar, kuraklığa, özellikle de tohum çimlenmesinden sonra uzun süreli kuru döneme maruz kalmaya dayanıklı, yüksek verimli soya fasulyesi çeşitlerinin geliştirilmesine yardımcı olması beklenmektedir (Yang ve ark., 2023). Bu tez kapsamında farklı soya bitkilerinin (Üstün-1 ve Ataem-07) ve bu bitkilere ait mutantların (101-15 ve 150-43) kuraklık stresine verdikleri yanıtların altında yatan mekanizmaların aydınlatılması hedeflenmiştir. Bu çalışmada soya bitkisine ait kuraklık ile ilgili NFYA5 transkripsiyon faktörü ele alınarak hedef gen etkileşimlerinin ortaya çıkarılması amaçlanmaktadır. NFYA5 transkripsiyon faktörünün etkilediği ABA bağımlı ya da bağımsız yollardaki genlerin bitki stres cevabındaki rolleri aydınlatılmaya çalışılacaktır. Çalışmanın sonucunda, çevresel stres faktörlerine karşı dayanıklılığa sahip çeşitlerin geliştirilmesi için kullanılacak mutant hatların kuraklığa karşı stres cevaplarının aydınlatılması ve ilişkili özelliklerin açığa çıkarılması ile ıslah programına katkı sağlanması amaçlanmaktadır.

3. MATERYAL - METOT

3.1. BİTKİ MATERYALLERİNİN YETİŞTİRİLMESİ VE KURAKLIK STRES UYGULAMALARI

Bu çalışmada deneysel materyal olarak T.C. İstanbul Kültür Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Laboratuvarı'nda TAGEM projesi kapsamında elde edilmiş Ataem-07, S04-05 (Üstün-1) ve mutant (150-43 ve 101-15) soya bitkileri kullanılmıştır. Mutant bitkiler Cs-137 gama radyasyonu kaynağında 150, 200 ve 250 Gy gama radyasyonu ile ışınlanmıştır. Işınlama sonrası hem in vitro hem in vivo tuz ve kuraklık toleranslılık seleksiyonları tamamlanmıştır. M4 generasyonuna ve takip eden generasyonlara ait tohum üretimi, İstanbul Kültür Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde gerçekleştirilmiştir (Atak ve ark., 2024).

Bu tez kapsamında 6. generasyon (M6) kuraklığa toleranslı soya (*Glycine max*) mutantları (Ataem 150-43, S04-05-101-15) ve kökenlendiği anaç bitkiler (Ataem-07, S04-05) toprak içeren plastik kaplarda her kapta 30'ar bitki olacak şekilde 3 tekrarlı olarak optimum koşullarda altında (16 gündüz/8 gece saatlik fotoperiyot, 18-28 °C) 14 gün boyunca bitki büyüme odasında yetiştirildi (Ning ve ark., 2017, Yu ve ark., 2019, Ma ve ark., 2020b). 14 günün sonunda bitkiler sudan kesilme yoluyla 14 gün boyunca kuraklık stresine maruz bırakıldı. Kuraklık stresi ardından bitkilere belirli miktarda su verilerek yeniden sulandı (Yu ve ark., 2019). Yeniden su uygulamasından 24 saat sonra kuraklık stresi ve yeniden sulamanın bitkilerde neden olduğu değişiklikleri belirlemek amacıyla yaprak örnekleri alınıp analizler gerçekleştirildi (Quach ve ark., 2015; Ning ve ark., 2017; Ma ve ark., 2020b). Analizler, her alt gruba ait kaplardan rastgele seçilen bitkilerin üçlü yapraklarının (V1, V2 ve V3) bulk yapılması ile 3 tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

Bitkilerin gelişimleri her üç günde bir gözlemlendi. Tüm bitkilerin boy ve kök uzunlukları ölçüldü. Hasat edilen bitki materyali analiz öncesi -86 °C derin dondurucuda muhafaza edildi. RNA izolasyonları kaliteli RNA elde edilebilmesi için hasat günü taze yapraklardan gerçekleştirildi.

Tablo 3. 1. Tezde kullanılan soya çeşitleri ve mutantlara ait uygulamalar

Soya Çeşitleri ve Mutantları	Uygulamalar
S04-05 (Üstün-1)	Üstün Kontrol (ÜC)
	Üstün Kuraklık (ÜD)
	Üstün Yeniden Sulama (ÜRW)
101-15	101-15 Kontrol (101-15C)
	101-15 Kuraklık (101-15D)
	101-15 Yeniden Sulama (101-15RW)
Ataem-07	Ataem Kontrol (AC)
	Ataem Kuraklık (AD)
	Ataem Yeniden Sulama (ARW)
150-43	150-43 Kontrol (150-43C)
	150-43 Kuraklık (150-43D)
	150-43 Yeniden Sulama (150-43RW)

3.2. BİYOKİMYASAL ANALİZLER

Bu tez kapsamında seçilen anaç ve mutant soya bitkilerinin kuraklık stresine verdikleri biyokimyasal cevapları ve yeniden sulamanın kuraklık stresindeki bitkilerde neden olduğu biyokimyasal düzeydeki değişiklikleri göstermek için Malondialdehit (MDA), fotosentetik pigment (klorofil A, klorofil B ve total klorofil) ve prolin analizleri yapıldı.

3.2.1. Malondialdehit (MDA) Analizi

Oksidatif stres sonucu oluşan bir lipid peroksidasyon ürünü olan malondialdehit (MDA) içeriği, tiyobarbitürik asit ve trikloroasetik asit reaktif maddeleri kullanılarak belirlendi (Xing ve ark., 2023, Ma ve ark., 2020b). V1, V2 ve V3 üçlü yapraklarının bulk yapılması ile yaklaşık 0,1 g yaprak örneği 1 ml dH₂O ile havanda homojenize edilen örnek 2 ml'lik santrifüj tüpüne aktarıldı. Taze olarak hazırlanan 30 ml % 10'luk trikloroasetik asit (TCA, Sigma, T6399500G) ve %0,5'lik tiyobarbitürik asit (TBA, Sigma, 5500) karışımından 1 ml alınarak havanda kalan örnek yıkama yapılarak tüpte bulunan örneğin üstüne aktarıldı. Daha sonra örneklerin tamamı TCA-TBA tamponu

ile 2 ml'e tamamlanıp yavaşça alt üst edildi. 95 °C'de 30 dakika inkübasyondan sonra örnekler buza alınarak reaksiyon durduruldu. Daha sonra örnekler 4 °C'de 10.000x g'de 30 dakika santrifüj edilerek süpernatant yeni tüpe aktarıldı. Yeni tüpe alınan örneklerin 532 ve 600 nm'de absorbans değerleri spektrofotometrede (Implen NP80) ölçüldü. Ölçülen veriler $\mu\text{mol MDA} / (\text{gxTA})$ cinsinden hesaplanarak analiz tamamlandı. Ölçümler 3 biyolojik ve 3 teknik tekrar ile gerçekleştirildi (Lv ve ark., 2007; Liu ve ark., 2013; Ma ve ark., 2020b).

3.2.2. Fotosentetik Pigment Analizi

Kuraklık stresinin ve yeniden sulamanın fotosentetik pigment konsantrasyonları üzerindeki etkisinin saptanması için kontrol ve mutant bitkilerde klorofil tayini gerçekleştirildi. Üçlü yaprakların (V1, V2 ve V3) bulk yapılması ile elde edilen 0,1 g yaprak örneği sıvı azot yardımı ile havanda toz hale getirildikten sonra % 80'lik (v/v) soğuk aseton (Merck, 100014) ile ezildi. Homojenatlar buzda 20 dakika bekletildikten sonra 15 dakika boyunca 10.000x g'de santrifüj gerçekleştirildi. Santrifüjden sonra süpernatant kısımları yeni tüpe aktarıldı. Örnekler 470, 645 ve 663 nm dalga boylarında kör örnek (blank) olarak % 80'lik soğuk aseton kullanılarak ölçüldü. Fotosentetik pigment konsantrasyonları aşağıdaki denklemlere göre hesaplanarak $\mu\text{g/gxTA}$ cinsinden ifade edildi. Ölçümler 3 biyolojik ve 3 teknik tekrar ile gerçekleştirildi. Klorofil konsantrasyon hesaplamaları aşağıda belirtilen formüle göre hesaplandı (Qiu ve ark., 2013).

Klorofil a konsantrasyonu ($\text{mg} / \text{g} \times \text{taze ağırlık}$) = $12,7 \times A_{663} - 2,69 \times A_{645}$

Klorofil b konsantrasyonu ($\text{mg} / \text{g} \times \text{taze ağırlık}$) = $22,9 \times A_{647} - 4,68 \times A_{663}$

Toplam Klorofil ($\text{mg/g} \times \text{taze ağırlık}$) = $20,2 \times A_{645} + 8,02 \times A_{663}$

3.2.3. Prolin Analizi

Ataem-07 ve Üstün-1 soya çeşitleri ve bu çeşitlere ait mutantların kuraklık stresi ve yeniden sulama uygulamasına yanıt olarak koruyucu bir osmoprotektan olan prolin birikim seviyelerinin tespiti Bates ve ark., 1973'e göre gerçekleştirildi. Bu deney için bitkilere ait V1, V2 ve V3 üçlü yapraklarının bulk yapılması ile 0,1 g yaprak örneği havan içinde % 3'lük (v/w) sülfosalisilik asit (Merck, 800691) yardımıyla homojenize edildi. Örnekler 10.000x g'de 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüjden çıkan örneklerin

süpernatantları cam tüplere aktarıldı. Süpernatantların üstüne 2 ml asetik asit (Merck,100063) ve 2 ml ninhidrin (Merck, 10676200100) solüsyonu eklenerek reaksiyon için 100 °C’de 1 saat inkübe edildi. 1 saatin sonunda reaksiyonun sonlandırılması için tüpler buza alındı. Daha sonra tüplerin her birine 4 ml tolüen (Merck,108325) eklenerek prolin konsantrasyon ölçümleri 520 nm’de spektrofotometrik olarak saptandı. Ölçüm sonuçları standart kalibrasyon eğrisine göre $\mu\text{mol/g}$ TA cinsinden verildi. Ölçümler 3 biyolojik ve 3 teknik tekrar ile gerçekleştirildi (Nguyen ve ark., 2019).

3.3. RNA EKSTRAKSİYONU VE cDNA SENTEZİ

RNA izolasyonu için kullanılacak cam ve seramik malzemelere 180°C’de 180 dakika sterilizasyon gerçekleştirildi. Kullanılacak pipet uçları ve tüpler iki kere otoklavlanarak kullanıldı. RNA izolasyonları kaliteli RNA elde edilebilmesi için hasat günü taze yapraklardan gerçekleştirildi. Analizler, her alt gruba ait kaplardan rastgele seçilen bitkilerin üçlü yapraklarının (V1, V2 ve V3) bulk yapılması ile 3 tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

Total RNA izolasyonu Trizol (Invitrogen,15596026) kullanılarak gerçekleştirildi. 0,1 gram yaprak sıvı azot yardımıyla toz haline gelene kadar ezildi. Ezilen örnek santrifüj tüpüne alındıktan sonra üzerine 1 ml Trizol eklendi. Tüp yavaşça alt-üst edilerek örneğin homojenize olması sağlandı. Örnekler 5 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 200 μl kloroform (Merck, 1024454000) eklenip 20 saniye boyunca yavaşça alt üst edildikten sonra 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. 15 dakika 12.000x g 4 °C’de santrifüj gerçekleştirildi. Santrifüj sonrası üst faz yeni bir santrifüj tüpüne aktarılıp örnekler 1:1 oranda izopropanol (Merck, 109634) eklenip yavaşça alt üst edildi. Örnekler 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 15 dakika 12.000x g 4 °C’de santrifüj gerçekleştirildi. Örnekler, süpernatant uzaklaştırılıp 1 ml %70’lik Etanol (Merck, 100983) ile pellet yerinden kalkana kadar hafifçe alt üst edildi. 5 dakika 7.500x g 4 °C’de santrifüj gerçekleştirilip süpernatant uzaklaştırılarak tüp ters bir şekilde kurumaya bırakıldı. Son olarak 30 μl Rnaz içermeyen su (RNaz-free water) eklenerek ekstraksiyon tamamlandı. Toplam RNA’nın konsantrasyonu ve saflığı (A260/280), bir NanoDrop spektrofotometre (Implen NP80) ile ölçüldü (Tablo 3.2).

Tablo 3. 2. RNA İzolasyonlarına ait Konsantrasyon-Safılık Grafiği

Örnek İsmi	Konsantrasyon (ng/µl)	Safılık (A260/280)
Üstün-1 Kontrol 1.Tekrar	458,08	1,95
101-15 Kontrol 1.Tekrar	270,36	1,88
Ataem-07 Kontrol 1.Tekrar	494,08	1,83
150-43 Kontrol 1.Tekrar	187,16	1,84
Üstün-1 Kuraklık 1.Tekrar	168,16	1,77
101-15 Kuraklık 1.Tekrar	127,80	1,87
Ataem-07 Kuraklık 1.Tekrar	186,92	1,89
150-43 Kuraklık 1.Tekrar	178,72	1,82
Üstün-1 Yeniden Sulama 1.Tekrar	459,68	2,06
101-15 Yeniden Sulama 1.Tekrar	310,96	1,94
Ataem-07 Yeniden Sulama 1.Tekrar	760,4	2,05
150-43 Yeniden Sulama 1.Tekrar	841,0	2,12
Üstün-1 Kontrol 2.Tekrar	311,80	2,0
101-15 Kontrol 2.Tekrar	572,20	1,98
Ataem-07 Kontrol 2.Tekrar	532,68	1,90
150-43 Kontrol 2.Tekrar	181,20	1,88
Üstün-1 Kuraklık 2.Tekrar	212,80	1,95
101-15 Kuraklık 2.Tekrar	84,00	1,89
Ataem-07 Kuraklık 2.Tekrar	244,88	1,88
150-43 Kuraklık 2.Tekrar	196,40	1,84
Üstün-1 Yeniden Sulama 2.Tekrar	89,56	1,92
101-15 Yeniden Sulama 2.Tekrar	204,2	1,83
Ataem-07 Yeniden Sulama 2.Tekrar	465,04	2,09
150-43 Yeniden Sulama 2.Tekrar	85,60	1,81

Tablo 3. 3. RNA İzolasyonlarına ait Konsantrasyon-Safılık Grafiği(devamı)

Üstün-1 Kuraklık 3.Tekrar	584,28	2,05
101-15 Kuraklık 3.Tekrar	423,67	1,93
Ataem-07 Kuraklık 3.Tekrar	274,76	1,99
150-43 Kuraklık 3.Tekrar	465,23	1,89
Üstün-1 Yeniden Sulama 3.Tekrar	552,64	2,02
101-15 Yeniden Sulama 3.Tekrar	400,01	1,92
Ataem-07 Yeniden Sulama 3.Tekrar	346,93	1,95
150-43 Yeniden Sulama 3.Tekrar	393,34	2,01
Üstün-1 Kontrol 3.Tekrar	294,08	1,95
101-15 Kontrol 3.Tekrar	416,80	1,92
Ataem-07 Kontrol 3.Tekrar	574,08	1,94
150-43 Kontrol 3.Tekrar	392,6	1,72

Daha sonra RNA örneklerinin agaroz jel elektroforezinde kalitatif analizleri gerçekleştirildi (Kulcheski ve ark., 2011; Shen ve ark., 2022). Örnekler 6x Loading Dye (Thermo Scientific™ 6X DNA Loading Dye) ile karıştırılarak kuyulara yüklendi. Tüm RNA örnekleri %1'lik agaroz jelde 1xTBE tamponunda 40 dakika boyunca yürütüldü. Marker olarak Thermo Scientific™ GeneRuler 1 kb DNA Ladder kullanıldı. cDNA'lar, iScript cDNA Kit (BioRad,1708891) protokolü kullanılarak sentezlendi. Sentez için her tüp 4 µL 5X iScript reaksiyon karışımı + 1 µL iScript reverse transkriptaz +1 µL RNA + 14 µL nükleaz içermeyen su (nuclease free water) olacak şekilde hazırlandı. Elde edilen cDNA'lar qRT-PZR için 100 ng'a sulandırılarak kullanıldı (Ni ve ark., 2013; Quach ve ark., 2015; Xing ve ark., 2023). cDNA sentezi için amplifikasyon koşulları Tablo 3.3'te verilmiştir.

Tablo 3. 4. cDNA sentezi için kullanılan amplifikasyon koşulları

	Sıcaklık (°C)	Süre (dk)
Priming	25 °C	5
Reverse Transkriptasyon	46 °C	20
İnaktivasyon	95 °C	1

3.4. GMNFYA5 ANLATIMININ qRT-PZR İLE SAPTANMASI

Soya NF-YA5 hedef gen bölgeleri NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>)’dan elde edildi. Hedef gene özgü primerler NCBI Primer Blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) ile tasarlandı. Ayrıca primerlerin özgünlüğü yine NCBI Primer Blast programı ile analiz edildi. Primerlerin dimer yapma olasılıkları Thermo Multiple Primer Analyzer (<https://www.thermofisher.com/tr/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/multiple-primer-analyzer.html>) ile kontrol edildi. Housekeeping gen olarak Elf1b seçildi. Tüm primerlere ait diziler Tablo 3.4’te belirtilmiştir.

Tablo 3. 5. GmNFYA5 Anlatımı için q-RT-PZR’da Kullanılan Primerler

Gen	Primer Dizisi	Ürün Boyutu
NFYA5	F:5'-ACATGCAGGGTTATTCCGCA -3'	126 bp
	R: 5' CTCCAACAGAGCGTGAAGA-3'	
Elf1b	F: 5'-CTGCCACACTTCAATCGCAC -3'	198 bp
	R: 5' - TCGTACCACCTGGCAGCATT-3'	

3.4.1. Gradient PZR

Hedef gen bölgelerine ait tasarlanan primerlerin qRT-PZR öncesi bağlanma sıcaklıklarının belirlenmesi amacıyla Thermo Master Mix 2x (Thermo, K0172) ile gradient PZR gerçekleştirildi. PZR bileşenleri son hacim 20 µL olacak şekilde 10 µL Master Mix +0,5 µL forward primer (10 µM) +0,5 µL (10 µM) reverse primer 8 µL

nükleaz içermeyen su + 1 µL cDNA (100 ng) olacak şekilde hazırlandı. Gradient PZR için kullanılan amplifikasyon koşulları Tablo 3.5’te belirtilmiştir.

Tablo 3. 6. Gradient PZR amplifikasyon koşulları

	Sıcaklık	Süre	Döngü
İlk denatürasyon	95 °C	3 dk	1
Denatürasyon	95 °C	30 sn	
Primer Bağlanma	55-55.5-57-59-60.4-61 °C	20 sn	30
Uzama	72 °C	25 sn	
Son uzama	72 °C	10 dk	1

3.4.2. qRT- PZR

Gen anlatım düzeylerini ölçmek için qRT-PZR amplifikasyonu, IQ™ SYBR® Green Super Mix (BioRad,1708880) kullanılarak CFX Connect Bio-Rad Real-Time PCR System ile 96 oluklu plakada gerçekleştirildi. qRT-PZR amplifikasyonu için kullanılan koşullar Tablo 3.6’da belirtilmiştir. Tüm reaksiyonlar üç tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirildi. Elf1b geninin referans gen olarak kullanılması ile normalizasyon gerçekleştirildi ve hedef gen anlatım düzeyindeki değişimler rölatif olarak delta-delta Ct metoduna (Pfaffl) göre belirlendi (Li ve ark., 2008; Ni ve ark., 2013; Quach ve ark., 2015; Ning ve ark.,2017; Shen ve ark., 2022).

Tablo 3. 7. qRT-PZR amplifikasyon koşulları

	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
İlk Denatürasyon	95 °C	3 dk	1
Denatürasyon	95 °C	10 sn	
Primer Bağlanma ve Plate Okuma	59 °C	30 sn	39
Melt Curve	55-95 °C arasında her 5 saniyede 0,5 °C artış		1

3.5. mRNA SEKANSLAMA

Transkriptom analizi Gen Era Diagnostik tarafından gerçekleştirilmiştir. İzole edilmiş RNA materyaline ait kalite kontrol işlemlerinde florometrik ve kapiler elektroforez yöntemleri kullanılarak, miktar, saflık ve yapısal bütünlük tayini yapılmıştır. Ölçümlerde Qubit 3 florometresi (Thermo Fisher, ABD, #Q33216) ve 2100 Bioanalyzer (Agilent, ABD, #G2939BA) veya alternatif olarak 4200 TapeStation (Agilent, ABD, #G2991BA) kullanılmıştır. RNA örnekleri, cDNA kitaplıklarının oluşturulması için hazırlanmıştır. İzole edilmiş RNA materyalinin kütüphane hazırlığında, Illumina Stranded mRNA Prep kiti (Illumina, ABD, #20040534) kullanılmıştır. Kit, tüm RNA içindeki hedeflenen mRNA'ların poly-A kuyruklarından yakalanması, rastgele parçalanması ve ardından birincil ve ikincil cDNA zincirlerinin oluşturulması esasına dayanmaktadır. Kütüphane hazırlık sürecinde sırasıyla, yakalama, parçalama, mRNA pürifikasyonu, cDNA sentezi, index-barkod dizilerinin eklenmesi ve pürifikasyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. Dizileme çalışmasında Illumina NovaSeq 6000 yeni nesil dizileme platformu kullanılmıştır. Bu basamakta örnek başı ortalama 20 milyon adet 150 bp uzunlukta çift yönlü (paired-end) okuma elde edilmesi planlanmıştır. Kütüphane ölçümü, seyreltme ve yükleme işlemleri gerçekleştirilmiştir (Yoav ve Hochberg, 1995; Bolger ve ark., 2014).

Kuraklık stresi altında soya bitkilerinin diferansiyel olarak anlatım yapan genleri (DEG'ler) daha iyi tespit etmek için, tarama kriterleri olarak 0,01'den düşük bir yanlış keşif oranı (False discovery rate, FDR) ve 2'den az olmayan kat değişimi (Fold change, FC) kullanılmıştır. Örnekler arasındaki DEG'ler, Gen Ontolojisi (Gene ontology, GO) fonksiyonel zenginleştirme analizine, Ortolog Gen Kümelerinin Sınıflandırılmasına (Cluster of orthologous genes, COG) sınıflandırılmasına ve Kyoto Genler ve Genomlar Ansiklopedisi (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) ek açıklamasına uygun olarak değerlendirilmiştir. Genlerin fonksiyonları GO veri tabanından elde edilmiştir. Tüm moleküler yolların analizi KEGG tarafından gerçekleştirilmiştir (Yu ve ark., 2020; Li ve ark., 2022a).

3.6. RNA DİZİLEME SONRASI VERİ SETLERİNİN OLUŞTURULMASI VE RNASTAR İLE ANLATIM NORMALİZASYONU

Dizileme işlemi sonrasında, elde edilen okuma verilerinin kalite kontrolü amacıyla FastQC kalite kontrol aracı kullanılmıştır. Kalite kontrol sonuçlarına göre her bir örneğin, veri miktarları, okuma kaliteleri, GC dağılımları, k-mer dağılımları, olası adaptör kontaminasyonları incelenmiştir. Dizileme sürecinde, ham okuma verilerindeki düşük kalitedeki baz okumaları ve olası adaptör-indeks kontaminasyonları sonraki analiz basamaklarında sapmalara neden olmaması için, okumalardan kırılmıştır. Kalite değerlerine göre kırma işlemleri için Trimmomatic (v0.39) aracı kullanılmıştır (Bolger ve ark., 2014). Kırma sonrasında eldeki diziler, Illumina DRAGEN Bio-IT platformu ve RNA Pipeline iş akışı kullanılarak analiz edilmiştir (Robinson ve ark., 2010). RNAseq okumaları, seçilen genomla kırılma bölgeleri dikkate alınarak (splice-aware) hizalanmıştır. Bu uygulamada referans genom olarak ilgili organizmanın güncel referans genomu (*Glycine_max_v2.1*) kullanılmıştır. Hizalama sonrası anotasyonunda¹ gen, ekzon ve transkript bilgileri için ilgili veriseti kullanılmıştır. Bu işlem sonrasında her bir transkript üzerindeki okuma sayıları hesaplanmış ve ardından ilgili transkriptin uzunluğuna göre normalize edilerek RPK (Reads per Kilobase) değerleri elde edilmiştir. Bu değerler ardından toplam okuma sayısına göre tekrar normalize edilerek TPM (Transcripts Per Million) değerleri çıkarılmıştır. Normalizasyon sonrasında, gruplar arası anlatımı değişen genleri (Differentially Expressed Genes) belirlemek için R paketi (Robinson ve ark., 2010) ve Quasi-Likelihood modeli kullanılmıştır. Gen ontoloji analizinde TopGO paketi (Alexa ve Rahnenfuhrer, 2021) ve Kolmogorov-Smirnov (KS) istatistiksel testi kullanılmıştır. Yolak analizlerinde clusterProfiler paketi kullanılmıştır (Yu ve ark., 2012). Grup içi ve gruplar arası istatistiksel karşılaştırma çalışmalarının düzenlenmesi, veri görselleştirme uygulamaları ve rapor oluşturulmasında R betikleri kullanılmıştır. Hizmet alımı kapsamında genomla hizalama sonrasında, her bir transkriptom elemanına (gen veya ekzon) kaç adet okuma düştüğü hesaplanmıştır. Her bir gen ve ekzon için okuma sayılarını içeren bu veri seti, anlatım gösteren ve göstermeyen genlerin bir karışımını içermektedir.

¹ Genlerin yeri ve rolünün belirlenmesi

Bu karışım içerisinde bazı genler, örneklerin büyük bir kısmında çok düşük oranda anlatıma sahip olabilir veya hiç anlatım göstermeyebilir. İleri analizleri etkilememesi amacıyla bu veriler, veri setinden çıkarılmıştır.

3.7. GMNFYA5 İLE İLİŞKİLİ HEM ABA BAĞIMLI HEM DE ABA BAĞIMSIZ SİNYAL YOLLARINDA GÖREV ALAN GENLERİN ANLATIM PROFİLLERİNİN BELİRLENMESİ

Her bir genin anlatımının belirlenebilmesi için per million birimi kullanılarak gen anlatım profilleri hesaplanmıştır. Kuraklık stresi altında soya bitkilerinin gen anlatım profillerinin karşılaştırması için diferansiyel anlatım analizi kullanılarak istatistiksel analizler sonucu p değerleri hesaplanmıştır. Genlerin fonksiyonları GO veritabanından elde edilmiştir. NFYA5 ile ilişkili ABA bağımlı ve ABA bağımsız sinyal yollarında görev alan genlerin etkileşimleri KEGG ile belirlenmiştir (Li ve ark., 2022a).

3.8. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Soya bitkilerine ait kontrol, kuraklık ve yeniden sulama gruplarının bitki gelişimleri, fizyolojik ve biyokimyasal veriler ile gen anlatım düzeyleri Graphpad PRISM 8 kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirildi. Programda tek yönlü ANOVA test yapılmış ve standart sapmalar Brown-Forsythe ve Welch ANOVA test kullanılarak hesaplandı (Qiu ve ark., 2013; Li ve ark., 2022b).

4. SONUÇLAR

4.1. BİTKİ MATERYALLERİNİN YETİŞTİRİLMESİ VE KURAKLIK STRES UYGULAMALARI

6. generasyon (M6) soya (*Glycine max*) mutantları (Ataem 150-43, S04-05-101-15) ve anaç bitkileri (Ataem-07, Üstün-1) 14 gün boyunca optimum koşullarda (16 gündüz/8 gece saatlik fotoperiyot, 18-28 °C) yetiştirildi. Şekil 4.1’de ekimden sonra 14. gündeki bitki gelişimleri gösterilmiştir.



Şekil 4. 1. 14 günlük Ataem/150-43/Üstün/101-15 bitki gelişimi. Soldan sağa Ataem/150-43/Üstün/101-15 soya bitkileri

T.C. İstanbul Kültür Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Bitki Biyoteknolojisi laboratuvarında geliştirilen 4.generasyonda (M4) tuzluluğa ve kuraklığa karşı dayanıklılığı olduğu tespit edilen mutantların kuraklık stresine verdikleri yanıtların araştırılması için gerçekleştirilen bu çalışmada Şekil 4.2’de gösterildiği gibi stres uygulanan tüm deney gruplarındaki bitkilerde 10. gün sonunda kotiledonların yanı sıra ikili yapraklarda da solma ve sararmalar gözlemlenmiştir. Kontrol grubuna ait bitkilerde solma ve sararma meydana gelmemiştir.



Şekil 4. 2. 10 günlük kuraklık stresine Ataem ve Üstün kontrol bitkileri ve mutantlarının cevapları A) Soldan sağa sırasıyla Üstün Kontrol/Üstün Kuraklık ve 101-15 Kontrol/ 101-15 Kuraklık soya bitkileri B) Soldan sağa sırasıyla Ataem-07 Kontrol/Ataem-07 Kuraklık ve 150-43 Kontrol/150-43 Kuraklık soya bitkileri

Şekil 4.3'te gösterildiği gibi 14 günlük kuraklık stresi uygulaması sonucunda stres uygulanan bitki gruplarının tümünde stres uygulanmayan kontrollerine kıyasla boy gelişimlerinde azalma gözlemlenmiştir. Aynı zamanda stres uygulaması sonucu V1-V2 üçlü yapraklar dahil olmak üzere tüm yapraklarda stresin fizyolojik etkisi gözlemlendi. Kuraklık stresi uygulanan bitkilerin yapraklarında sararmaların yanı sıra su kaybının etkisiyle kıvrılmalar gözlemlenmiştir. Kontrol grubuna ait bitkilerin yapraklarında herhangi bir sararma ve kıvrılma gözlemlenemezken kuraklık stresi bitkilerine kıyasla daha geniş yaprak alanına sahiplerdi.



Şekil 4. 3. 14 günlük kuraklık stresine Ataem ve Üstün kontrol bitkileri ve mutantlarının cevapları A) Soldan sağa sırasıyla Üstün Kontrol/Üstün Kuraklık ve 101-15 Kontrol/ 101-15 Kuraklık soya bitkileri B) Soldan sağa sırasıyla Ataem-07 Kontrol/Ataem-07 Kuraklık ve 150-43 Kontrol/150-43 Kuraklık soya bitkileri

14 günlük kuraklık stresi uygulaması sonucunda bitkilerin kuraklık stresinden kurtularak iyileşme yeteneklerinin değerlendirilmesi amacıyla yeniden sulama uygulaması gerçekleştirilmiştir. Kuraklık stresine maruz kalan Üstün ve mutantı olan 101-15 bitkilerinin boy uzunlukları kontrol grubu bitkilerine kıyasla oldukça kısaydı. Yapraklar kuraklık stresi etkisiyle beraber sararmış ve kıvrılmıştı. Yeniden sulama uygulamasından 24 saat sonra fizyolojik değişiklikler gözlemlenmiştir. Şekil 4.4'te gösterildiği gibi kuraklık stresi altındaki bitkilerin yeniden sulama sonrasında bitki büyümesinde ve yapraklarda değişiklikler görülmüştür. Yeniden sulama ile birlikte Üstün ve mutantı olan 101-15 bitkilerinde yaprakların suya ulaşmaları ile birlikte kıvrılmalar kısmen düzelmiştir. Kuraklık etkisiyle meydana gelen sararmalarda değişiklik gözlemlenmemiştir. Boy uzunlukları elde alındığında ise kuraklık stresine kıyasla artışlar belirlense de kontrol grubu bitkilerine ulaşamamıştır.



Şekil 4. 4. Yeniden sulama uygulaması sonrası Üstün ve 101-15 bitkilerinde iyileşme yetenekleri A) Sırasıyla soldan sağa Üstün Kontrol/Üstün 15.gün Kuraklık/Üstün Yeniden Sulama B) Sırasıyla soldan sağa 101-15 Kontrol/101-15 15.gün Kuraklık/101-15 Yeniden Sulama

Ataem ve mutantı 150-43 bitkilerinde yeniden sulama uygulamasından 24 saat sonraki fizyolojik değişiklikler Şekil 4.5'te gösterilmiştir. Ataem-07 ve mutantı olan 150-43 bitkilerinin kuraklık stresi altındaki cevapları ve yeniden sulama sonrasında bitki büyümesinde ve yapraklarında değişiklikler görülmüştür. Kuraklık stresi ile sararan yapraklarda değişiklik gözlemlenemezken kıvrılmış yapraklarda iyileşmeler gözlemlenmiştir. Ataem-07 ve mutantı 150-43'te kuraklık stresi ile kontrol bitkilerine kıyasla daha kısa bitki boyları tespit edilirken yeniden sulama ile bitki boylarında artışlar tespit edilmiştir. Ataem-07 bitkilerine kıyasla mutantı olan 150-43 bitkilerinde kuraklık stresinin zararlı etkileri daha fazla azaltılmıştır.



Şekil 4. 5. Yeniden sulama uygulaması sonrası Ataem-07 ve 150-43 bitkilerinde iyileşme yetenekleri A) Sırasıyla soldan sağa Ataem-07 Kontrol/Ataem-07 15.gün Kuraklık/Ataem-07 Yeniden Sulama B) Sırasıyla soldan sağa 150-43 Kontrol/150-43 15.gün Kuraklık/150-43 Yeniden Sulama

Tüm bitkilerin boy ve kök uzunlukları ölçülmüştür. Tablo 4.1’de Üstün, 101-15, Ataem ve 150-43’e ait ortalama boy ve kök uzunlukları belirtilmiştir. Üstün soya çeşidinde, kuraklık stresi uygulanan bitkilerin kontrole göre bitki boyu ve kök uzunlukları sırasıyla % 80,7 ve % 83,75 olarak belirlenmiştir. Bu çeşitte yeniden sulamada bitki boyunda % 90,1 oranı belirlenirken kök uzunluğunda anlamlı değişiklik belirlenememiştir. 101-15 mutant bitkilerde ise kuraklık stresinde bitki boyu ve kök boyu sırasıyla % 62,06 ve % 76,56 olarak belirlenirken yeniden sulamada bitki boyunda bu oran % 64,24’e kökte ise % 82,44’e yükselmiştir.

Ataem soya çeşidinde kontrol grubuna kıyasla kuraklık stresi bitki boyu ve kök boyu sırasıyla % 84,45 ve % 81,02 olarak belirlenmiştir. Ancak bu oran yeniden sulamada bitki boyunda değişmemiş kök uzunluğunda % 82,50’ye çıkmıştır. 150-43 mutant bitkisinde ise kuraklık stresinde bitki boyu ve kök boyu sırasıyla % 72,43 ve % 81,80 olarak belirlenirken yeniden sulamada bitki boyunda bu oran % 74,64 olarak bulunmuş ancak kökte anlamlı olarak değişmemiştir.

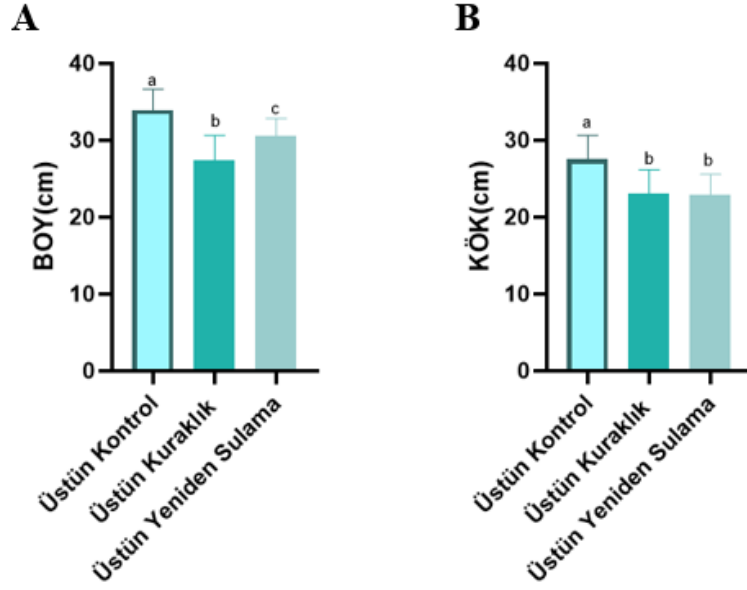
Tablo 4. 1. Üstün, 101-15, Ataem ve 150-43 Ortalama Boy ve Kök Uzunlukları

Uygulamalar	Boy		Kök	
	cm	%	cm	%
Üstün Kontrol	33,95±2,696 ^a	100	27,57±3,087 ^a	100
Üstün Kuraklık	27,41±3,236 ^b	80,7	23,09±3,101 ^b	83,75
Üstün Yeniden Sulama	30,59±2,262 ^c	90,1	22,93±2,653 ^b	83,17
101-15 Kontrol	24,17±2,752 ^a	71,19	25,73±2,316 ^a	93,32
101-15 Kuraklık	21,07±2,751 ^b	62,06	21,11±1,894 ^b	76,56
101-15 Yeniden Sulama	21,81±3,285 ^c	64,24	22,73±1,275 ^b	82,44
Ataem Kontrol	31,20± 4.062 ^a	100	28,41±4,740	100
Ataem Kuraklık	26,35±3,911 ^b	84,45	23,02±3,861 ^a	81,02
Ataem Yeniden Sulama	26,43±2,162 ^b	84,71	23,44±3,833 ^b	82,50
150-43 Kontrol	27,61±1,803 ^a	88,49	26,15±3,135 ^b	92,04
150-43 Kuraklık	22,60±2,666 ^b	72,43	23,24±4,081 ^a	81,80
150-43 Yeniden Sulama	23,29±1,351 ^b	74,64	23,26±2,274 ^b	81,87

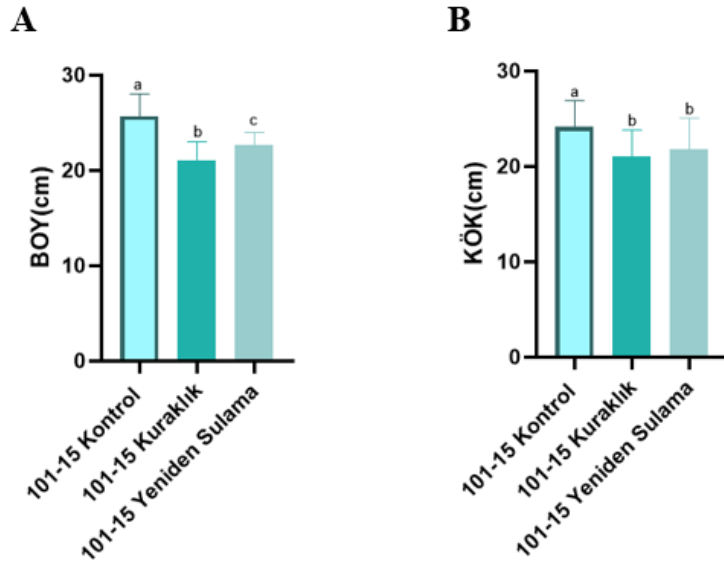
*Aynı harfle gösterilmeyenler, Üstün, 101-15, Ataem ve 150-43 için ortalama bitki boyu ve ortalama kök uzunluğu bakımından aralarındaki farkların, en az 0,05 önemli olduğunu ifade etmektedir. (± Standart Sapma)

En yüksek boy ortalamasına sahip grup Üstün kontrol (33,95 cm) olarak belirlenmiştir (Şekil 4.6). En düşük boy ve kök ortalamasına sahip grup 101-15 kuraklık olarak belirlenmiştir (Şekil 4.7). Kök ortalamaları kıyaslandığında en yüksek ortalama sahip Ataem kontrol grubu olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.8).

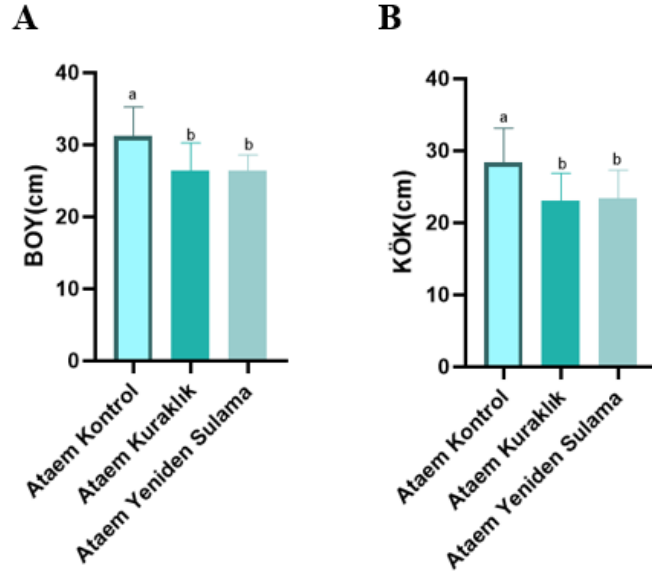
Kuraklık uygulaması ile birlikte tüm gruplarda boy ve kök ortalamalarında azalma gözlemlenmiştir. 150-43 mutantında kontrol-kuraklık ve kontrol-yeniden sulama grupları arasında anlamlı fark bulunurken kuraklık-yeniden sulama grupları arasında anlamlı fark bulunmamıştır (Şekil 4.9).



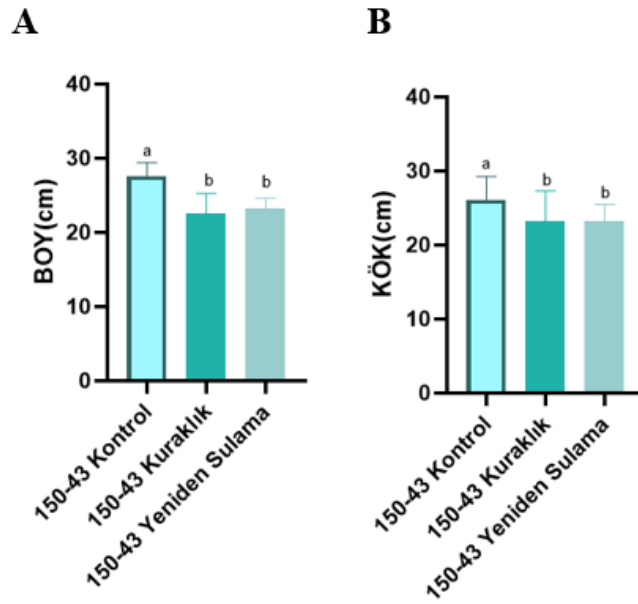
Şekil 4. 6. Üstün soya çeşidinin Kuraklık stresine ve yeniden sulamaya karşı verdikleri cevaplar A) Üstün Kontrol-Üstün Kuraklık ve Üstün Yeniden Sulamaya ait ortalama boy uzunlukları verilmiştir B) Üstün Kontrol-Üstün Kuraklık ve Üstün Yeniden Sulamaya ait ortalama kök uzunlukları verilmiştir



Şekil 4.7. 101-15 soya çeşidinin Kuraklık stresine ve yeniden sulamaya karşı verdikleri cevaplar A) 101-15 Kontrol-101-15 Kuraklık ve 101-15 Yeniden Sulamaya ait ortalama boy uzunlukları verilmiştir B) 101-15 Kontrol-101-15 Kuraklık ve 101-15 Yeniden Sulamaya ait ortalama kök uzunlukları verilmiştir.



Şekil 4.8. Ataem soya çeşidinin Kuraklık stresine ve yeniden sulamaya karşı verdikleri cevaplar A) Ataem Kontrol- Ataem Kuraklık ve Ataem Yeniden Sulamaya ait ortalama boy uzunlukları verilmiştir B) Ataem Kontrol- Ataem Kuraklık ve Ataem Yeniden Sulamaya ait ortalama kök uzunlukları verilmiştir



Şekil 4.9. 150-43 soya çeşidinin Kuraklık stresine ve yeniden sulamaya karşı verdikleri cevaplar A) 150-43 Kontrol- 150-43 Kuraklık ve 150-43 Yeniden Sulamaya ait ortalama boy uzunlukları verilmiştir B) 150-43 Kontrol- 150-43 Kuraklık ve 150-43 Yeniden Sulamaya ait ortalama kök uzunlukları verilmiştir

4.2. BİYOKİMYASAL ANALİZLER

Bu tez kapsamında kuraklık stresinin etkisi ve yeniden sulamanın bitkiler üzerindeki iyileşme yeteneklerinin biyokimyasal düzeyde değerlendirilmesi amacıyla Malondialdehit tayini (MDA), total klorofil içeriği ve prolin tayini gerçekleştirilmiştir.

4.2.1. Malondialdehit (MDA) Tayini

Örneklere ait ölçümlerin ortalamaları ve standart sapma değerleri Tablo 4.2’de belirtilmiştir. Tabloda belirtildiği gibi tüm bitki gruplarında kuraklık stresi ile birlikte lipid peroksidasyon artışı tespit edilmiştir. MDA içerikleri yüzde olarak değerlendirildiğinde Üstün kuraklık bitkilerinde kontrol bitkilerine kıyasla %36 oranında artan MDA içeriği (% 136) saptanmıştır. Yeniden sulama ile birlikte artan MDA içeriği kontrole yakın bir değere ulaşmıştır. 101-15 bitkilerinde benzer şekilde kontrol grubuna kıyasla kuraklık stresi uygulanan grupta (%60) artan MDA içeriği gözlemlenirken yeniden sulama uygulaması (%87) sonucu MDA içeriğindeki artış devam etmiştir.

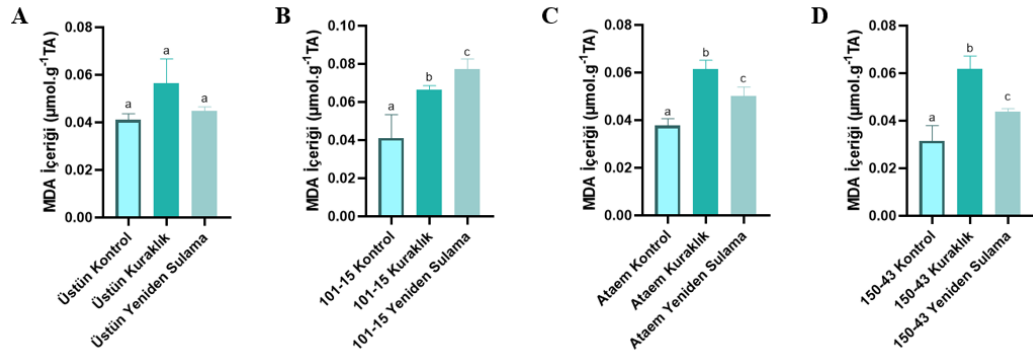
Ataem bitkilerinde benzer şekilde kontrol grubu 100 kabul edildiğinde kuraklık uygulaması ile 2 kat artan MDA içeriği yeniden sulama (%135) ile birlikte yaklaşık % 30 oranla kuraklık bitkilerine kıyasla azalmıştır. 150-43 bitkilerinde ise kuraklık stresi uygulanan grupta % 164 oranında MDA içeriği gözlemlenirken yeniden sulama ile birlikte kontrole yakın bir değere (% 116) düşmüştür.

Tablo 4. 2. Üstün,101-15, Ataem ve 150-43 Ortalama MDA İçeriği

Uygulamalar	MDA	
	$\mu\text{mol.g}^{-1}\text{TA}$	%
Üstün Kontrol	0,041±0,002 ^a	100
Üstün Kuraklık	0,056±0,0103 ^a	136
Üstün Yeniden Sulama	0,044±0,001 ^a	107
101-15 Kontrol	0,041±0,01229 ^a	100
101-15 Kuraklık	0,066±0,001 ^b	160
101-15 Yeniden Sulama	0,077±0,0052 ^c	187
Ataem Kontrol	0,037±0,002 ^a	100
Ataem Kuraklık	0,061±0,00360 ^b	164
Ataem Yeniden Sulama	0,050±0,0038 ^c	135
150-43 Kontrol	0,031±0,0063 ^a	83
150-43 Kuraklık	0,061±0,0053 ^b	164
150-43 Yeniden Sulama	0,043±0,0012 ^c	116

*Aynı harfle gösterilmeyenler, Üstün,101-15, Ataem ve 150-43 için ortalama MDA içeriği bakımından aralarındaki farkların, en az 0,05 önemli olduğunu ifade etmektedir. ± Standart Sapma

En yüksek MDA içeriğine sahip grup 101-15 yeniden sulama (0,077 $\mu\text{mol.g}^{-1}\text{TA}$) iken en düşük MDA içeriğine sahip grup 150-43 kontrol (0,031 $\mu\text{mol.g}^{-1}\text{TA}$) olarak bulunmuştur (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. Tüm Bitkilere ait Kontrol, Kuraklık ve Yeniden Sulama MDA İçeriklerinin Oranı. Üstün soya çeşidi (A) Mutant 101-15 (B) Ataem soya çeşidi (C) Mutant 150-43 (D) bitkilerinin Kontrol, Kuraklık ve Yeniden Sulama sonucundaki MDA içeriklerini gösterilmektedir. (Aynı harfle gösterilmeyenler, Üstün, 101-15, Ataem ve 150-43 için ortalama MDA içeriği bakımından aralarındaki farkların, en az 0,05 önemli olduğunu ifade etmektedir).

4.2.2. Klorofil Tayini

Kuraklık stresinin ve yeniden sulamanın fotosentetik pigment konsantrasyonları üzerindeki etkisinin saptanması için gerçekleştirilen klorofil tayinine ait klorofil a, klorofil b ve total klorofil miktarlarına ait değerler Tablo 4.3'te verilmiştir.

Üstün kontrol bitkilerinde klorofil A değeri % 100 kabul edildiğinde kuraklık stresi ile bu oran % 62,2 olarak bulunurken yeniden sulama ile birlikte oran % 103,7 olarak hesaplanmıştır. 101-15 klorofil A içeriği değerlendirildiğinde kuraklık stresinde oran %64,83 olarak hesaplanırken yeniden sulama ile birlikte bu oran % 73,53'e yükselmiştir. Ataem kontrol grubuna ait klorofil A içeriği % 100 kabul edildiğinde %56,3 olarak bulunurken kuraklık stresi ile birlikte % 56,3 olan oran yeniden sulama uygulamasının ardından %76,3'e yükselmiştir. 150-43 mutantında Klorofil A içeriği kuraklık stresi ile birlikte %66,07 olarak belirlenirken yeniden sulama ile bu oran % 103,63'e yükselmiştir. Klorofil B içeriklerine bakıldığında Üstün kontrol için % 100 kabul edilen oran kuraklık stresi ile % 25,3'e kadar düşerken yeniden sulama ile birlikte bu oran % 53,3'e kadar yükselmiştir. 101-15 mutantında kuraklık stresi ile bu oran % 22,6'ya kadar gerilerken yeniden sulamada bu oranda bir iyileşme saptanmadan yine % 22,6 olarak bulunmuştur. Ataem kontrol grubu % 100 kabul edildiğinde kuraklık stresi ile birlikte %25'e düşen oran yeniden sulama sonucu

%38,4'e kadar yükselmiştir. 150-43 mutantında kuraklık stresi ile bu oran % 30,76 iken yeniden sulama ile birlikte % 87,75'e kadar yükselmiştir.

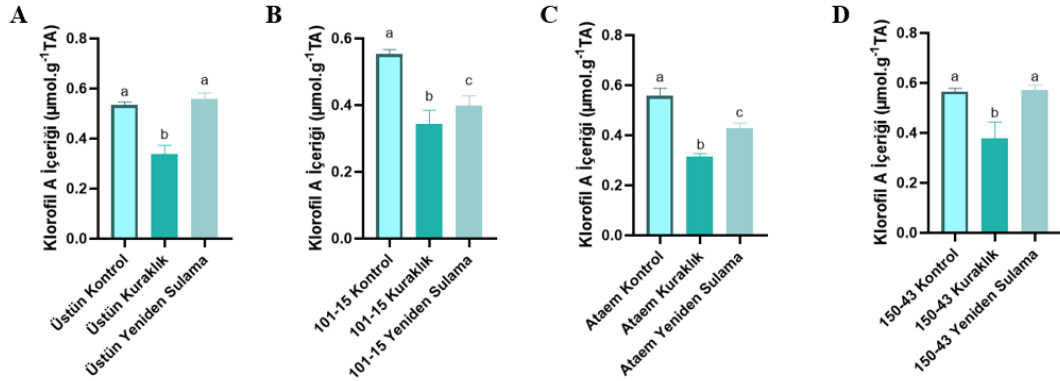
Tablo 4. 3. Üstün,101-15, Ataem ve 150-43 Ortalama Total Klorofil İçeriği

Uygulamalar	Klorofil A		Klorofil B		Total Klorofil	
	mg/gxTA	%	mg/gxTA	%	mg/gxT A	%
Üstün Kontrol	0,53±0,01 ^a	100	0,75±0,1 _a	100	1,28±0,1 ^a	100
Üstün Kuraklık	0,33±0,03 ^b	62,2	0,19±0,05 _b	25,33	0,53±0,0 ₈ ^b	41,40
Üstün Yeniden Sulama	0,55±0,02 ^a	103	0,40±0,1 ^b	53,33	0,95±0,1 _c	74,21
101-15 Kontrol	0,55±0,01 ^a	103	0,68±0,08 _a	90,6	1,23±0,0 ₈ ^a	96,09
101-15 Kuraklık	0,34±0,04 ^b	64,83	0,17±0,03 _b	22,6	0,51±0,0 ₄ ^b	39,84
101-15 Yeniden Sulama	0,39±0,02 ^c	73,58	0,17±0,01 _b	22,6	0,57±0,0 ₂ ^b	44,53
Ataem Kontrol	0,55±0,03 ^a	100	0,52±0,1 _a	100	1,08±0,1 _a	100
Ataem Kuraklık	0,31±0,01 ^b	56,36	0,13±0,01 _b	25	0,44±0,0 ₂ ^b	40,74
Ataem Yeniden Sulama	0,42±0,01 ^c	76,36	0,20±0,05 _c	38,46	0,63±0,0 ₆ ^c	58,33
150-43 Kontrol	0,56±0,01 ^a	101,81	0,49±0,08 _a	94,23	1,06±0,0 ₇ ^a	98,14
150-43 Kuraklık	0,37±0,06 ^b	66,07	0,16±0,01 _b	30,76	0,54±0,0 ₇ ^b	50
150-43 Yeniden Sulama	0,57±0,01 ^a	103,63	0,43±0,06 _a	87,75	1,01±0,0 ₆ ^a	93,51

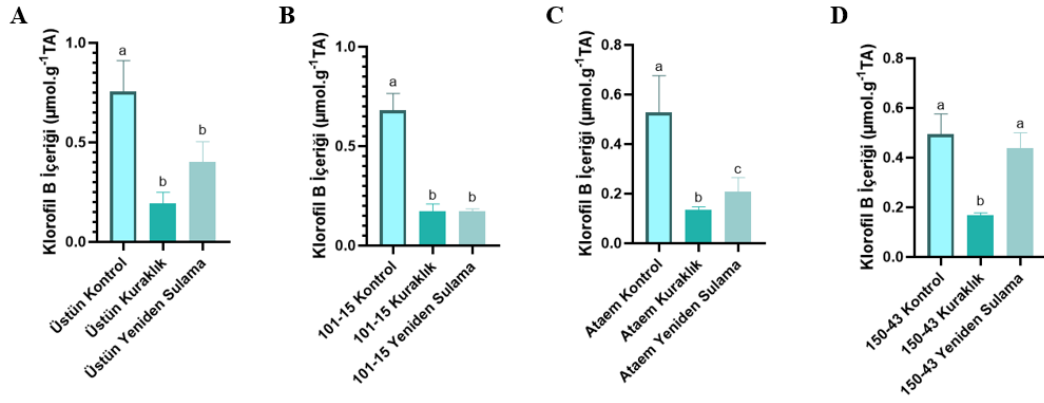
*Aynı harfle gösterilmeyenler, Üstün,101-15, Ataem ve 150-43 için ortalama total klorofil içeriği bakımından aralarındaki farkların, en az 0,05 önemli olduğunu ifade etmektedir. ± Standart Sapma

Total klorofil içerikleri değerlendirildiğinde Üstün kontrol grubu %100 olarak değerlendirildiğinde kuraklık ile %41,4'e düşen oran yeniden sulama ile birlikte %74,2'e kadar yükselmiştir. 101-15 stresine bakıldığında bu oran Üstün bitkilerindeki etkiye benzer şekilde %39,84'e kadar düşmüştür. Yeniden sulama ile birlikte oran %44,53 ile diğer bitkilerin aksine düşük bir oranda artış göstermiştir. Ataem kontrol grubu %100 olarak değerlendirildiğinde kuraklık stresi ile oran %40,74 olarak hesaplanırken yeniden sulama ile bu oran %58,33'e kadar yükselmiştir. 150-43 mutantında kuraklık stresi ile %50 olan oran yeniden sulama ile birlikte %93,51'e yükselerek en fazla artışı göstermiştir.

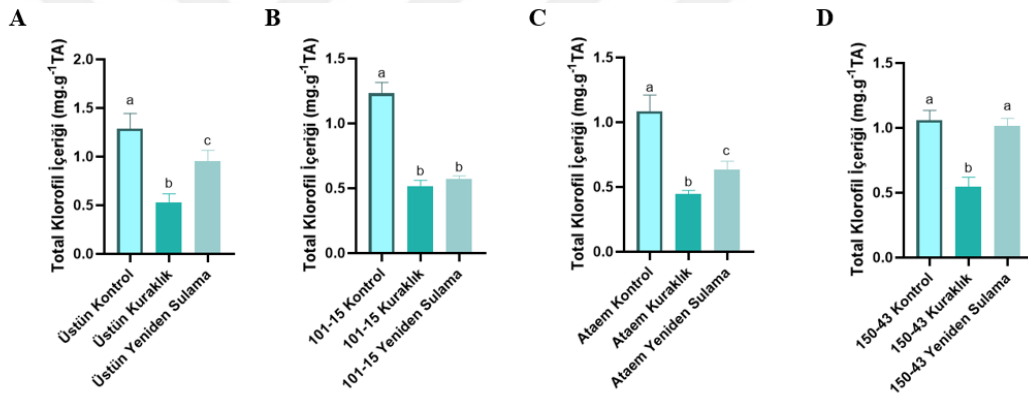
Kuraklık stresi ve yeniden sulama uygulanan Üstün soya çeşidi (A) Mutant 101-15 (B) Ataem soya çeşidi (C) Mutant 150-43 (D) bitkilerinin Klorofil A, Klorofil B ve total klorofil içerikleri Şekil 4.11, Şekil 4.12 ve Şekil 4.13'te gösterilmektedir. Klorofil A ve B içeriği kuraklık stresinde kontrole göre önemli olarak azalmıştır. Yeniden sulamada özellikle A ve B ile total klorofil miktarları mutant 150-43 hattında kontrol seviyesine yükselmiştir. Diğer mutant hat 101-15 ise klorofil oranlarındaki artış kontrolden düşüktür.



Şekil 4.11. Tüm Bitkilere ait Kontrol, Kuraklık ve Yeniden Sulama Klorofil A İçeriğinin Oranı. Üstün soya çeşidi (A) Mutant 101-15 (B) Ataem soya çeşidi (C) Mutant 150-43 (D) bitkilerinin Kontrol, Kuraklık ve Yeniden Sulama sonucundaki Klorofil A içeriklerini gösterilmektedir. (Aynı harfle gösterilmeyenler, Üstün, 101-15, Ataem ve 150-43 için ortalama Klorofil A içeriği bakımından aralarındaki farkların, en az 0,05 önemli olduğunu ifade etmektedir).



Şekil 4.12. Tüm Bitkilere ait Kontrol, Kuraklık ve Yeniden Sulama Klorofil B İçeriğinin Oranı. Üstün soya çeşidi (A) Mutant 101-15 (B) Ataem soya çeşidi (C) Mutant 150-43 (D) bitkilerinin Kontrol, Kuraklık ve Yeniden Sulama sonucundaki Klorofil B içeriklerini gösterilmektedir. (Aynı harfle gösterilmeyenler, Üstün, 101-15, Ataem ve 150-43 için ortalama Klorofil B içeriği bakımından aralarındaki farkların, en az 0,05 önemli olduğunu ifade etmektedir).



Şekil 4.13. Tüm Bitkilere ait Kontrol, Kuraklık ve Yeniden Sulama Total Klorofil İçeriğinin Oranı. Üstün soya çeşidi (A) Mutant 101-15 (B) Ataem soya çeşidi (C) Mutant 150-43 (D) bitkilerinin Kontrol, Kuraklık ve Yeniden Sulama sonucundaki Total klorofil içeriklerini gösterilmektedir. (Aynı harfle gösterilmeyenler, Üstün, 101-15, Ataem ve 150-43 için ortalama Total klorofil içeriği bakımından aralarındaki farkların, en az 0,05 önemli olduğunu ifade etmektedir).

4.2.3. Prolin Konsantrasyon Tayini

Ataem-07 ve Üstün (S04-05) soya çeşitleri ve bu çeşitlere ait mutantların kuraklık stresine yanıt olarak osmoprotektan olarak rol oynayan prolin konsantrasyonları belirlenmiştir. Tablo 4.4'te Üstün, 101-15, Ataem ve 150-43 bitkilerinin ortalama prolin içerikleri ve standart sapma değerleri gösterilmiştir. Üstün kontrol grubunda prolin içeriği 13,13 µmol/g TA olarak hesaplanmıştır. Üstün kuraklık grubunda prolin

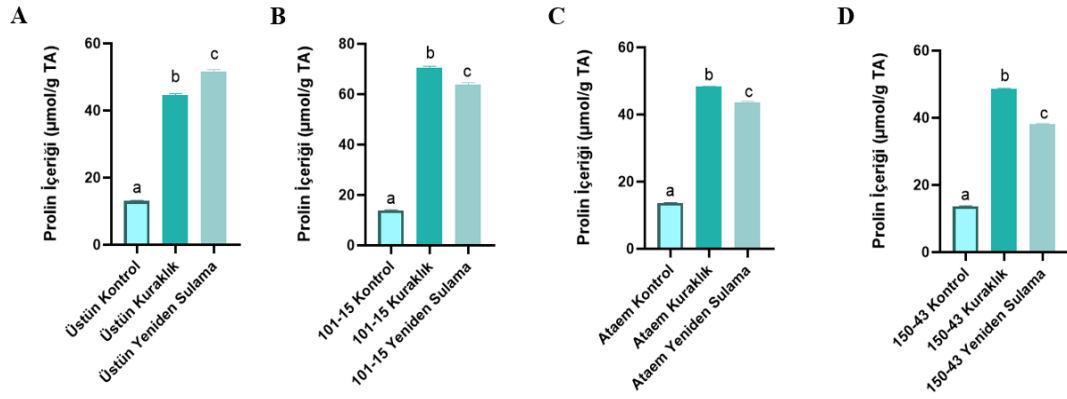
içeriği 44,51 $\mu\text{mol/g}$ TA olmak üzere kontrol grubundan yaklaşık 3,5 kat artmıştır. Üstün yeniden sulama grubunda ise prolin içeriği 51,68 $\mu\text{mol/g}$ TA olarak belirlenmiştir. 101-15 kontrol grubunda prolin içeriği 13,96 $\mu\text{mol/g}$ TA olarak hesaplanırken 101-15 kuraklık grubunda prolin içeriği kontrol grubundan yaklaşık 5 kat fazla olarak 70,35 $\mu\text{mol/g}$ TA hesaplanmıştır. 101-15 yeniden sulama grubunda prolin içeriği 63,91 $\mu\text{mol/g}$ TA olarak belirlenmiştir. Kontrol grupları %100 kabul edildiğinde kuraklıkta en yüksek prolin içeriğine sahip grup 101-15 kuraklık (%457,80) olarak belirlenmiştir. Yeniden sulama ile birlikte prolin içeriğindeki azalma oranı en yüksek 150-43 yeniden sulama (%285,84) grubunda belirlenmiştir.

Tablo 4. 4. Tüm Bitkilere ait Prolin İçerikleri

Uygulamalar	Prolin	
	$\mu\text{mol/g TA}$	%
Üstün Kontrol	13,13 $\pm$ 0,1 ^a	100
Üstün Kuraklık	44,51 $\pm$ 0,4 ^b	338,99
Üstün Yeniden Sulama	51,68 $\pm$ 0,5 ^c	393,60
101-15 Kontrol	13,96 $\pm$ 0,1 ^a	106,32
101-15 Kuraklık	70,35 $\pm$ 0,7 ^b	535,79
101-15 Yeniden Sulama	63,91 $\pm$ 0,7 ^c	486,747
Ataem Kontrol	13,73 $\pm$ 0,06 ^a	100
Ataem Kuraklık	48,33 $\pm$ 0,09 ^b	352
Ataem Yeniden Sulama	43,73 $\pm$ 0,2 ^c	318,49
150-43 Kontrol	13,71 $\pm$ 0,09 ^a	99,85
150-43 Kuraklık	48,58 $\pm$ 0,2 ^b	353,82
150-43 Yeniden Sulama	13,13 $\pm$ 0,1 ^a	100

*Aynı harfle gösterilmeyenler, Üstün,101-15, Ataem ve 150-43 için ortalama prolin içeriği bakımından aralarındaki farkların, en az 0,05 önemli olduğunu ifade etmektedir. $\pm$ Standart Sapma

Elde edilen sonuçlar kuraklık stresine maruz kalan soya bitkilerinde ozmotik düzenleyici maddelerin arttığını göstermektedir (Şekil 4.14). Yeniden sulama grupları arasında en düşük prolin içeriğine sahip grup 150-43 olmuştur.



Şekil 4.14. Tüm Bitkilere ait Kontrol, Kuraklık ve Yeniden Sulama Prolin İçeriğinin Oranı. Üstün soya çeşidi (A) Mutant 101-15 (B) Ataem soya çeşidi (C) Mutant 150-43 (D) bitkilerinin Kontrol, Kuraklık ve Yeniden Sulama sonucundaki Prolin içeriklerini gösterilmektedir. (Aynı harfle gösterilmeyenler, Üstün, 101-15, Ataem ve 150-43 için ortalama Prolin içeriği bakımından aralarındaki farkların, en az 0,05 önemli olduğunu ifade etmektedir).

4.3. RNA EKSTRAKSİYONU VE cDNA SENTEZİ

Üstün ve Ataem soya çeşitleri ile 101-15 ve 150-43 mutant soya bitki yaprakların total RNA izolasyonu sonucunda RNA'nın konsantrasyonu ve saflığı, bir NanoDrop spektrofotometre (Implen NP80) ile ölçülmüştür. Daha sonra RNA örneklerinin agaroz jel elektroforezinde kalitatif analizleri gerçekleştirilmiştir.

4. 4. mRNA SEKANSLAMA

Soyada kuraklık stresine karşı farklı şekilde ifade edilen genlerin (DEG) belirlenmesi için RNA sekanslaması gerçekleştirilmiştir. Çalışma kapsamında 3 tekrarlı olacak şekilde 12 farklı grup için 36 örnek analiz edilmiştir. Aşağıdaki Tablo 4.5 içinde ilgili örneklerin adları, deney grupları, dizileme sonucunda elde edilen okuma sayıları ve bu okumaların ne kadarının genoma hizalandığı yer almaktadır. “Toplam” sütunu numuneden elde edilen toplam okuma sayısını; “Hizalanan” sütunu genoma hizalanan okumaların sayısını; “Hizalama Oranı” sütunu genoma hizalanan okumaların oranını; “Hizalanmayan” genoma hizalanamayan okumaların sayısını; “Q30 Kalite Oranı” ise Q30 ve daha üstünde Phred kalite skoru alan okumaların oranını belirtmektedir. Okumaları soya genomuyla karşılaştırarak, her bir numunenin genomik hizalaması elde edildi ve hizalama oranı yaklaşık %98 olarak hesaplanmıştır.

Tablo 4. 5. RNA dizileme örneklerinin kalite ve hizalama oranları

	Toplam	Hizalanan	Hizalanmayan	Q30 Kalite Oranı	Hizalama Oranı
Üstün Kontrol					
UCA1	194.900.664	190.375.536	4.525.128	94.40%	97.68%
UCA11	190.335.668	189.543.978	791.690	95.12%	99.58%
UCA111	88.428.120	87.102.799	1.325.321	94.19%	98.50%
Üstün Kuraklık					
UDB1	123.474.186	121.963.967	1.510.219	95.46%	98.78%
UDB11	149.530.214	148.776.807	753.407	95.46%	99.50%
UDB111	87.837.262	87.201.127	636.135	95.42%	99.28%
Üstün Yeniden Sulama					
URWC1	72.219.706	71.676.805	542.901	95.33%	99.25%
URWC11	75.927.330	75.392.773	534.557	94.42%	99.30%
URWC111	59.861.786	59.214.298	647.488	95.36%	98.92%
101-15 Kontrol					
101-15CA2	89.994.440	89.122.306	872.134	94.55%	99.03%
101-15CA22	139.468.072	138.492.116	975.956	95.42%	99.30%
101-15CA222	79.873.704	79.290.225	583.479	94.99%	99.27%
101-15 Kuraklık					
101-15DB22	89.023.396	88.332.192	691.204	95.55%	99.22%
101-15DB222	93.085.718	92.156.979	928.739	95.47%	99.00%
101-15DB2	76.057.070	63.871.938	12.185.132	93.36%	83.98%
101-15 Yeniden Sulama					
101-15RWC2	102.817.070	101.278.541	1.538.529	95.26%	98.50%
101-15RWC22	68.939.828	67.690.387	1.249.441	95.28%	98.19%
101-15RWC222	77.112.652	76.249.575	863.077	95.57%	98.88%

Tablo 4. 6. RNA dizileme örneklerinin kalite ve hizalama oranları (devamı)

Ataem Kontrol					
ACA3	162.213.086	161.421.768	791.318	95.55%	99.51%
ACA33	162.282.436	161.788.003	494.433	95.52%	99.70%
ACA333	77.885.652	72.057.665	5.827.987	92.55%	92.52%
Ataem Kuraklık					
ADB3	71.490.758	70.648.590	842.168	92.81%	98.82%
ADB33	151.831.910	150.746.147	1.085.763	95.29%	99.28%
ADB333	93.721.690	91.994.356	1.727.334	95.38%	98.16%
Ataem Yeniden Sulama					
ARWC3	64.558.586	64.275.268	283.318	94.93%	99.56%
ARWC33	71.451.314	71.168.513	282.801	95.48%	99.60%
ARWC333	77.058.486	76.677.560	380.926	94.52%	99.51%
150-43 Kontrol					
150-43A4	82.255.834	81.572.633	683.201	95.33%	99.17%
150-43A44	129.813.730	129.283.638	530.092	95.23%	99.59%
150-43A444	98.703.986	96.502.358	2.201.628	95.17%	97.77%
150-43 Kuraklık					
150-43DB4	86.252.494	85.420.517	831.977	95.50%	99.04%
150-43DB44	85.084.856	84.348.150	736.706	95.43%	99.13%
150-43DB444	68.995.660	68.235.655	760.005	95.37%	98.90%
150-43 Yeniden Sulama					
150-43RWC4	93.404.476	92.853.380	551.096	95.14%	99.41%
150-43RWC44	94.722.478	93.865.153	857.325	92.96%	99.09%
150-43RWC444	184.901.260	184.286.701	614.559	93.63%	99.67%

Şekil 4.15'te ısı grafiği (heatmap), örnekler arasında en fazla varyasyon gösteren ilk 50 genin anlatım profillerini göstermektedir. Isı grafiğinde yer alan örnek ve genler, profil benzerliklerine göre de her iki ekseninde kümelenmiş ve benzerlikler dendrogramlar ile görselleştirilmiştir.

Isı grafiğinin üst kısmında yer alan dendrogramda, örnekler arasında en fazla anlatım varyasyonu gösteren 50 gen dikkate alındığında, örneklerin birbirine ne kadar benzer anlatım profili gösterdiğine göre gruplandırılmıştır. Yakın gruplandırılmış örnekler, daha benzer profil göstermektedir. İdeal olarak, numuneler ana gruplarına göre (kontrol ve deney grupları gibi) birlikte kümelenmesi beklenir. Benzer şekilde, ısı grafiğinin sağ kısmında yer alan dendrogramda, tüm örnekler dikkate alındığında, ilk 50 genin birbirine ne kadar benzer anlatım profili gösterdiğine göre gruplandırılmıştır.

Isı grafiğinde yer alan en fazla varyasyon gösteren ilk 50 genin Üstün, 101-15, Ataem ve 150-43 kuraklık gruplarındaki anlatımlarına ait kat değişimleri belirlenmiştir (Tablo 4.6).



Tablo 4. 7. En fazla varyasyon gösteren ilk 50 genin anlatımlarına ait kat değişimleri

GEN ID/ GEN AİLESİ	Üstün Kuraklık	101-15 Kuraklık	Ataem Kuraklık	150-43 Kuraklık
GLYMA_05G128000 (Chlorophyll A-B binding protein, CAB3)				-0,00075
GLYMA_16G165800 (Photosystem II type I chlorophyll a/b-binding protein, LHCB1-7)	-0,00057	-0,00043		-0,00030
GLYMA_09G231900 (Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor-domain containing protein)	-0,0014	-0,0029		-0,00044
GLYMA_03G131700 (Gibberellin-regulated protein 3, GASA3)		-0,0073		-0,0013
GLYMA_13G160400 (Hydrophobic seed protein)		-0,0024		-0,00057
GLYMA_19G250200 (GDSL Esterase/Lipase)		-0,0031		
GLYMA_03G252700 (GDSL Esterase/Lipase)		-0,0060		-0,00040
GLYMA_04G065600 (Alpha-amylase inhibitor/lipid transfer/seed storage protein domain-containing protein)		-0,0033		-0,00033
GLYMA_17G212200 (Alpha-amylase inhibitor/lipid transfer/seed storage protein domain-containing protein)		-0,0011		
GLYMA_11G098500 (Proline-rich protein 4)		-0,0020		-0,00042
GLYMA_17G259500 (GDSL esterase/lipase EXL3)		-0,0081		-0,00012
GLYMA_13G200300 (Proline-rich protein 4)		-0,02		-0,00082
GLYMA_07G038500 (Germin-like protein, GER8)	-0,00074	-0,00060		-0,0012
GLYMA_16G007700 (Germin-like protein, GER8)	-0,00086	-0,0022		-0,00094
GLYMA_06G193800 (Gibberellin-regulated protein, GASA11)	-0,00071	-0,0012		-0,00052
GLYMA_04G169600 (Gibberellin-regulated protein, GASA5)	-0,00029	-0,00069		-0,00029
GLYMA_05G007100 (Carbonic anhydrase,chloroplastic)	-0,0069	-0,0012		-0,0048
GLYMA_03G238800 (Predicted NADPH-dependent aldehyde reductase 1, chloroplastic)	+4003,458	+3294,17		+6720,12

Tablo 4. 8. En fazla varyasyon gösteren ilk 50 genin anlatımlarına ait kat değişimleri(devamı)

GLYMA_08G171400 (Cysteine-rich and transmembrane domain-containing protein B)	+457,38	+1134,66	+40,46	+654,10
GLYMA_15G256000 (Cysteine-rich and transmembrane domain-containing protein WIH1)	+919,69	+860,65	+151,47	+469,91
GLYMA_07G139700 (Tau class glutathione S-transferase, GSTU23)	+889,13		+79,70	+269,69
GLYMA_20G205800 (Protease inhibitor)	+10814,53	+281,17		+159,95
GLYMA_15G211500 (Kunitz type trypsin inhibitör 104)	+2471,91	+194,59	+78,53	+327,40
GLYMA_01G217600 (Osmotin-like protein, acidic OLPa)	+14756,06	+3099,46		+3116,50
GLYMA_08G235400 (Kunitz trypsin inhibitor family protein)	+14177,57	+2814,53		+2508,04
GLYMA_13G278000 (Defensin-like protein)	+111718,6	+1544,08	+11089,82	+5324,05
GLYMA_11G170300 (Asparagine synthetase)	+3509,432	+4018,29		+3000,64
GLYMA_18G061100 (Asparagine synthetase 1-AS1)	+1660,54	+1157,59	+439,57	+1479,19
GLYMA_18G231500 (Bowman-Birk type protease inhibitör, BBI-1)	+4520,99	+1417,74	+591,01	+9146,76
GLYMA_11G180800 (Secoisolariciresinol dehydrogenase-like)	+3149,94	+5055,69	+285,10	+4287,23
GLYMA_08G156600 (Uncharacterized)	+1935,86	+4579,03	+222,06	+3629,17
GLYMA_20G158500 (Low-temperature-induced 65 kDa protein)	+406,75	+922,88	+87,10	+1833,76
GLYMA_11G067900 (Uncharacterized)	+5836,80	+5531,52	+1207,93	+13950,82
GLYMA_01G204800 (Expansin-like B1)	+416,52	+1074,93	+337,83	+3817,25
GLYMA_17G164200 (Seed maturation protein PM35)	+323,77	+211,98	+188,74	+3700,11
GLYMA_17G128000 (Malate synthase)	+1121,49	+563,08		+1918,22
GLYMA_17G147600 (Expansin-like B1)	+5311,80	+3070,61		+15649,23
GLYMA_11G024100 (Putative glutathione peroxidase)	+403,98	+622,28	+83,22	+757,67
GLYMA_14G145900 (Probable E3 ubiquitin-protein ligase HERC4)	+3032,09	+3002,71	+487,37	+2298,27
GLYMA_15G206800 (Class V chitinase)	+13475,97	+5572,79	+870,60	+7680,55

Tablo 4. 9. En fazla varyasyon gösteren ilk 50 genin anlatımlarına ait kat değişimleri (devamı)

GLYMA_19G227800 (Galactinol synthase-2)	+2147,80	+2273,64	+308,00	+1566,42
GLYMA_13G363300 (Seed maturation protein PM30)	+6363,19	+5326,52	+1920,57	+12833,04
GLYMA_05G065800 (Expansin-like B1)	+4014,41	+4004,17		+13312,49
GLYMA_09G185500 (Dehydrin-like protein, Dehydrin)	+89634,28	+30959,39	+10187,76	+29759,22
GLYMA_07G090400 (LEA-2-D11, Dehydrin)	+3148,72	+1962,83	+329,30	+13541,36
GLYMA_08G160800 (Seed maturation protein, PM41)	+648,25	+3790,37		+3171,62

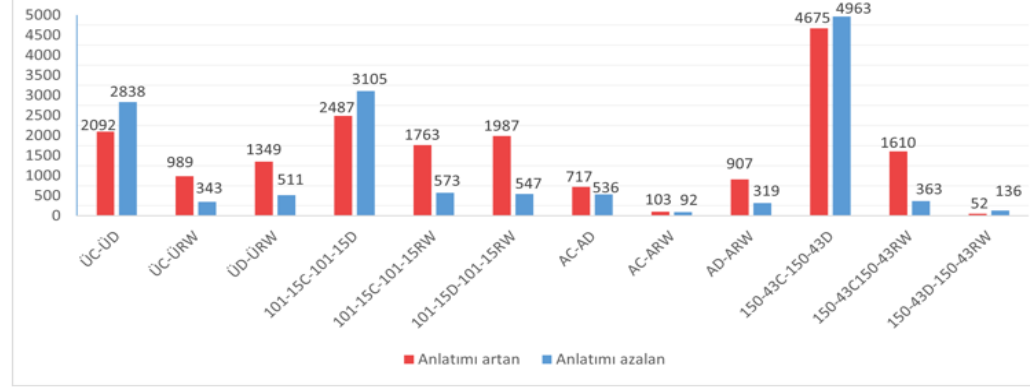
Daha sonra, kuraklık stresine ve yeniden sulamaya maruz bırakılan soya yapraklarında farklı şekilde ifade edilen genlerin analizi gerçekleştirildi. Bu analizlerde p-value 0,005 olarak kabul edilip önemli ölçüde değişmiş genler belirlendi (Şekil 4.16). Üstün kontrol grubuna kıyasla Üstün kuraklıkta 2092 genin anlatımında artış, 2838 genin anlatımında azalış bulunurken, Üstün kuraklık-Üstün yeniden sulama kıyasında 1349 gende anlamlı artış 511 gende anlamlı azalma elde edilmiştir. Üstün kontrole kıyasla üstün yeniden sulamada 989 gende anlamlı bir artış 343 gende anlamlı bir azalma bulunmuştur. 101-15 kontrole kıyasla 101-15 kuraklıkta 2487 genin anlatımında artış gözlemlenirken 3105 genin anlatımında azalma saptanmıştır. 101-15 kuraklık grubuna kıyasla 101-15 yeniden sulamada 1987 genin anlatımında anlamlı artış 547 genin anlatımında düşüş bulunurken, 101-15 kontrole kıyasla 101-15 yeniden sulamada 1763 gen için anlatımında artış 573 gen anlamlı seviyede azalma elde edilmiştir. Ataem kontrole kıyasla Ataem kuraklıkta 717 genin anlatımında artış, 536 genin anlatımında düşüş saptanmıştır. Ataem kuraklık grubuna kıyasla Ataem yeniden sulamada 907 gende anlamlı artış 319 genin anlatımında düşüş bulunmuştur. Ataem kontrole kıyasla Ataem yeniden sulamada 103 gende anlamlı seviyede anlatım artışı, 92 genin anlatımında düşüş bulunmuştur. 150-43 kontrole kıyasla 150-43 kuraklıkta 4675 genin anlatımında artış, 4963 genin anlatımında düşüş bulunmuştur. 150-43 kontrole 150-43 yeniden sulamada 1610 gende anlatım artışı 363 genin anlatımında düşüş elde edilmiştir. 150-43 kuraklık grubuna kıyasla 150-43 yeniden sulamada 52 genin anlatımında artış 136 genin anlatımında düşüş bulunmuştur. Bu sonuçlar doğrultusunda kontrole kıyasla kuraklık uygulamalarında mutant bitkilerdeki DEG

sayısının kökenlendiği bitkilerden daha fazla sayıda olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca her kıyaslama için Venn diyagramları ile birlikte ortak olan DEG'ler tespit edilmiştir.

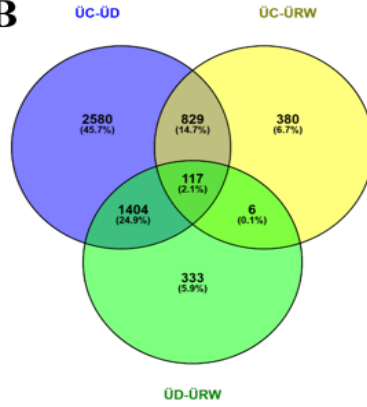
DEG'lerin daha detaylı analizi için, DEG'leri Venn diyagramı kullanarak genotip ilişkili ve kuraklık ilişkili genlerine göre farklı gruplara ayrılmıştır. Tüm gruplar arasında 150-43 kuraklık en fazla DEG sayısına sahip grup olarak belirlenmiştir. Üstün ve Ataem gruplarına ait Venn diyagramı değerlendirildiğinde Üstün kuraklık grubu Ataem kuraklık grubuna kıyasla daha fazla DEG içermektedir. Üstün mutanti olan 101-15'e ait Venn diyagramına bakıldığında tüm kıyaslar için Üstüne göre daha fazla DEG elde edilmiştir. Ataem ve mutanti olan 150-43'e ait Venn diyagramları ele alındığında kuraklık uygulamasında mutant için DEG sayısının oldukça yüksek olduğu tespit edilirken yeniden sulama için DEG sayılarında azalma tespit edilmiştir.



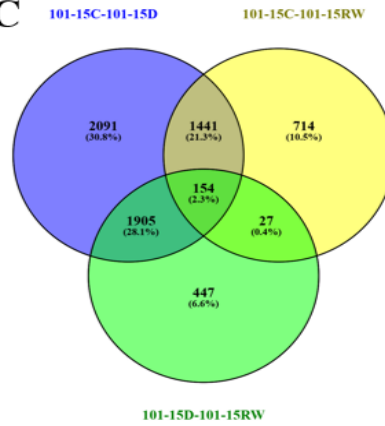
A



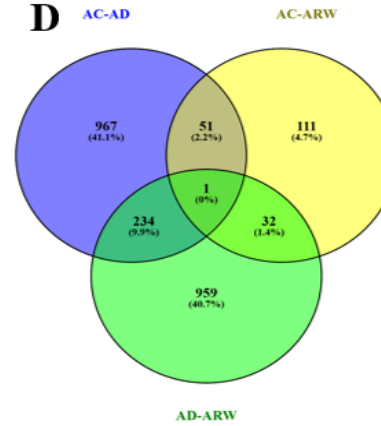
B



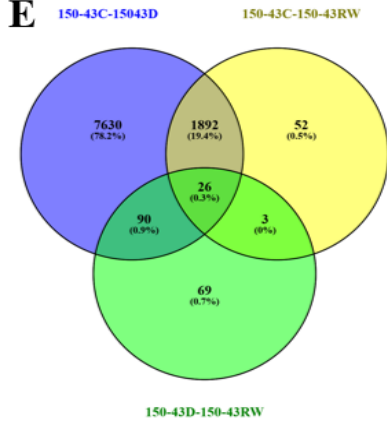
C



D



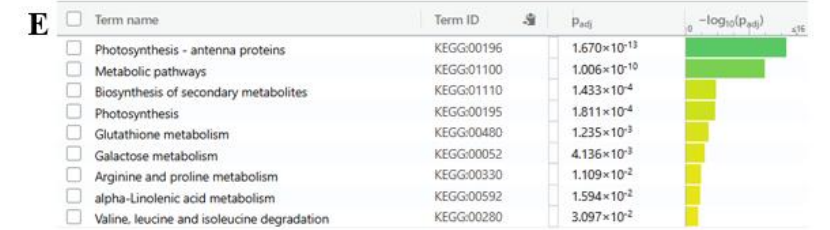
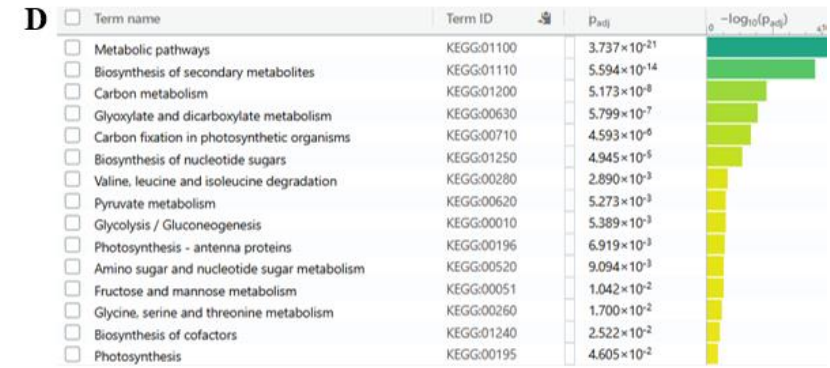
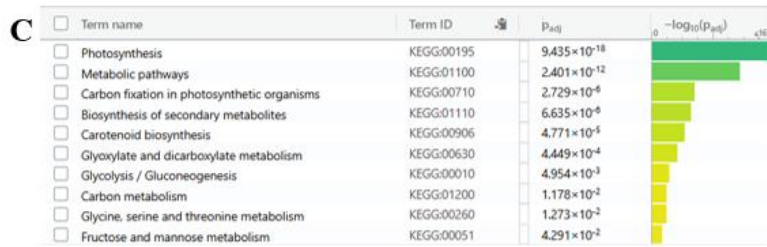
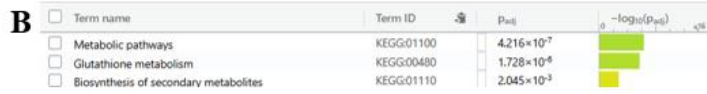
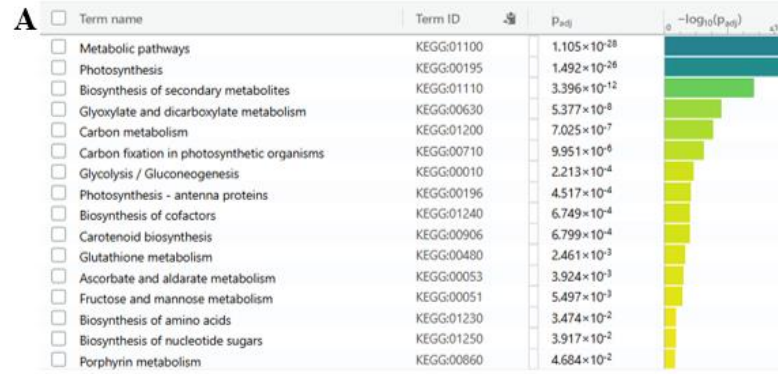
E



Şekil 4.16. Kontrol, kuraklık ve yeniden sulama için transkriptomik analizler. A) Soya bitkilerinde tüm kıyaslamalara ait artan ve azalan DEG sayısı B) Üstün kontrol(C)-kuraklık (D) ve yeniden sulama (RW) uygulamalarındaki DEG'ler için Venn diyagramı C)101-15 kontrol(C)-kuraklık (D) ve yeniden sulama (RW) uygulamalarındaki DEG'ler için Venn diyagramı D)Ataem kontrol(C)-kuraklık (D) ve yeniden sulama (RW) uygulamalarındaki DEG'ler için Venn diyagramı B)150-43 kontrol(C)-kuraklık (D) ve yeniden sulama (RW) uygulamalarındaki DEG'ler için Venn diyagramı

4.4.1. GO ve KEGG İle DEG'lerin Fonksiyonel Zenginleştirme Analizi

Soyada kuraklık stresine yanıt olarak farklı şekilde ifade edilen genleri analiz etmek amacıyla, kuraklık stresi tarafından uyarılan genlerin başlıca işlevlerini vurgulayan gen ontolojisi (GO) ve KEGG analizleri gerçekleştirildi. GO zenginleştirme analizi, biyolojik süreç (BP), moleküler fonksiyon (MF) veya hücresel bileşen (CC) terimlerine ayrılarak gerçekleştirildi. Soyada kuraklığa duyarlı genlerin çoğu, 'hücresel süreç' ve 'metabolik süreç' gibi BP terimleri ile 'bağlayıcı' ve 'katalitik aktivite' gibi MF kategorileri açısından önemli ölçüde zenginleştirildi. Birkaç CC terimi esas olarak 'hücre', 'hücre parçası', 'organel' ve 'membran' olarak karakterize edildi. Elde edilen transkriptomik verilere dayanarak kuraklık stresi için KEGG yolları belirlenmiştir. KEGG analizi özellikle metabolik yollar başta olmak üzere karbon metabolizması, fotosentez, sekonder metabolit biyosentezi, glutatyon metabolizması gibi yolların kuraklık stresinde rol oynadığı bulunmuştur. Arjinin ve prolin metabolizması, Glikoliz ve glukoneojenez yolları yalnızca Ataem kuraklık grubunda tespit edilmiştir. Glikosilat- dekarboksilat yolları ise Üstün kuraklık, 101-15 kuraklık ve 150-43 kuraklık gruplarında tespit edilmiştir (Şekil 4.17 ve Şekil 4.18).



Şekil 4. 17. Üstün ve 101-15 için KEGG analizleri. A) Üstün kontrol-Üstün kuraklık kıyaslamasındaki KEGG yolları B) Üstün kontrol-Üstün yeniden sulama kıyaslamasındaki KEGG yolları C) Üstün kuraklık-Üstün yeniden sulama kıyaslamasındaki KEGG yolları D) 101-15 kontrol-101-15 kuraklık kıyaslamasındaki KEGG yolları E) 101-15 kontrol-101-15 yeniden sulama kıyaslamasındaki KEGG yolları F) 101-15 kuraklık-101-15 yeniden sulama kıyaslamasındaki KEGG yolları



A

☐ Term name	Term ID		P _{adj}	$-\log_{10}(P_{adj})$
☐ Metabolic pathways	KEGG:01100		5.176×10^{-5}	
☐ Glutathione metabolism	KEGG:00480		7.608×10^{-3}	
☐ Glycolysis / Gluconeogenesis	KEGG:00010		1.002×10^{-2}	

B

☐ Term name	Term ID		P _{adj}	$-\log_{10}(P_{adj})$
☐ Cutin, suberin and wax biosynthesis	KEGG:00073		3.340×10^{-3}	
☐ Fatty acid elongation	KEGG:00062		2.568×10^{-2}	
☐ Motor proteins	KEGG:04814		3.504×10^{-2}	

C

☐ Term name	Term ID		P _{adj}	$-\log_{10}(P_{adj})$
☐ Photosynthesis	KEGG:00195		1.094×10^{-18}	
☐ Metabolic pathways	KEGG:01100		3.720×10^{-12}	
☐ Photosynthesis - antenna proteins	KEGG:00196		1.012×10^{-11}	
☐ Carbon metabolism	KEGG:01200		7.931×10^{-11}	
☐ Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	KEGG:00630		7.098×10^{-9}	
☐ Porphyrin metabolism	KEGG:00860		2.128×10^{-5}	
☐ Carbon fixation in photosynthetic organisms	KEGG:00710		1.398×10^{-4}	
☐ Biosynthesis of secondary metabolites	KEGG:01110		1.526×10^{-4}	
☐ Proteasome	KEGG:03050		8.187×10^{-4}	
☐ Biosynthesis of cofactors	KEGG:01240		1.008×10^{-3}	
☐ Protein processing in endoplasmic reticulum	KEGG:04141		2.240×10^{-3}	
☐ Fructose and mannose metabolism	KEGG:00051		2.324×10^{-3}	
☐ Glycolysis / Gluconeogenesis	KEGG:00010		3.670×10^{-3}	
☐ Phagosome	KEGG:04145		1.104×10^{-2}	
☐ beta-Alanine metabolism	KEGG:00410		1.370×10^{-2}	
☐ Biosynthesis of amino acids	KEGG:01230		1.486×10^{-2}	
☐ Oxidative phosphorylation	KEGG:00190		1.558×10^{-2}	
☐ Pyruvate metabolism	KEGG:00620		2.356×10^{-2}	
☐ Valine, leucine and isoleucine degradation	KEGG:00280		2.570×10^{-2}	
☐ Glutathione metabolism	KEGG:00480		3.249×10^{-2}	

D

☐ Term name	Term ID		P _{adj}	$-\log_{10}(P_{adj})$
☐ Fatty acid degradation	KEGG:00071		2.314×10^{-5}	
☐ Valine, leucine and isoleucine degradation	KEGG:00280		5.132×10^{-5}	
☐ Arginine and proline metabolism	KEGG:00330		9.400×10^{-5}	
☐ Biosynthesis of secondary metabolites	KEGG:01110		2.498×10^{-4}	
☐ beta-Alanine metabolism	KEGG:00410		7.989×10^{-4}	
☐ Alanine, aspartate and glutamate metabolism	KEGG:00250		1.304×10^{-3}	
☐ Metabolic pathways	KEGG:01100		1.398×10^{-3}	
☐ Glutathione metabolism	KEGG:00480		5.231×10^{-3}	
☐ Galactose metabolism	KEGG:00052		7.983×10^{-3}	
☐ Ascorbate and aldarate metabolism	KEGG:00053		1.341×10^{-2}	
☐ Protein processing in endoplasmic reticulum	KEGG:04141		2.834×10^{-2}	
☐ alpha-Linolenic acid metabolism	KEGG:00592		3.298×10^{-2}	

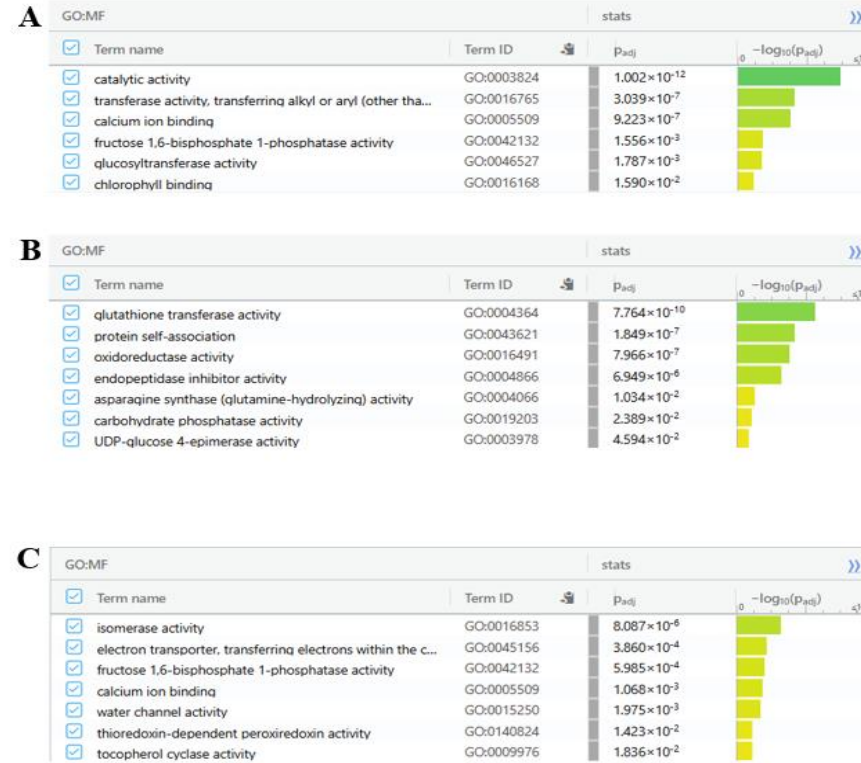
E

☐ Term name	Term ID		P _{adj}	$-\log_{10}(P_{adj})$
☐ Flavonoid biosynthesis	KEGG:00941		2.077×10^{-2}	
☐ Isoflavonoid biosynthesis	KEGG:00943		4.280×10^{-2}	

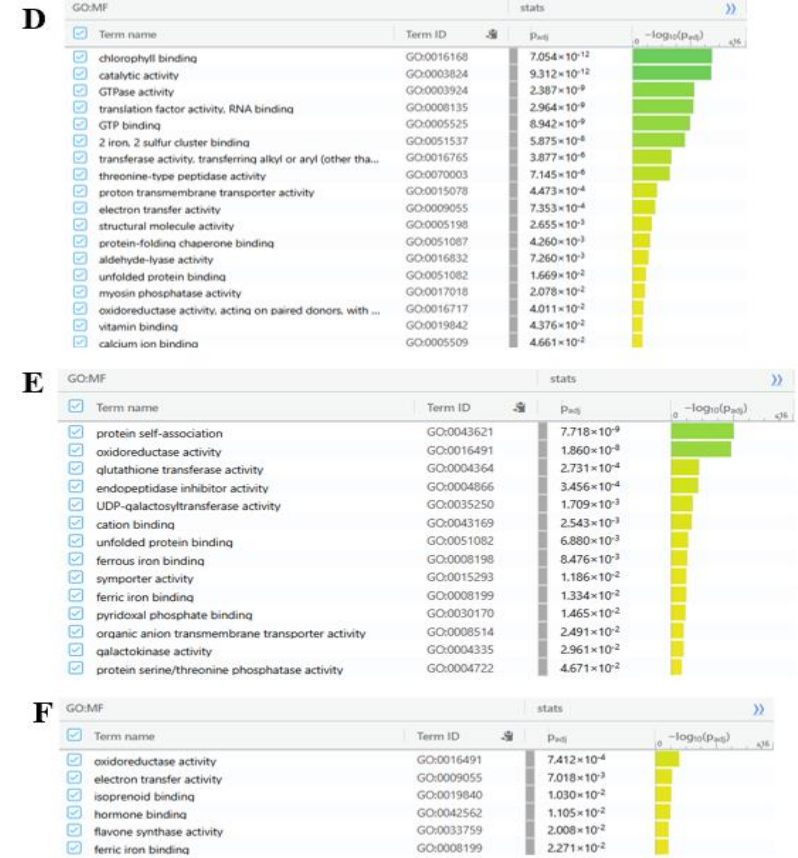
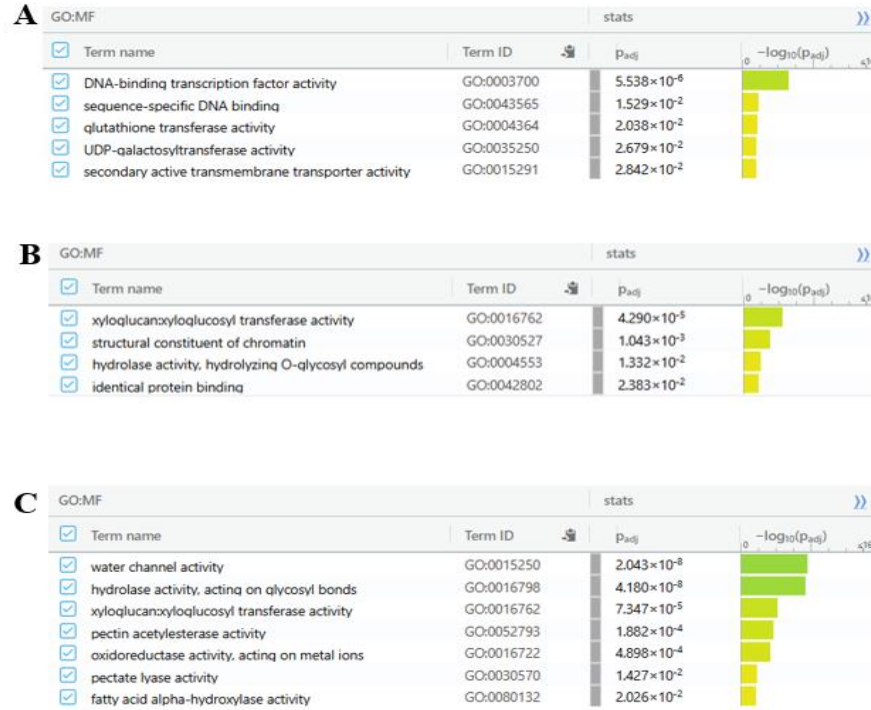
Şekil 4.18. Ataem ve 150-43 için KEGG analizleri. A) Ataem kontrol-Ataem kuraklık kıyaslamasındaki KEGG yolakları B) Ataem kuraklık-Ataem yeniden sulama kıyaslamasındaki KEGG yolakları C) 150-43 kontrol-10-43 kuraklık kıyaslamasındaki KEGG yolakları D) 150-43 kontrol-150-43 yeniden sulama kıyaslamasındaki KEGG yolakları E) 150-43 kuraklık-150-43 yeniden sulama kıyaslamasındaki KEGG yolakları

GO:MF analizlerine bakıldığında Üstün ve 101-15 kuraklık için ilk sırada yer alan moleküler fonksiyon katalitik aktivite olurken, Ataem kuraklıkta DNA-binding transkripsiyon faktör aktivitesi, 150-43 kuraklıkta ise klorofil bağlanması ilk sırada yer almıştır (Şekil 4.19 ve Şekil 4.20). GO:BP analizlerine bakıldığında Ataem kuraklık ve 101-15 kuraklık için ilk iki sırada fotosentez ve küçük molekül metabolik süreçleri yer almıştır. Ataem kuraklık için ilk sırada salisilik asit biyosentezi bulunurken 150-43 kuraklık için ilk sırada fotosentez yer almaktadır (Şekil 4.21 ve Şekil 4.22). GO:CC analizleri tüm bitkiler için kontrol, kuraklık ve yeniden sulama uygulamalarında rol oynayan hücre, organel ve membran olarak karakterize edildi. Üstün ve 101-15 için ilk sıralarda fotosentez ile ilişkili hücresel bileşenler tespit edilmiştir. Bunlara ek olarak peroksizom ve NADPH dehidrogenaz gibi antioksidan savunma sisteminde rol oynayan hücresel bileşenler de bulunmuştur (Şekil 4.23).

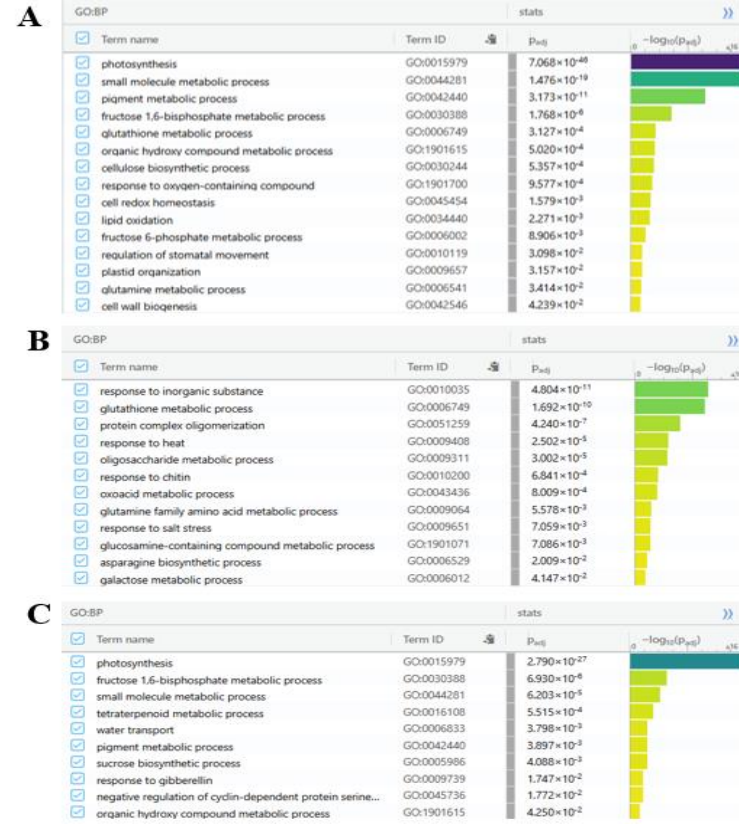
Diğer bitki gruplarından farklı olarak Ataem yeniden sulamada hücre duvarı, komşu bitki hücreleri arasındaki hücre duvarlarına gömülü olarak bulunan plasmodesmata gibi hücre duvarı bileşenlerinin yanı sıra mikrotübül gibi hücre iskeletini oluşturan yapılar, kinesin gibi taşıyıcı motor proteinler, nükleolous ve nükleozom gibi hücresel bileşenler tespit edilmiştir. 150-43 kuraklık grubunda ilk sırada kloroplast yer alırken peroksizomlar, glioksisomlar, hidrojenozomlar gibi mikrobody ailesinin üyeleri bulunmaktadır (Şekil 4.24).



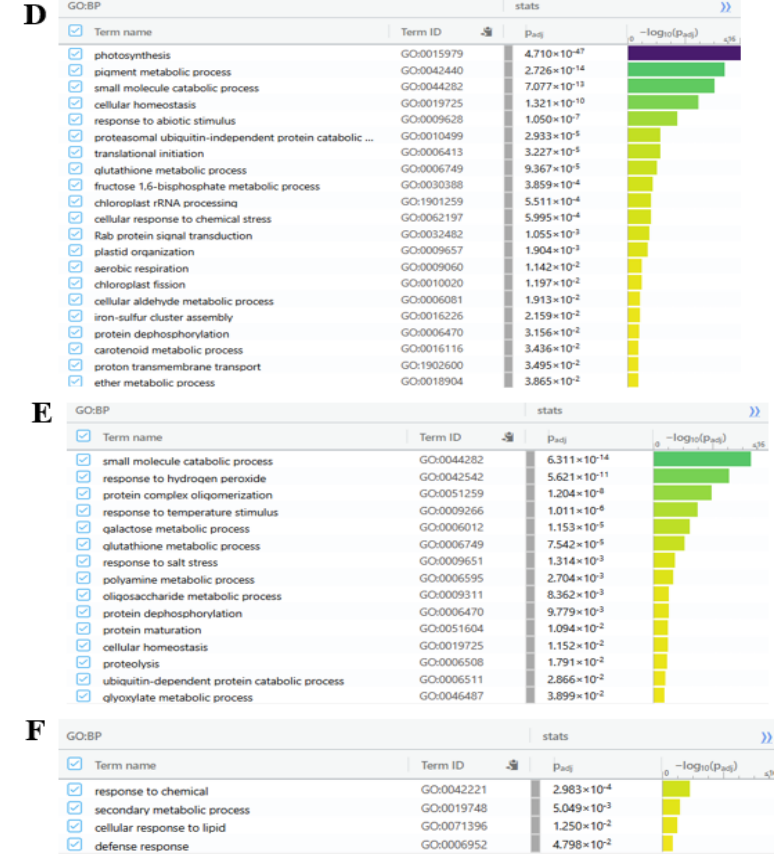
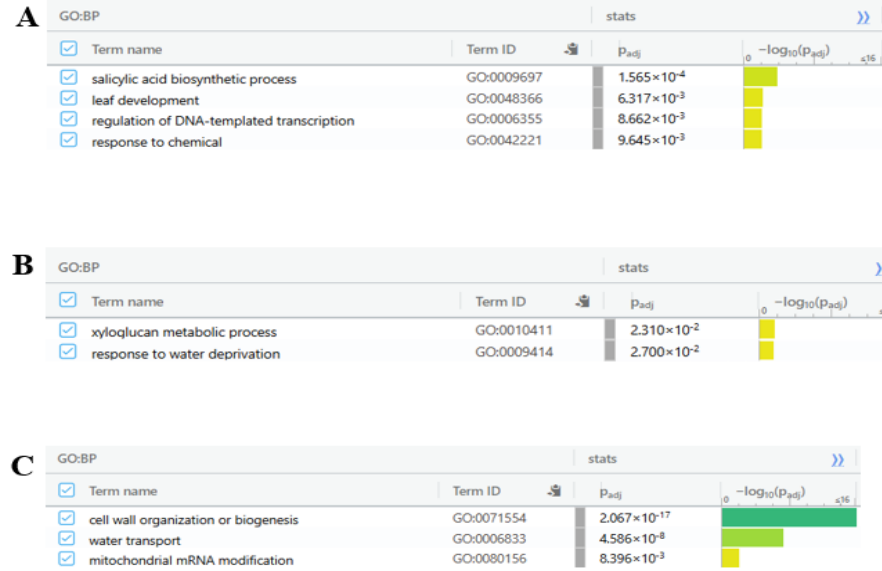
Şekil 4.19. Üstün ve 101-15 için GO:MF analizleri. A) Üstün kontrol-Üstün kuraklık kıyaslamasındaki moleküler fonksiyonlar B) Üstün kontrol-Üstün yeniden sulama kıyaslamasındaki moleküler fonksiyonlar C) Üstün kuraklık-Üstün yeniden sulama kıyaslamasındaki moleküler fonksiyonlar D) 101-15 kontrol-101-15 kuraklık kıyaslamasındaki moleküler fonksiyonlar E) 101-15 kontrol-101-15 yeniden sulama kıyaslamasındaki moleküler fonksiyonlar F) 101-15 kuraklık-101-15 yeniden sulama kıyaslamasındaki moleküler fonksiyonlar



Şekil 4.20. Ataem ve 150-43 için GO:MF analizleri. A) Ataem kontrol-Ataem kuraklık kıyaslamasındaki moleküler fonksiyonlar B) Ataem kontrol-Ataem yeniden sulama kıyaslamasındaki moleküler fonksiyonlar C) Ataem kuraklık-Ataem yeniden sulama kıyaslamasındaki moleküler fonksiyonlar D) 150-43 kontrol-150-43 kuraklık kıyaslamasındaki moleküler fonksiyonlar E) 150-43 kontrol-150-43 yeniden sulama kıyaslamasındaki moleküler fonksiyonlar F) 150-43 kuraklık-150-43 yeniden sulama kıyaslamasındaki moleküler fonksiyonlar



Şekil 4.21. Üstün ve 101-15 için GO:BP analizleri. A) Üstün kontrol-Üstün kuraklık kıyaslamasındaki biyolojik süreçler B) Üstün kontrol-Üstün yeniden sulama kıyaslamasındaki biyolojik süreçler C) Üstün kuraklık-Üstün yeniden sulama kıyaslamasındaki biyolojik süreçler D) 101-15 kontrol-101-15 kuraklık kıyaslamasındaki biyolojik süreçler E) 101-15 kontrol-101-15 yeniden sulama kıyaslamasındaki biyolojik süreçler F) 101-15 kuraklık-101-15 yeniden sulama kıyaslamasındaki biyolojik süreçler



Şekil 4.22. Ataem ve 150-43 için GO:BP analizleri. A) Ataem kontrol-Ataem kuraklık kıyaslamasındaki biyolojik süreçler B) Ataem kontrol-Ataem yeniden sulama kıyaslamasındaki biyolojik süreçler C) Ataem kuraklık-Ataem yeniden sulama kıyaslamasındaki biyolojik süreçler D) 150-43 kontrol-150-43 kuraklık kıyaslamasındaki biyolojik süreçler E) 150-43 kontrol-150-43 yeniden sulama kıyaslamasındaki biyolojik süreçler F) 150-43 kuraklık-150-43 yeniden sulama kıyaslamasındaki biyolojik süreçler

A GO:CC stats

☒ Term name	Term ID	P _{adj}	$-\log_{10}(P_{adj})$
☒ chloroplast	GO:0009507	8.500×10^{-40}	
☒ photosystem II	GO:0009523	1.440×10^{-27}	
☒ microbody	GO:0042579	4.673×10^{-5}	
☒ extrinsic component of membrane	GO:0019898	8.091×10^{-5}	
☒ NAD(P)H dehydrogenase complex (plastoquinone)	GO:0010598	1.541×10^{-4}	

B GO:CC stats

☒ Term name	Term ID	P _{adj}	$-\log_{10}(P_{adj})$
☒ chloroplast	GO:0009507	4.093×10^{-51}	
☒ photosystem II oxygen evolving complex	GO:0009654	1.015×10^{-21}	
☒ extrinsic component of membrane	GO:0019898	4.708×10^{-13}	
☒ NAD(P)H dehydrogenase complex (plastoquinone)	GO:0010598	6.732×10^{-10}	

C GO:CC stats

☒ Term name	Term ID	P _{adj}	$-\log_{10}(P_{adj})$
☒ chloroplast	GO:0009507	2.973×10^{-37}	
☒ photosystem II oxygen evolving complex	GO:0009654	1.081×10^{-8}	
☒ extrinsic component of membrane	GO:0019898	6.107×10^{-5}	
☒ NAD(P)H dehydrogenase complex (plastoquinone)	GO:0010598	3.337×10^{-4}	
☒ microbody	GO:0042579	8.025×10^{-4}	
☒ external encapsulating structure	GO:0030312	1.631×10^{-3}	
☒ trans-Golgi network	GO:0005802	1.764×10^{-2}	

D GO:CC stats

☒ Term name	Term ID	P _{adj}	$-\log_{10}(P_{adj})$
☒ photosystem I	GO:0009522	1.731×10^{-21}	
☒ plastoglobule	GO:0010287	7.999×10^{-13}	
☒ autophagosome	GO:0005776	1.314×10^{-2}	
☒ peroxisome	GO:0005777	1.793×10^{-2}	

E GO:CC stats

☒ Term name	Term ID	P _{adj}	$-\log_{10}(P_{adj})$
☒ plastid	GO:0009536	2.962×10^{-30}	
☒ cell wall	GO:0005618	5.146×10^{-17}	
☒ NAD(P)H dehydrogenase complex (plastoquinone)	GO:0010598	7.033×10^{-9}	
☒ photosystem II oxygen evolving complex	GO:0009654	1.189×10^{-8}	
☒ plasmodesma	GO:0009506	1.276×10^{-4}	
☒ extracellular region	GO:0005576	2.913×10^{-4}	
☒ extrinsic component of membrane	GO:0019898	1.819×10^{-3}	
☒ cytochrome b6f complex	GO:0009512	1.190×10^{-2}	
☒ microtubule	GO:0005874	1.308×10^{-2}	

Şekil 4.23. Üstün ve 101-15 için GO:CC analizleri. A) Üstün kontrol-Üstün kuraklık kıyaslamasındaki hücresel bileşenler B) Üstün kuraklık-Üstün yeniden sulama kıyaslamasındaki hücresel bileşenler C) 101-15 kontrol-101-15 kuraklık kıyaslamasındaki hücresel bileşenler D) 101-15 kontrol-101-15 yeniden sulama kıyaslamasındaki hücresel bileşenler E) 101-15 kuraklık-101-15 yeniden sulama kıyaslamasındaki hücresel bileşenler

A GO:CC stats

☒ Term name	Term ID	P _{adj}	$-\log_{10}(P_{adj})$
☒ cell wall	GO:0005618	7.748×10^{-4}	
☒ apoplast	GO:0048046	1.122×10^{-3}	
☒ nucleosome	GO:0000786	8.099×10^{-3}	

B GO:CC stats

☒ Term name	Term ID	P _{adj}	$-\log_{10}(P_{adj})$
☒ cell wall	GO:0005618	2.186×10^{-27}	
☒ extracellular region	GO:0005576	5.916×10^{-11}	
☒ plasmodesma	GO:0009506	1.042×10^{-7}	
☒ nucleolus	GO:0005730	3.732×10^{-3}	
☒ microtubule	GO:0005874	9.286×10^{-3}	
☒ preribosome	GO:0030684	3.342×10^{-2}	
☒ kinesin complex	GO:0005871	4.335×10^{-2}	

C GO:CC stats

☒ Term name	Term ID	P _{adj}	$-\log_{10}(P_{adj})$
☒ chloroplast	GO:0009507	5.651×10^{-105}	
☒ photosystem II oxygen evolving complex	GO:0009654	1.268×10^{-13}	
☒ proteasome complex	GO:0000502	1.107×10^{-7}	
☒ microbody	GO:0042579	7.251×10^{-5}	
☒ proton-transporting two-sector ATPase complex	GO:0016469	1.259×10^{-4}	
☒ extrinsic component of membrane	GO:0019898	7.314×10^{-3}	
☒ autophagosome	GO:0005776	1.171×10^{-2}	
☒ NAD(P)H dehydrogenase complex (plastoquinone)	GO:0010598	1.788×10^{-2}	
☒ endosome	GO:0005768	1.906×10^{-2}	
☒ respirasome	GO:0070469	2.355×10^{-2}	

D GO:CC stats

☒ Term name	Term ID	P _{adj}	$-\log_{10}(P_{adj})$
☒ peroxisome	GO:0005777	1.050×10^{-5}	
☒ cytosol	GO:0005829	2.159×10^{-4}	
☒ autophagosome	GO:0005776	4.418×10^{-3}	
☒ SCF ubiquitin ligase complex	GO:0019005	1.227×10^{-2}	
☒ VCP-NPL4-UFD1 AAA ATPase complex	GO:0034098	1.995×10^{-2}	

Şekil 4.24. Ataem ve 150-43 için GO:CC analizleri. A) Ataem kontrol-Ataem yeniden sulama kıyaslamasındaki hücresel bileşenler B) Ataem kuraklık-Ataem yeniden sulama kıyaslamasındaki hücresel bileşenler C) 150-43 kontrol-150-43 kuraklık kıyaslamasındaki hücresel bileşenler D) 150-43 kontrol-150-43 yeniden sulama kıyaslamasındaki hücresel bileşenler

Kuraklık stresi ile ilişkili ABA biyosentezi, ABA sinyal iletimi, askorbat ve glutatyon mekanizmalarında rol oynayan genleri belirlemek için DEG'ler analiz edildi. Bu genlerin Üstün, 101-15, Ataem ve 150-43 kuraklık gruplarındaki anlatım değişimleri belirlendi (Tablo 4.7).

Tablo 4. 10. ABA biyosentezi, ABA sinyal iletimi, askorbat ve glutatyon mekanizmaları ile ilişkili genlerin Üstün,101-15, Ataem ve 150-43 kuraklık gruplarındaki anlatım değişimi

GEN ID/ GEN AİLESİ	Üstün Kuraklık	101-15 Kuraklık	Ataem Kuraklık	150-43 Kuraklık
GLYMA_15G006800 (WRKY)	-0,26			-0,2
GLYMA_08G176300 (NCED)	+41,77	+65,1	+16,73	-0,13
GLYMA_15G250100 (NCED)	+31,83	+56,28	+26,68	
GLYMA_11G055700 (ZEP)	+5,76	+7,33	+3,43	+19,28
GLYMA_03G222600 (SDR)				+17,75
GLYMA_03G014300 (SDR)	-0,012	-0,06		-0,008
GLYMA_15G237900 (MYB)				-0,34
GLYMA_14G221200 (CAD)		-0,03		-0,10
GLYMA_19G105100 (CHS)				-0,05
GLYMA_06G040400 (ABF2)	+4,5	+9,39	+5,58	+4,87
GLYMA_10G075000 (ABF)	-0,029	-0,026		-0,0092
GLYMA_10G138800 (PIL15)	-0,09			-0,02
GLYMA_19G010100 (HOX16)	-0,2			-0,22
GLYMA_08G298400 (AtHB-13)	-0,06			-0,03
GLYMA_18G065200 (DIVARICATA)				+3,02
GLYMA_06G164900 (ARF2A)	+2,6	+3,02		+1,47
GLYMA_09G282900 (CYP707A)	-0,04			-0,03
GLYMA_14G162100 (PP2C)	+107,5	+180,25	+57,85	+122,8
GLYMA_19G069200 (PP2C)	+11,83	+32,39		+39,02
GLYMA_17G148800 (SnRK)		+5,36		+14,44
GLYMA_09G066700 (SnRK)	+3,85	+9,38		+13,54

Tablo 4. 11. ABA biyosentezi, ABA sinyal iletimi, askorbat ve glutatyon mekanizmaları ile ilişkili genlerin Üstün,101-15, Ataem ve 150-43 kuraklık gruplarındaki anlatım değişimi (devamı)

GLYMA_04G039300 (ABF)	+4,45	+8,65	+4,84	+5,15
GLYMA_02G292800 (VTC2-5)				-0,44
GLYMA_09G011100 (VTC4)	-0,1		-0,24	-0,22
GLYMA_05G214000 (PGD)	+4,18	+3,82		+4,1
GLYMA_01G219400 (GPX)	+76,02	+180,48	+32,2	+280,5
GLYMA_19G105100 (CHS)				+3,16
GLYMA_15G251500 (GST)	+6,14	+3,83		+6,76
GLYMA_07G155500 (PYR/PYL)	-0,089	-0,075	-0,074	-0,058
GLYMA_01G124700 (PYR/PYL)	-0,056	-0,025		-0,047
GLYMA_07G056900 (PYR/PYL)	-0,026		-0,33	
GLYMA_14G056300 (PYR/PYL)	-0,055			-0,19

4.4.2. Kuraklık Stresi Altında ABA Biyosentezi ve Sinyal Yollarında Yer Alan DEG'ler

Önemli bir bitki hormonu olan ABA, kuraklık stresinde temel bir rol oynar. Bu nedenle, transkriptom verilerinde ABA biyosentezi ve ABA bağımlı sinyal iletimi ile ilişkili genlerinin ifade gen anlatım profilleri araştırıldı. ABA biyosentezinde yer alan Zeaksantin'den Violasantin üretiminde rol oynayan ZEP (GLYMA_11G055700) geninin anlatımında artış (19,28) en yüksek 150-43 Kuraklık grubunda belirlenmiştir. ABA sentezindeki anahtar genlerden biri olan NCED1'in (GLYMA_08G176300) anlatımı 150-43 kuraklık hariç tüm kuraklık gruplarında artarken 150-43 kuraklıkta azalmıştır. Başka bir NCED (15G250100) geni için 56,28 katlık artışıyla 101-15 Kuraklık grubunda en yüksek anlatım profili gözlemlenirken, 150-43 Kuraklık grubunda bu gene ait anlatım gözlemlenmemiştir. ABA sentezinde rol oynayan SDR'nin (GLYMA_03G222600) anlatımı yalnızca 150-43 kuraklık grubunda belirlenmiştir.

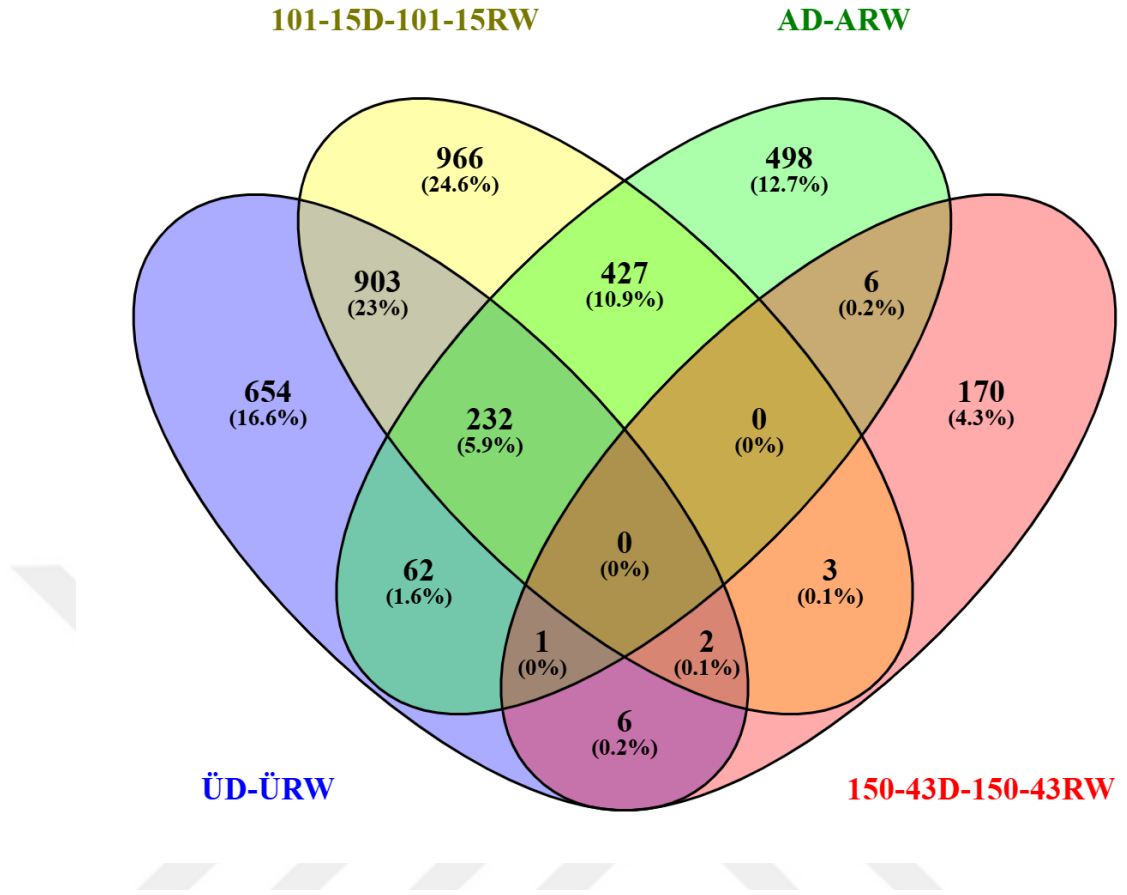
Kuraklık stresine yanıtta en önemli mekanizma olarak değerlendirilen ABA bağımlı yolakta görevli PYR/PYL (GLYMA_07G155500, GLYMA_01G124700, GLYMA_07G056900, GLYMA_14G056300) genlerinin anlatımları oldukça düşükken PYR/PYL ile zıt bir şekilde çalışan PP2C genlerinde anlatım artışları gözlemlenmiştir. Kuraklık stresi altında iki ABA kaynaklı PP2C için (GLYMA_14G162100 ve GLYMA_19G069200) Üstün kuraklık, 101-15 kuraklık ve 150-43 kuraklık gruplarının tamamında anlatım artışı gözlemlenmiştir. Ataem kuraklık grubunda ise yalnızca GLYMA_14G162100 için anlatım artışı tespit edilmekle birlikte bu artış diğer gruplara kıyasla oldukça düşüktür. ABA bağımlı yolakta rol oynayan diğer bir gen ailesi olarak SnRK (GLYMA_17G148800, GLYMA_09G066700) için iki tane gen belirlenmiştir. GLYMA_17G148800 için Üstün ve Ataem kuraklıkta herhangi bir gen anlatımı belirlenemezken 101-15 (5,36 kat) ve 150-43 (14,44 kat) kuraklık gruplarında genin anlatımı artmıştır. GLYMA_09G066700 geni için Üstün kuraklık (3,85 kat), 101-15 kuraklık (9,38 kat) ve 150-43 (13,54 kat) kuraklık gruplarında anlatım artışı belirlenirken Ataem kuraklık grubu için anlatımı saptanamamıştır. Son olarak, iki ABF transkripsiyon faktörünün (GLYMA_06G040400, GLYMA_04G039300) anlatımı tüm kuraklık gruplarında artış göstererek sırayla ABA'ya yanıt veren genlerin aktivasyonunu düzenlemiştir. İki GmHDZIP (19G010100, 08G298400), iki GmMYB (15G237900, 18G065200), ve bir GmWRKY (GLYMA_15G006800) geninin 150-43 kuraklık grubunda anlatımı belirlenmiştir. İki HDZIP geni ve MYB (GLYMA_15G237900) geninin anlatımında azalma diğer MYB (GLYMA_18G065200) geninin anlatımında artış belirlenmiştir. Ataem kuraklık ve 101-15 kuraklık gruplarında bu üç gen için anlatım tespit edilemezken Üstün kuraklık grubunda HDZIP (19G010100, 08G298400) genlerinin anlatımında azalma tespit edilmiştir. Dehidrin ailesine ait iki gen (GLYMA_07G090400 ve GLYMA_09G185500) için anlatım artışları tüm kuraklık gruplarında tespit edilmiştir. GLYMA_09G185500 için en yüksek anlatım artışı gösteren grup Ataem kuraklık (+10187,76) olarak belirlenirken GLYMA_07G090400 için en yüksek anlatım artışı 150-43 kuraklık (+13541,36) olarak belirlenmiştir.

4.4.3. Kuraklık Stresi Altında Askorbat ve Glutasyon Mekanizmalarında Yer Alan DEG'ler

Kuraklık stresi altında soyada askorbat biyosentezi ve glutasyon metabolizmasıyla ilgili genleri belirlemek için DEG'ler analiz edildi. İki DEG'nin kuraklık stresinde askorbat metabolizmasıyla bağlantılı olduğu bulundu. VTC2-5 (GLYMA_02G292800) sadece 150-43 kuraklık grubunda anlatım (-0,44 kat) gösterdi. VTC4 geni (Glyma.09G011100) 101-15 kuraklık grubunda bir anlatım göstermezken Üstün kuraklık (-0,1), Ataem kuraklık (-0,24) ve 150-43 kuraklık (-0,22) için anlatımda azalma belirlenmiştir. Glutasyon mekanizmasında görevli GPX (GLYMA_01G219400) geninin anlatımı ele alındığında en düşük artış Ataem-07 kuraklık (32,2 kat) grubu olarak belirlenirken en yüksek anlatıma sahip grup 150-43 (280,5 kat) olarak belirlenmiştir. Glutasyon metabolizmasında yer alan diğer bir gen olan GST'nin (GLYMA_15G251500) anlatımı incelendiğinde en yüksek artış 6,76 kat ile yine 150-43 kuraklık grubu olarak tespit edilmiştir.

4.4.4. Yeniden Sulama Uygulamasındaki DEG'ler

Kuraklık stresinden sonra yeniden sulama uygulaması ile bitkilerin iyileşme yeteneklerini değerlendirmek amacıyla farklı olarak anlatım yapan genler belirlendi. Tüm gruplar arasında en az DEG sayısı 150-43 yeniden sulamada bulundu (Şekil 4.25). Üstün yeniden sulamada 1348 genin anlatımı artarken 502 genin anlatımı azalmıştır. 101-15 yeniden sulamada 1981 genin anlatımında artış 534 genin anlatımında azalış belirlenmiştir. Ataem-07 yeniden sulamada 905 gende anlatım artışı 304 gende anlatım azalışı bulunurken mutantı olan 150-43 yeniden sulamada 48 genin anlatımında artış 121 genin anlatımında azalma belirlenmiştir. Üstün-1, Ataem-07 ve 150-43 yeniden sulama için bir ortak gen, Üstün ve 150-43 yeniden sulama için altı ortak gen, Üstün, 101-15 ve 150-43 yeniden sulamada iki ortak gen, 101-15 ve 150-43 mutantlarında üç ortak gen, Ataem ve 150-43 yeniden sulamada altı ortak gen bulunmuştur.



Şekil 4.25. Üstün-1, 101-15, Ataem-07 ve 150-43 soya bitkilerinde kuraklık stresi ardından yeniden sulama uygulamasındaki DEG'ler. (D: kuraklık, RW: yeniden sulama)

Kuraklık stresi yanıtındaki hedef genlerin yeniden sulamadaki anlatım değişimleri Tablo 4.8'de verilmiştir. Kuraklık stresi ile artan ABF (GLYMA_04G039300) ve ABF2 (GLYMA_06G040400) yeniden sulama ile Üstün-1, 101-15 ve Ataem-07'de azalırken 150-43 yeniden sulamada anlatım belirlenmemiştir.

Kuraklık stresinde azaldığı bilinen ABF (GLYMA_10G075000) geni yeniden sulama ile birlikte Üstün (+11,49 kat) ve 101-15 (+14,83 kat) yeniden sulamada artış göstermiştir.

Kuraklık stresinde anlatımı artan iki PP2C geninde (GLYMA_14G162100 ve GLYMA_19G069200) yeniden sulama ile birlikte anlatımında azalma tespit edilmiştir. GLYMA_14G162100 geni Üstün yeniden sulamada -0,14 kat, 101-15 yeniden sulamada -0,25 kat azalırken Ataem-07 ve mutanti olan 150-43 yeniden sulamada anlatım belirlenmemiştir.

GLYMA_19G069200 geni yalnızca Üstün yeniden sulamada -0,24 kat azalmıştır. 101-15, Ataem ve 150-43 yeniden sulamada bu gen için anlatım tespit edilmemiştir. PYR/PYL (GLYMA_01G124700) geni için yalnızca Üstün ve mutantı 101-15 yeniden sulamada anlatım belirlenmiştir. PYR/PYL (GLYMA_01G124700) geni Üstün yeniden sulamada +11,64 kat artarken 150-43 yeniden sulamada +9,57 kat artış göstermiştir. Kuraklık stresi altında anlatımı belirlenen gruplarda artış gösteren iki SnRK geni için yeniden sulamada da anlatım değişimi belirlenmiştir. Bu genler için kuraklık stresinden farklı olarak yeniden sulamada anlatımlarında azalma tespit edilmiştir. SnRK (GLYMA_17G148800) geninin anlatımında -0,28 kat azalma ile Sadece Üstün yeniden sulamada belirlenirken diğer SnRK (GLYMA_09G066700) geninin Üstün (-0,38 kat) ve mutantı olan 101-15'te (-0,36 kat) anlatımı azalmıştır.

Askorbat metabolizma ile ilişkili VTC4 geni (Glyma.09G011100) için kuraklık stresinde 101-15 kuraklık grubunda anlatım göstermezken Üstün, Ataem ve 150-43 kuraklıkta anlatımda azalma belirlenmişti. Yeniden sulama ile birlikte bu genin anlatım artışı yalnızca Üstün (+8,58) ve 101-15 (+6,41) yeniden sulamada tespit edilmiştir. Ataem ve 150-43 yeniden sulama gruplarında anlatım göstermemiştir.

ABA biyosentezinde rol oynayan ZEP (GLYMA_11G055700) genindeki anlatım artışı kuraklık stresi altında en yüksek 150-43 (+19,28) grubunda belirlenmiştir. Yeniden sulama uygulamasından sonra ZEP (GLYMA_11G055700) geni için 150-43 mutantında anlatım belirlenemezken Üstün ve 101-15 yeniden sulama gruplarında bu genin anlatımının azaldığı bulunmuştur. ABA sentezinde rol oynayan diğer bir gen olan SDR'nin (GLYMA_03G222600) anlatımı kuraklık stresi altında yalnızca 150-43 kuraklık grubunda belirlenmişti. Bunun aksine yeniden sulama ile birlikte 150-43 mutantında bu genin anlatımı belirlenemezken Üstün ve mutantı olan 101-15 yeniden sulama gruplarında sırasıyla +29,15 ve +7,66 kat artışla anlatım göstermiştir.

Tablo 4.8. Kuraklık stresi ilişkili genlerin yeniden sulama uygulaması sonrası Üstün,101-15, Ataem ve 150-43 gruplarındaki anlatım değişimi

GEN ID/ GEN AİLESİ	Üstün Yeniden Sulama	101-15 Yeniden Sulama	Ataem Yeniden Sulama	150-43 Yeniden Sulama
GLYMA_11G055700 (ZEP)	-0,2	-0,4		
GLYMA_03G014300 (SDR)	+29,15	+7,66		
GLYMA_06G040400 (ABF2)	-0,18	-0,26	-0,23	
GLYMA_04G039300 (ABF)	-0,21	-0,32	-0,26	
GLYMA_10G075000 (ABF)	+11,49	+14,83		
GLYMA_08G298400 (AtHB-13)	+6,26			
GLYMA_14G162100 (PP2C)	-0,14	-0,25		
GLYMA_19G069200 (PP2C)	-0,24			
GLYMA_17G148800 (SnRK)	-0,28			
GLYMA_09G066700 (SnRK)	-0,38	-0,36		
GLYMA_04G039300 (ABF)	-0,21	-0,32	-0,26	
GLYMA_09G011100 (VTC4)	+8,58	+6,41		
GLYMA_01G124700 (PYR/PYL)	+11,64	+9,57		

DEG'lerin daha detaylı analizi için, yeniden sulamaya yanıt olarak farklı şekilde ifade edilen genler belirlenmiştir (Tablo 4.9). GLYMA_17G030400, GLYMA_10G059200, GLYMA_10G274400 ve GLYMA_16G142300 genleri için anlatım yalnızca 150-43 yeniden sulama grubunda tespit edilmiştir. GLYMA_17G030400, GLYMA_10G059200 genleri 150-43 yeniden sulamada sırasıyla -0,04 ve -0,03 kat olarak anlatımda azalma gösterirken GLYMA_10G274400 geni +5,04 kat ve GLYMA_16G142300 geni +6,94 kat ile anlatımda artış göstermiştir.

101-15 ve 150-43 mutantları arasında ortak olarak anlatımı olan GLYMA_18G094600 geni 101-15 yeniden sulamada -0,047 kat azalış gösterirken, 150-43 yeniden sulamada +6,14 kat artış göstermiştir. GLYMA_01G178800 geninde de benzer şekilde 101-15 yeniden sulamada -0,28 kat azalış belirlenirken 150-43 yeniden sulamada +2,35 kat artış belirlenmiştir.

Tablo 4.9. Yeniden sulama uygulamasındaki DEG’lerin Üstün,101-15, Ataem ve 150-43 gruplarındaki anlatım değişimi

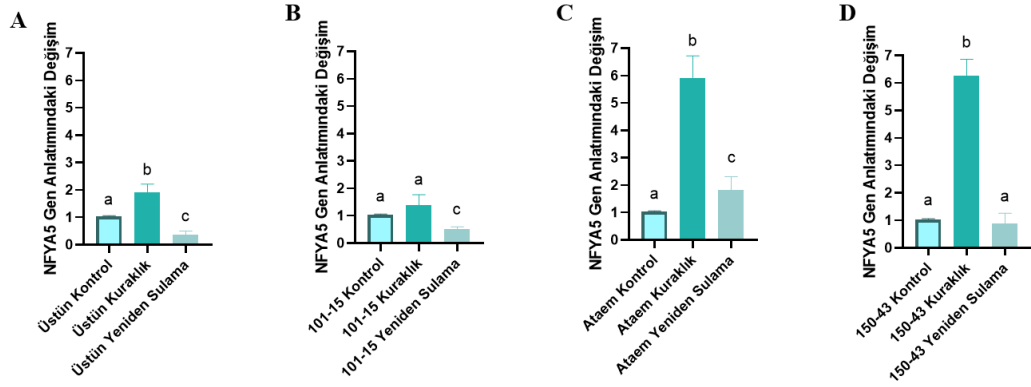
GEN ID/ GEN AİLESİ	Üstün Yeniden Sulama	101-15 Yeniden Sulama	Ataem Yeniden Sulama	150-43 Yeniden Sulama
GLYMA_12G023300 PREDICTED: Glycine max L-ascorbate oxidase homolog			+30,73	-0,20
GLYMA_11G097300 PREDICTED: Glycine max L-ascorbate oxidase homolog			+12,55	-0,28
GLYMA_14G176400 Glycine max protein phosphate-induced 1			+7,14	-0,32
GLYMA_08G193500 PREDICTED: Glycine max beta-galactosidase 1			+6,34	+4,30
GLYMA_08G179600 Glycine max cationic peroxidase 2-like		-0,46		-0,48
GLYMA_01G178800 Glycine max probable vacuolar amino acid transporter YPQ1		-0,28		+2,35
GLYMA_17G138500 Glycine max acid beta- fructofuranosidase	+6,17			+5,37
GLYMA_20G127500 PREDICTED: Glycine max stress enhanced protein 1, chloroplastic	+3,33			+2,14
GLYMA_19G262700 PREDICTED: Glycine max ethylene-responsive transcription factor RAP2-2	-0,46			-0,39
GLYMA_11G077800 PREDICTED: Glycine max thaumatin-like protein 1	-0,41			-0,43
GLYMA_17G138500 Glycine max acid beta- fructofuranosidase	+6,17			+5,37
GLYMA_09G016400 Glycine max heavy metal- associated isoprenylated plant protein 47	-0,13		-0,04	-0,47
GLYMA_08G179600 Glycine max cationic peroxidase 2-like		-0,46		-0,48
GLYMA_11G097300 PREDICTED: Glycine max L-ascorbate oxidase homolog			+12,55	-0,28

Tablo 4.9. Yeniden sulama uygulamasındaki DEG'lerin Üstün,101-15, Ataem ve 150-43 gruplarındaki anlatım değişimi (devamı)

GLYMA_12G023300 PREDICTED: Glycine max L-ascorbate oxidase homolog	+30,73	-0,2
GLYMA_17G030400 Glycine max stress- induced protein SAM22 (PR-10)		-0,04
GLYMA_10G059200 PREDICTED: Glycine max alpha carbonic anhydrase 7		-0,03
GLYMA_08G193500 PREDICTED: Glycine max beta-galactosidase 1	+6,34	+4,30
GLYMA_10G274400 PREDICTED: Glycine max 3-ketoacyl-CoA synthase 6		+5,04
GLYMA_18G094600 Glycine max small heat shock protein, chloroplastic	-0,047	+6,14
GLYMA_16G142300 PREDICTED: Glycine max lysosomal amino acid transporter 1		+6,94

4. 5. GMNFYA5 ANLATIMININ qRT-PZR İLE SAPTANMASI

RNA-seq'ten elde edilen gen ifadesi verilerini doğrulamak için, qRT-PZR analizi için son yıllarda sıklıkla çalışılan özellikle ABA bağımlı ve ABA bağımsız yollarda farklı genlerle etkileşime girerek kuraklık stresi toleransında rol oynadığı bilinen NFYA5 geni seçilmiştir. NFYA5 gen anlatım ifadelerindeki değişim Şekil 4.26'da gösterilmiştir. Tüm gruplarda gen ifadesi kuraklık stresi ile birlikte artış göstermekle birlikte yeniden sulama uygulaması sonucunda azalmıştır.



Şekil 4.26. Soya bitkilerinde kuraklık stresi ve yeniden sulama ile birlikte NFYA5 gen anlatımı değişimi

Üstün kuraklık 1,5 kat artış gösterirken yeniden sulamada bu değer 0,3 kata düşmüştür. 101-15 kuraklık grubu kontrol grubuna kıyasla ortalama 1,4 kat bir artış göstermiştir. Yeniden sulama uygulamasında gen ifadesindeki değişim 0,5 kat olarak belirlenmiştir. Ataem kuraklık grubunda Ataem kontrole kıyasla 5,7 kat artış hesaplanırken yeniden sulama uygulamasında kontrole kıyasla 1,8 kat artış gözlemlenmiştir. 150-43 kuraklık grubunda gen ifadesindeki artış 6,2 kat olarak hesaplanırken yeniden sulama ile birlikte gen ifadesindeki değişim 0,8 kat olarak belirlenmiştir.

Bu sonuçlar doğrultusunda NFYA5 gen ifadesindeki en büyük artış 150-43 (6,2 kat) kuraklık bitkilerinde belirlenmiştir. Benzer şekilde kuraklık stresinden sonra bitkilerin iyileşme yeteneklerinin değerlendirilmesi amacıyla gerçekleştirilen yeniden sulama uygulamasında 0,8 kat ile 150-43 yeniden sulama grubu kontrol bitkilerine en yakın değer olarak belirlenmiştir.

5. TARTIŞMA

Küresel iklim değişikliğinin en büyük belirtisi olarak kuraklık, ürün üretimi ve veriminde düşüşe yol açmaktadır. Soyada kuraklık stresi mekanizmasında rol oynayan pek çok gen ailesi tanımlanmış olsa da soyanın kuraklığa dayanıklılığına ilişkin moleküler altyapılar sınırlı kalmıştır. Bu tez kapsamında V3 aşamasındaki mutant soya bitkilerinde kuraklık stresi yanıt mekanizmaları ve NFYA5 transkripsiyon faktörünün bu yanıt mekanizmasındaki rolü araştırıldı. Kuraklık stresinden sonra bir gün boyunca bitkilerin kuraklık stresi sonrası iyileşme yeteneklerinin tespiti için yeniden sulama uygulaması gerçekleştirildi. Bu uygulamaların soyada verdiği yanıtların anlaşılması için fizyolojik, biyokimyasal ve transkriptomik analizler yapıldı.

Tez kapsamında elde edilen fizyolojik veriler kuraklık stresinin soya gelişimi üzerindeki olumsuz etkileri olduğunu göstermiştir. Gelişim sürecinde özellikle yaprakların ciddi ölçüde solduğu, kıvrıldığı ve susuz kaldığı gözlemlenmiştir. Yeniden sulama uygulaması ile tüm bitki gruplarında iyileşme dereceleri tespit edilmiştir. Bitki yapraklarının fenotipi doğrudan kuraklık stresinin etkisini yansıtmaktadır (Li ve ark., 2022b). Birçok çalışmada, kuraklık stresi ardından yeniden sulamanın bitkilerde fizyolojik ve biyokimyasal düzeyde stresin etkilerini telafi edebileceğini göstermiştir. 2019 yılında gerçekleştirilen çalışmada 6 günlük kuraklık stresine maruz bırakılan *Glycyrrhiza* fideleri kuraklık stresinden sonra yeniden sulanmıştır. Yeniden sulama ile SOD, CAT ve APX aktiviteleri, prolin ve çözünür protein içeriklerinin önemli ölçüde artarken, MDA, çözünür şeker içerikleri ve POD aktivitesinin önemli ölçüde azalmıştır (Dong ve ark.,2019).

Bu sebeple sonuçlarımız doğrultusunda bitkilerin uzun süreli kuraklık stresi ardından yeniden sulama ile stresin olumsuz etkilerinin azalabileceğini gösterilmekle birlikte kuraklık stresi mekanizmasının aydınlatılması için de potansiyel bir yaklaşım olabilir.

Bitkilerin fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler düzeyde stres tepki mekanizmaları aracılığıyla kuraklık hasarını azaltmak için çeşitli cevaplar verdiği gösterilmiştir. Bulgularımızda, stresle ilişkili yanıtlardan olan MDA içeriği kuraklık stresi ile tüm kontrol ve mutant bitkilerde artış göstermiştir. Yeniden sulamada ise tüm bitkiler arasında 150-43 bitkilerinde kuraklık stresi ile artan MDA içeriğinin istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azaldığı belirlenmiştir. Bitkilerin kuraklık stresine yanıt verme

yeteneğini yansıtmak için MDA içeriği, lipid peroksidasyonunun göstergesi olarak kullanılmaktadır. Önceki çalışmalar, mısır ve soyada kuraklık stresinin yoğunluğu ve süresi arttıkça MDA düzeylerinin arttığını göstermiştir (Wang ve ark., 2022; Li ve ark., 2022b).

Bitkiler ayrıca kuraklık stresinin neden olduğu hasarı azaltmak için ozmotik düzenleme stratejileri benimsemektedir. Ozmotik moleküllerden biri olan prolin çalışmamızda özellikle kuraklık stresi altında tüm bitkilerde 3 kat artış göstermiştir. Yeniden sulamadan sonra kuraklık stresinde artan prolin seviyesinde azalma görülmüştür, MDA içeriğinde olduğu gibi yeniden sulamada en iyi yanıt veren grubun 150-43 soya mutanı olduğu saptanmıştır. Prolin, çözünür şekerler ve çözünür proteinler gibi ozmotik olarak aktif moleküller, stres altında ozmoregülasyon ve dehidratasyonun önlenmesinde rol oynamaktadır. Soya bitkilerinde gerçekleştirilen bir çalışmada kuraklığın süresi arttıkça prolin içeriğinin arttığı gözlemlenmiştir (Wang ve ark.,2022). Kuraklık stresinden sonra yeniden sulamanın stres sırasında biriken prolin, çözünür şekerler ve MDA gibi antioksidan maddelerin içeriğini önemli ölçüde azalttığını bildirmiştir (Zhang ve ark., 2004; Dong ve ark., 2019).

Klorofil, fotosentez için hayati önem taşıyan tilakoid zarındaki pigment-protein kompleksinin önemli bir bileşenidir. Kuraklık stresi ile tüm gruplarda klorofil içeriğinde azalma meydana gelmiştir. 150-43 kuraklık grubunda bu azalma diğer gruplara göre daha az olarak belirlenmiştir. Yeniden sulama ile birlikte en yüksek total klorofil içeriğine sahip grup 150-43 yeniden sulama olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda özellikle 150-43 için kuraklık stresinin hasarının yeniden sulama ile telafi edilebildiği gözlemlenmiştir. Kuraklık stresi klorofil a, b ve toplam klorofil içeriğini önemli ölçüde azaltabilir (Poudel ve ark., 2023).

Bu tez kapsamında gerçekleştirilen tüm biyokimyasal analizlerde kuraklık stresine yanıt ve yeniden sulamanın etkisi en iyi 150-43 grubunda belirlenmiştir. Bu bulgular doğrultusunda V3 aşamasındaki 150-43 mutant bitkilerin diğer bitkilere kıyasla kuraklık stresine daha toleranslı olduğu saptanmıştır.

2019 yılında yapılan bir araştırmada yeniden sulamanın kuraklık stresi etkisini telafi edebilmesinde bitkinin strese maruz kaldığı büyüme aşamasına, stres seviyesine ve yeniden sulama sonraki zamana göre değişebildiğini gösterilmiştir ve soya bitkilerinde en hızlı iyileşme oranının R5 aşamasına göre V3 aşamasında olduğunu tespit etmişlerdir (Dong ve ark., 2019).

Soyada kuraklık stresi ile ilişkili TF'ler ve potansiyel gen yolları GO ve KEGG analizleri ile belirlenmiştir.

Üstün çeşidinin Ataem çeşidine göre kuraklık stresindeki DEG sayıları daha yüksektir. Üstün mutantı olan 101-15 bitkilerinde Üstüne göre daha az DEG elde edilmiştir.

150-43 mutant bitkilerinde Ataem'e göre kuraklık uygulamasında DEG sayısının oldukça yüksek olduğu tespit edilmiştir. DEG sayısı 150-43 mutant bitkilerinde 7630 olarak saptanırken 101-15 mutantında 2091 olarak bulunmuştur. Sonuç olarak tüm gruplar arasında mutant soya bitkisi 150-43 kuraklık en fazla DEG sayısına sahip grup olarak belirlenmiştir. Kuraklık stresinden sonra yeniden sulama için 101-15 hattında Üstün çeşidine kıyasla DEG sayılarında artış belirlenirken 150-43 hattında Ataem çeşidinde göre azalma saptanmıştır

2018 yılında soyada (*Glycine max* L.cv. Williams) kuraklık stresinin etkisini anlaşılması amacıyla gerçekleştirilen transkriptomik bir çalışmada toplam 2771 genden, 1798 genin anlatımının arttığı ve 973 genin anlatımının azaldığı bulunmuştur (Xu ve ark.,2018). Li ve ark., tarafından 2022b yılında kuraklığa hassas üç farklı kuraklık stresinde (7-17-27 gün) sırasıyla toplam 2214, 3684 ve 2985 DEG tanımlanmıştır.

NF-Y'ler ABA sinyal yollarının düzenlenmesinde kilit rol oynamaktadır. NF-Y'ler, kuraklık stresinde ABA'ya bağlı yanıt olarak bilinen ABA sentezini veya ABA sinyallerine yanıtı düzenlemede yer almaktadır (Kishor ve ark., 2023). ABA, stomaların kapanması, protein, çözünür şeker ve amino asit içeriklerinin düzenlenmesini sağlayan kuraklık stres toleransında önemli rol oynayan bir bitki hormonudur. Bu nedenle, transkriptom verilerinde ABA biyosentezi ilişkili genlerin ifade profillerini araştırdık. Bulgularımızda ZEP (GLYMA_11G055700), SDR (GLYMA_03G222600) ve iki NCED (GLYMA_08G176300 ve GLYMA_15G250100) geninin ABA biyosentezinde rol oynadığı belirlenmiştir. Bu üç gen için kuraklık grubu bitkilerinde diğerlerinden farklı anlatım profillerine sahip

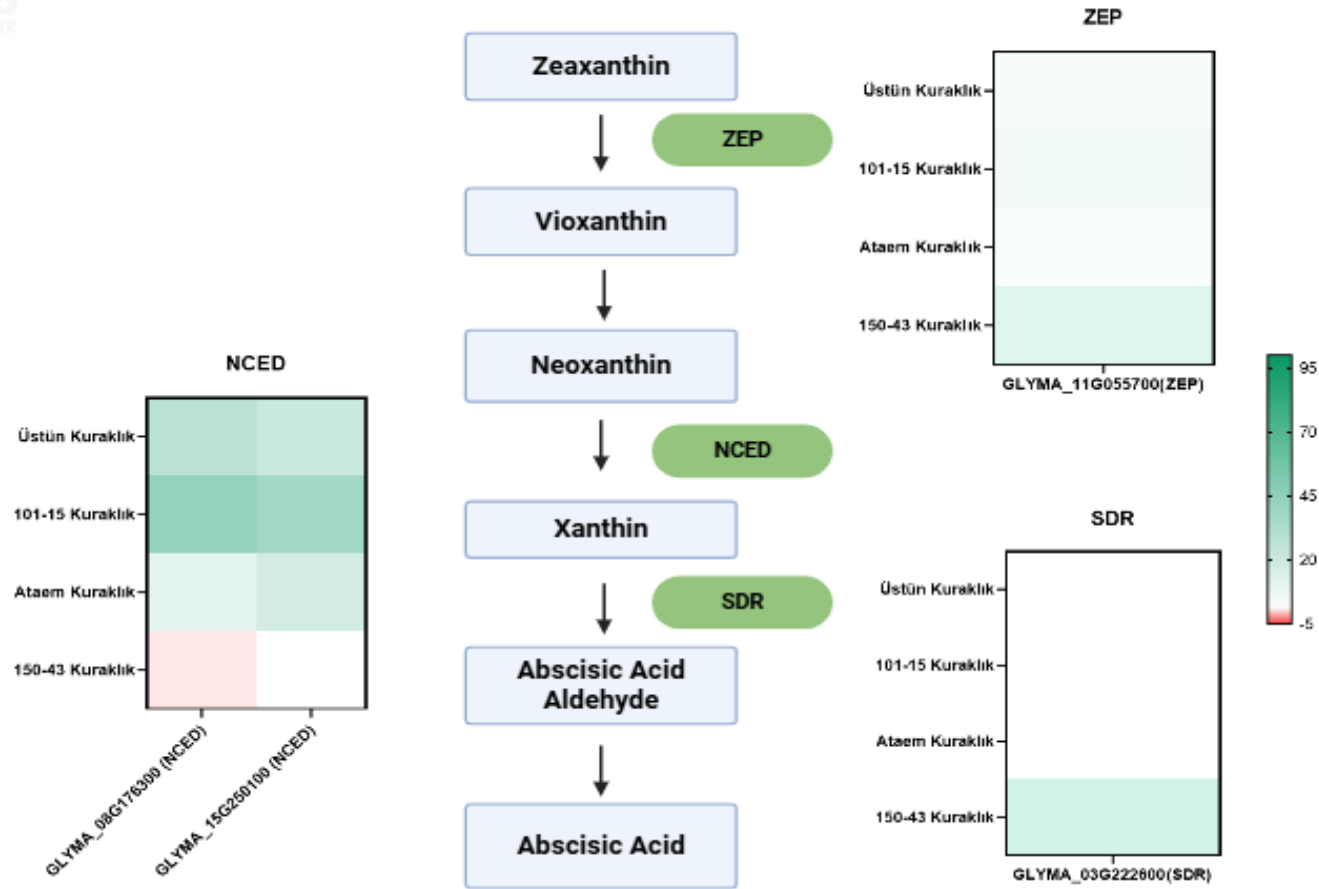
grup 150-43 kuraklıktır. ZEP (GLYMA_11G055700), SDR (GLYMA_03G222600) genleri için tüm bitkilerde anlatım artışı belirlenmiştir. En yüksek anlatım artışı iki gen için de 150-43 kuraklık grubudur. GLYMA_08G176300 ve GLYMA_15G250100 NCED genlerinin anlatım profillerine bakıldığında tüm gruplarda artış tespit edilmiştir. Fakat gruplar arasında en az anlatım artışı 150-43 grubunda belirlenmiştir (Şekil 5.1).

Li ve ark., tarafından 2022b yılında kuraklığa hassas soyada kuraklık stresi yanıtlarının araştırılması amacıyla gerçekleştirilen çalışmada ZEP (GLYMA_11G055700) ve SDR (GLYMA_03G222600) genlerinin anlatımında azalma, NCED (GLYMA_08G176300) geninin anlatımında artış belirlenmiştir.





bio
RENDER



Şekil 5. 1. ABA biyosentezi yolağı ve yolak ile ilişkili genler

Gerçekleştirilen RNA sekanslama sonuçlarında kuraklık stresindeki ABA bağımlı yolakta rol oynayan genlerin anlatım profilleri de incelenmiştir. Bulgularımızda dört tane PYR/PYL (GLYMA_07G155500, GLYMA_01G124700, GLYMA_07G056900, GLYMA_14G056300) geni belirlenmiştir. Kuraklık stresinde Üstün çeşidinde GLYMA_07G155500, GLYMA_01G124700, GLYMA_07G056900, GLYMA_14G056300 genleri varken 101-15 mutantında sadece iki tane gen (GLYMA_07G155500, GLYMA_01G124700) bulunmaktadır. Kuraklık stresinde Ataem-07’de GLYMA_07G155500, GLYMA_07G056900 genleri bulunurken 150-43 mutantında GLYMA_07G155500, GLYMA_01G124700, GLYMA_14G056300 genleri bulunmaktadır. Yukarıda ifade edilen dört gen -0,02 ve -0,3 kat aralığında azalmıştır. Mutantlar ile soya çeşitleri arasında gen anlatım farklılıkları bulunmaktadır.

Bu dört PYR/PYL geni için tüm kuraklık gruplarında anlatımda azalma gözlemlenirken inhibe ettiği PP2C(GLYMA_14G162100, GLYMA_19G069200) genlerinde anlatım artışı gözlemlenmiştir. Üstün çeşidinde sırasıyla 107,5 ve 11,83 kat artış mutantında ise sırasıyla +180,25 ve +32,39 kat artış belirlenmiştir. Ataem-07’de sadece GLYMA_14G162100 geni bulunmuştur. Bu gen +57,85 kat artış göstermiştir. Mutantında ise GLYMA_14G162100, GLYMA_19G069200 genleri sırasıyla +122,8 ve +39,02 kat olarak belirlenmiştir.

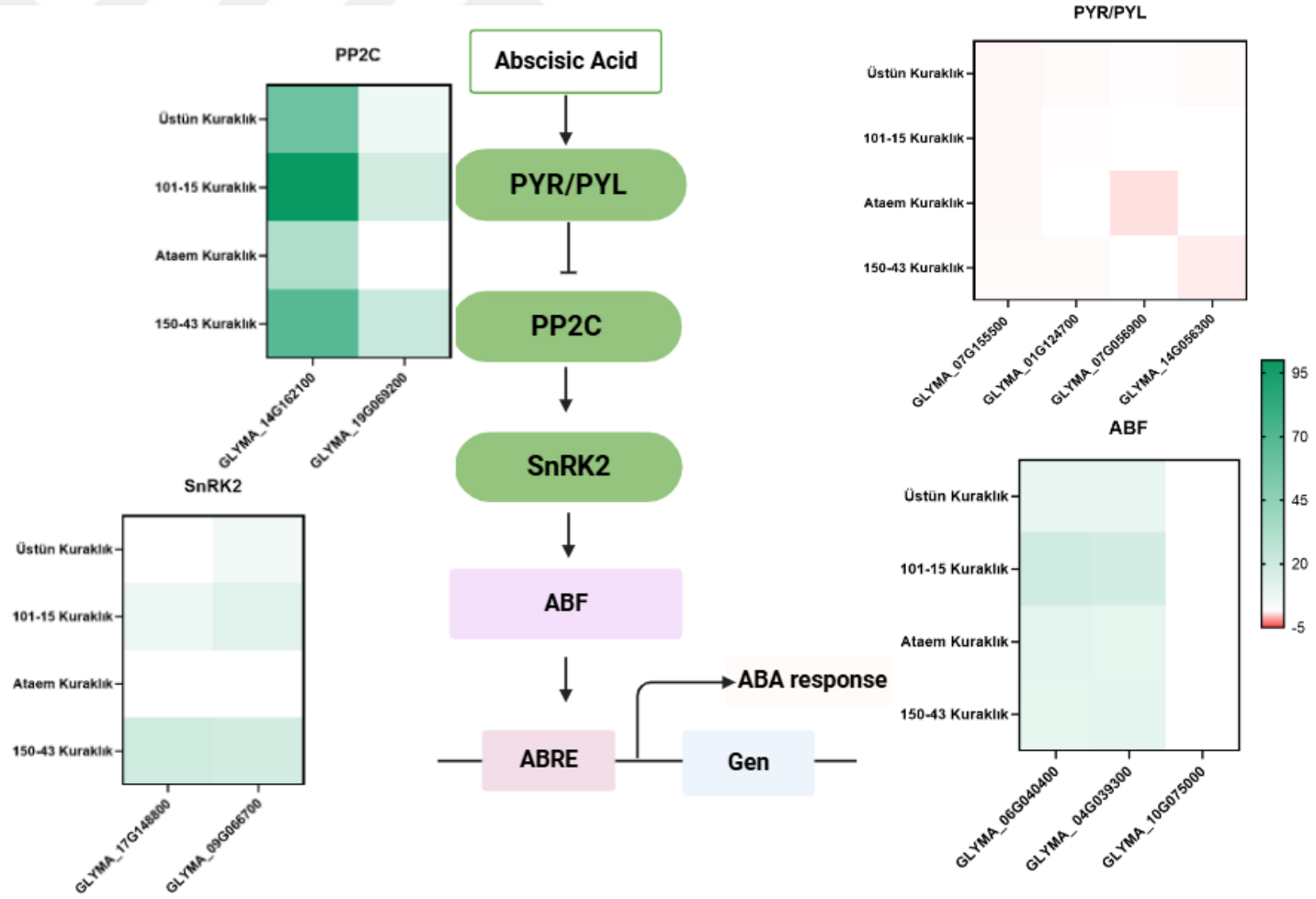
ABA, PP2C'nin fosfataz aktivitesini baskılayan PYR/PYL reseptörleri tarafından algılanır (de Melo ve ark.,2022). PP2C'nin etkileşimde olduğu iki SnRK (GLYMA_17G148800, GLYMA_09G066700) geninin anlatımı en yüksek 150-43 kuraklık grubunda tespit edilmiştir.

Bulgularımızda kuraklık stresi altında ABF2 (GLYMA_06G040400) ve ABF (GLYMA_04G039300) genlerinde anlatım artışı tespit edilmiştir.101-15 mutantında 150-43’e göre daha fazla artış göstermiştir (Şekil 5.2).

Ozmotik stres koşulları altında, ayrıntılı moleküler analizler AREB/ABF'leri ABA sinyalleme sırasında gen ifadesini modüle eden önemli bir transkripsiyonel aktivatör olarak bulmuştur. Dokuz AREB/ABF ailesi üyesinden AREB1/ABF2, vejetatif aşamada kuraklık stresi sırasında ABA sinyallemesini düzenlemektedir (Joshi ve ark., 2016). Bu bulgular ABA ilişkili genlerin kuraklık stresi tarafından indüklendiğini ve soyanın kuraklık yanıtında ABA bağımlı yolağın önemli roller oynadığını göstermektedir.

Li ve ark., tarafından kuraklığa hassas soya bitkilerinde gerçekleştirilen çalışmada soya bitkileri orta süreli (17gün) kuraklık stresine maruz bırakılmıştır. Bunun sonucunda PYR/PYL genlerinin anlatımlarında azalma, PP2C (GLYMA_14G162100, GLYMA_19G069200) genlerinin anlatımında artış, SnRK (GLYMA_17G148800 ve GLYMA_09G066700) genlerinde ve iki ABF (GLYMA_06G040400 ve GLYMA_04G039300) geninde 0-2 kat arasında bir artış belirlemişlerdir.

Li ve ark., bulmuş olduğu hassas çeşidin yukarıda açıklanan genlere ait sonuçları Üstün ve 101-15 soya çeşitlerindeki bulgularla benzerdir. 150-43 hattında 101-15'e göre PP2C ve ABF genlerinde anlatım seviyeleri daha azdır. Buna karşılık SnRK gen ifadeleri daha fazla artmıştır (Li ve ark., 2022b).



Şekil 5. 2. Kuraklık stresinde ABA bağımlı yolak ve yolak ile ilişkili genler

Hücresel düzeyde, sinyal mekanizmaları ve fitohormonlar ortak çalışarak bitkilerde kuraklık tepkisini düzenlemektedir. Yüksek verimli dizileme tekniklerinin ortaya çıkmasıyla birlikte, soya gen veya gen aileleri tanımlanmış ve karakterize edilmiştir. NAC, WRKY, AREB, DREB bu gen ailelerinden bazılarıdır. Karşılaştırmalı transkriptomik, soya fasulyesindeki kuraklık tepkisinin altında yatan moleküler mekanizmaları daha da açıklığa kavuşturmuştur (Arya ve ark., 2021). Bu tez kapsamında elde edilen bulgular doğrultusunda WRKY (GLYMA_15G006800) geninin anlatımı yalnızca iki (Üstün ve 150-43) kuraklık grubunda bulunmuştur. İki grup içinde benzer şekilde anlatım seviyelerinde azalma tespit edilmiştir.

WRKY transkripsiyon faktörlerinin bitki abiyotik stres toleransında önemli roller oynadığı vurgulanmıştır (Arya ve ark., 2021). WRKY proteinleri, ABA bağımlı sinyal iletimi ve ROS temizlemede rol oynayan genlerin ifadesini doğrudan veya dolaylı olarak düzenleyerek kuraklık stresine yanıtta rol oynamaktadır. AtWRKY57'nin RD29 ve NCED3 promotörlerindeki W-box'a bağlanması ile gen anlatımında artışa neden olmaktadır. Bu anlatım artışı ile ABA seviyelerinde yükselme meydana gelir ve kuraklık toleransı sağlamaktadır. Mısırdaki (*Zea mays* L.) ZmWRKY58 veya yabancı soyada (*Glycine soja*) GsWRKY20'yi aşırı ifade eden transgenik bitkilerle ilgili çalışmalar, bu genlerin kuraklık stresine yanıtta pozitif düzenleyiciler olarak görev aldığını ileri sürmektedir (Yang ve ark., 2023). Kuraklığa hassas soya çeşidinde üç farklı kuraklık stresinin etkisini araştırmayı amaçlayan çalışmada WRKY (GLYMA_15G006800) geninin anlatım seviyelerinde artış saptanmıştır (Li ve ark., 2022b). Bu zıt sonuçlar, soyada kuraklık toleransını kontrol eden sinyal yollarındaki katılımlarının kesin bir şekilde anlaşılması için farklı WRKY TF'lerinin işlevlerinin aydınlatılmasının gerekli olduğunu göstermektedir.

Bu tez kapsamında transkriptomik analizler sonucunda MYB ailesine ait bir gen olan DIVARICATA (GLYMA_18G065200) yalnızca 150-43 kuraklık grubunda anlatımı (3,02 kat) belirlenmiştir. MYB transkripsiyon faktörleri, stres tepkileri için ikincil metabolitlerin biyosentezini düzenler (Arya ve ark., 2021). 2021 yılında gerçekleştirilen bir çalışmada kuraklık stresi altında, GmMYB14'ün aşırı anlatımının olduğu soya bitkilerinde bakla sayısı, tohum sayısı ve bitki başına tohum ağırlığı yabancı tip soyaya kıyasla önemli ölçüde iyileşmiştir (Chen ve ark., 2021a).

Bu çalışma kapsamında gerçekleştirdiğimiz transkriptomik analizler sonucunda HDZIP ailesine ait HOX16 (GLYMA_19G010100) ve AtHB-13(GLYMA_08G298400) genleri için yalnızca Üstün kuraklık ve 150-43 kuraklık grubunda anlatım tespit edilmiştir. HOX16 (GLYMA_19G010100) gen için Üstün ve 150-43 için gen anlatımlarında bir fark bulunmamıştır. Buna karşılık AtHB-13(GLYMA_08G298400) 150-43'te -0,03 kat ve Üstün'de -0,06 kat azalmıştır.

Bu konuda yapılan bir çalışmada HD-ZIP, ABA sinyal yolları aracılığıyla aşağı akış genlerin ifadesini düzenlemekle birlikte bitki büyümesini ve gelişimini düzenleyerek bitki stres toleransında rol oynadığı gösterilmiştir (Li ve ark., 2022a).

Bu tez kapsamında yapılan çalışmada iki tane GLYMA_15G251500 (GST) ve GLYMA_07G139700 (Tau class glutathione S-transferase, GSTU23) geni tespit edilmiştir. GLYMA_07G139700 (Tau class glutathione S-transferase, GSTU23) geni için Üstün (+889,13), Ataem (+79,70) ve 150-43(269,69)'te anlatım artışı belirlenmiştir. Diğer GLYMA_15G251500 (GST) geni için Üstün (+6,14), 101-15(+3,83) ve 150-43(+6,76)' te anlatım artışı belirlenmiştir.

Tau sınıfı glutatyon transferaz, bitki hücrelerinde önemli bir enzimdir. Bitki antioksidan savunmalarında ve metabolik düzenlemede önemli bir rol oynar. Son araştırmalar, tau glutatyon transferazlarının ifadesinin ve aktivitesinin düzenlenmesinin, yüksek tuz, düşük sıcaklık ve kuraklık gibi çeşitli streslerde bitki toleransını önemli ölçüde artırabileceğini göstermiştir (Li ve ark., 2023).

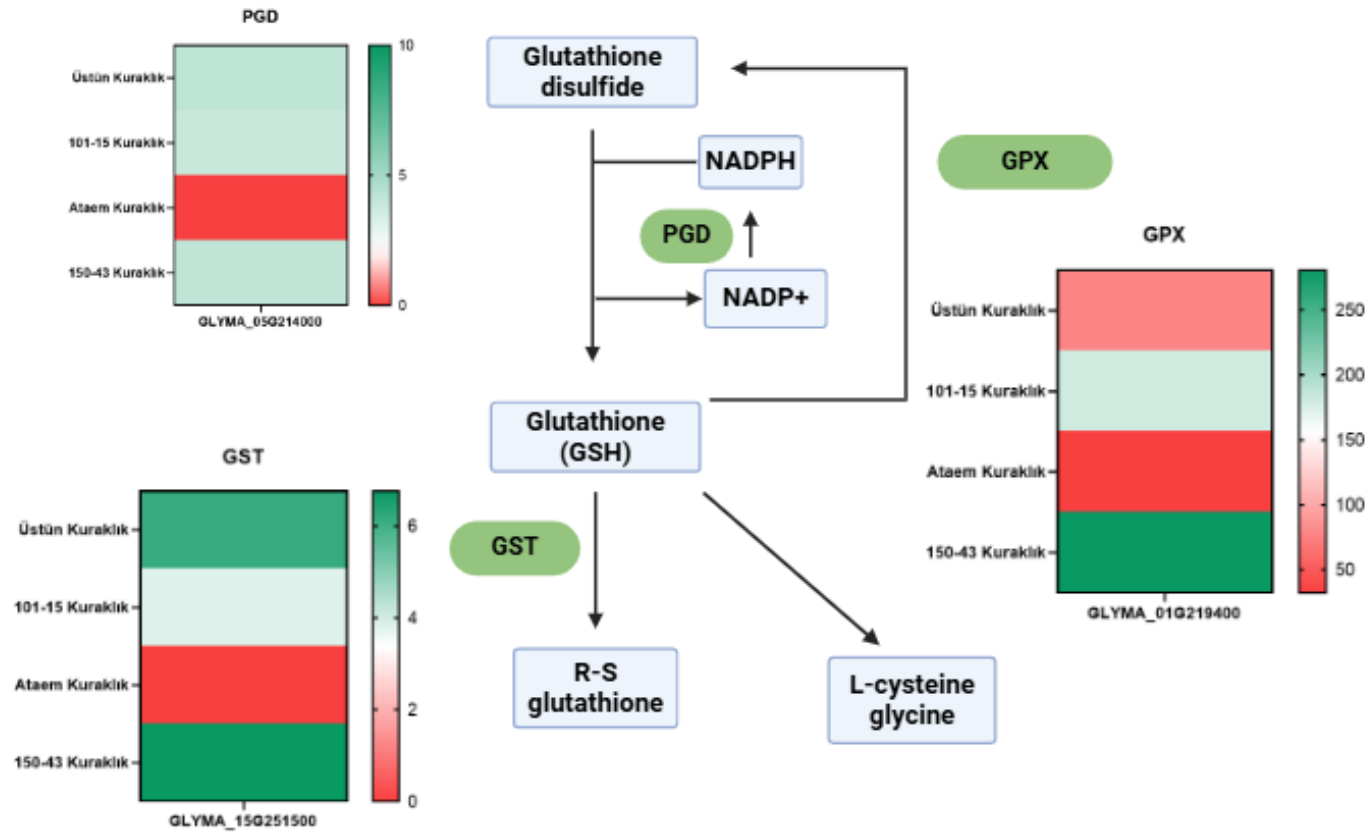
Elde edilen bulgulara glutatyon mekanizmasında görevli GPX (GLYMA_01G219400) geninin en yüksek anlatımının belirlendiği grup 150-43 (280,5 kat) kuraklıktır. Diğer bitkilerde ise bu artış Üstün'de +76,02 kat, 101-15'te +180,48 kat ve Ataem'de +32,2 kat olarak bulunmuştur (Şekil 5.3).

GPX genleri sadece bitki büyümesi ve gelişiminde değil, aynı zamanda bitkilerin abiyotik streslere, biyotik streslere ve fitohormonlara karşı tepkilerinin kontrolünde de çok önemli bir rol oynamaktadır (Chen ve ark.,2017). Glutatyon mekanizmasında görevli genlerin belirlenen antioksidan savunma yoluyla kuraklığa yanıtta önemli rol oynadığı gösterilmiştir (Wu ve ark., 2022).

Bu tez kapsamında kuraklık stresi ile anlatım artışı gösteren iki dehidrin (GLYMA_07G090400 ve GLYMA_09G185500) geni bulunmuştur. Üstün,101-15 ve Ataem'e göre 150-43'te GLYMA_07G090400 genin anlatım artışı en yüksekken, GLYMA_09G185500 için en düşük anlatım artışı belirlenmiştir.

Dehidrinler, bitkilerin abiyotik stres yanıtında görev alan LEA proteinlerinin alt ailesinde yer almaktadır. Dehidrinler hücre içi protein aktivitesinin korunması, hücre zarındaki fosfolipitlerin stabilizasyonu ve reaktif oksijen türlerinin ortadan kaldırılması ile kuraklık stresine yanıtta rol oynamaktadır (Fan ve ark., 2024).





Şekil 5. 3. Kuraklık stresinde glutatyon metabolizmasında rol oynayan genler

Yeniden sulama uygulaması ile bitkilerin iyileşme yeteneklerini değerlendirmek amacıyla DEG'ler belirlendi. Tüm gruplar arasında en az DEG sayısı 150-43 yeniden sulamada bulunurken en fazla DEG sayısına sahip grup 101-15 yeniden sulamaydı. Bu sonuçlar 150-43 mutantının kuraklığa dayanıklı olduğunu gösterirken 101-15 mutantının kuraklıktan daha fazla etkilendiğini göstermektedir.

Xu ve ark., transkriptom analizi yoluyla, kuraklığa dayanıklı soyada kuraklığa hassas çeşide göre daha az DEG tespit edilmiştir (Xu ve ark., 2023).

Kuraklık stresinde ABA biyosentezinde rol oynayan ZEP (GLYMA_11G055700) geni yeniden sulama ile 150-43 mutantında anlatım göstermezken Üstün ve 101-15 yeniden sulama gruplarında bu genin anlatımının azaldığı bulunmuştur.

ZEP'in artan ifadesi, fotosistemdeki serbest radikallerin üretiminin azalmasının soya fasulyesi bitkilerinin kuraklıkla başa çıkmak için kullandığı bir strateji olabileceğini göstermektedir (Xu ve ark., 2018).

Üstün, 101-15 ve Ataem yeniden sulamada ABF (GLYMA_04G039300) ve ABF2 (GLYMA_06G040400) genlerinin anlatımı azalırken 150-43 yeniden sulamada anlatım belirlenmemiştir. Diğer bir ABF (GLYMA_10G075000) geni yeniden sulama ile birlikte Üstün (+11,49 kat) ve 101-15'te (+14,83 kat) artış göstermiştir.

2022 yılında kuraklığa toleranslı ve hassas soya bitkilerinde gerçekleştirilen çalışmada ABF'lerin kuraklık stresinde anlatım artışı gösterdiği bulunmuştur. Bu sebeple ABA sinyal yolunda ABF ifadesinin kuraklık stresi tarafından indüklendiğini ve bitkilerin kuraklık toleransını pozitif olarak düzenlediğini tespit etmişlerdir (Xuan ve ark., 2022).

Kuraklık stresinde anlatımı artan iki PP2C geni (GLYMA_14G162100 ve GLYMA_19G069200) yeniden sulama ile birlikte Üstün yeniden sulamada -0,14 kat, 101-15 yeniden sulamada -0,25 kat ile anlatımda azalma göstermiştir. Ataem-07 ve mutanti olan 150-43 yeniden sulamada anlatım belirlenmemiştir.

PYR/PYL (GLYMA_01G124700) geni için de benzer şekilde yalnızca Üstün ve mutanti 101-15 yeniden sulamada anlatım belirlenmiştir. PYR/PYL (GLYMA_01G124700) geni Üstün yeniden sulamada +11,64 kat artarken 150-43 yeniden sulamada +9,57 kat artış göstermiştir. Kuraklık stresi altında anlatımı tespit

edilen gruplarda artış gösteren iki SnRK geni için yeniden sulamada da anlatımda değişim belirlenmiştir. Bu genler için kuraklık stresinden farklı olarak yeniden sulamada anlatımlarında azalma tespit edilmiştir. SnRK (GLYMA_17G148800) geninin anlatımı sadece Üstün yeniden sulamada (-0,28) belirlenirken diğer SnRK (GLYMA_09G066700) geninin Üstün (-0,38 kat) ve mutantı olan 101-15'te (-0,36 kat) anlatımı azalmıştır.

SNF1 ile ilişkili protein kinaz 2 (SnRK2) ve tip A protein fosfat 2C (PP2C-A) ailesi üyeleri, bitkilerdeki ABA sinyal iletim yolunun temel bileşenleridir ve bitkinin kuraklık stresine karşı toleransını artırmada önemli roller oynadıkları öne sürülmüştür, ancak bu fikri destekleyen genetik temeller soya için hala eksiktir (Shen ve ark., 2022). Kuraklık stresi altında ABA bağımlı sinyal iletiminde rol alan ABF (GLYMA_04G039300), ABF2 (GLYMA_06G040400), ABF (GLYMA_10G075000), PP2C (GLYMA_14G162100 ve GLYMA_19G069200), PYR/PYL (GLYMA_01G124700) ve SnRK (GLYMA_17G148800) genlerinin yeniden sulamadaki anlatım değişimleri kuraklıkta belirlenen anlatım profillerine zıt olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar doğrultusunda yeniden sulamanın kuraklık stresinin olumsuz etkilerini iyileştirebileceği belirlenmiştir.

Askorbat metabolizma ile ilişkili VTC4 geni (Glyma.09G011100) için yeniden sulama ile birlikte yalnızca Üstün (+8,58) ve 101-15 (+6,41) yeniden sulamada anlatım artışı tespit edilmiştir. Ataem ve 150-43 yeniden sulama gruplarında anlatım göstermemiştir. Li ve ark., tarafından gerçekleştirilen üç farklı kuraklık stresi (hafif, orta, şiddetli) uygulanan soyada bitkilerinde üç VTC4 geninin (Glyma.07G266200, Glyma.09G011100, Glyma.15G115500) orta ve şiddetli kuraklık stresi altında anlatımının arttığı bulunmuştur (Li ve ark., 2022b).

GLYMA_17G030400 (Glycine max stress-induced protein SAM22 (PR-10)), GLYMA_10G059200 (Glycine max alpha carbonic anhydrase 7) ve GLYMA_10G274400 (Glycine max 3-ketoacyl-CoA synthase 6) genleri için anlatım yalnızca 150-43 yeniden sulama grubunda tespit edilmiştir. GLYMA_17G030400, GLYMA_10G059200 genleri 150-43 yeniden sulamada sırasıyla -0,04 ve -0,03 kat olarak azalma göstermiştir.

Qu ve ark., tarafından soyada gerçekleştirilen çalışmada GmSAM22 geninin linoleik asit üretiminde rol oynayabileceği belirlenmiştir. Bu genin tohumlardaki aşırı anlatımı, soyada oleik asidinin içeriğini önemli ölçüde artırabildiği tespit edilmiştir (Qu ve ark., 2022). Geçtiğimiz yıllarda, tüm fotosentetik organizmalarda birçok fizyolojik süreçte yer alan karbonik anhidrazların işlevi hakkında kapsamlı araştırmalar yapılmıştır. Karbonik anhidrazlar organizmaların büyümesi ve gelişmesi sırasında fizyolojik süreçlerde temel roller oynar, çeşitli reaksiyonları katalize eder ve bunlardan en önemlisi çeşitli metabolik yollar için karbondioksit (CO_2) ve bikarbonatın (HCO_3^-) karşılıklı dönüşümüdür. Ayrıca, GmCA'ların anlatımları soyada farklı gelişim aşamalarında farklı dokularda değişiklik göstermiştir. Sekiz temsili GmCA'nın soyanın düşük fosfor stresine verdiği yanıtta rol oynayabileceğini göstermişlerdir (Wang ve ark., 2023)

Mutant 150-43 hattında kuraklık stresinden sonra yeniden yapılan sulamada GLYMA_10G274400 geni (*Glycine max* 3-ketoacyl-CoA synthase 6) +5,04 kat anlatım artışı göstermiştir.

KCS geni tarafından kodlanan 3-ketoasil-CoA sentaz, çok uzun zincirli yağ asitlerinin biyosentezinde yer alan enzimdir, ancak soya fasulyesindeki KCS gen ailesi şu ana kadar yeterince incelenmemiştir. Gong ve ark., tarafından yapılan çalışmada GmKCS genlerinin, soyanın çeşitli doku/organlarında farklı anlatım profilleri sergilediğini bulmuştur. Bazı KCS genlerinin farklı stres koşulları altında 5 kattan fazla anlatım gösterdiği tespit edilmiştir. Birçoğunun çeşitli abiyotik streslere yanıt verdiği bulunmuştur; bu da bunların soyanın stres adaptasyonu ve toleransı için önemli olabileceklerini göstermektedir (Gong ve ark., 2023).

101-15 ve 150-43 mutantları arasında ortak olarak anlatım yapan GLYMA_18G094600 (small heat shock protein) geninin anlatımı 101-15 yeniden sulamada -0,047 kat azalış gösterirken 150-43 yeniden sulamada +6,14 kat artış göstermiştir. Üstün ve mutanti olan 101-15'te anlatım belirlenmemiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda anlatımın en yüksek olduğu grup olan mutant 150-43'ün kuraklık stresin etkilerinden kurtulmak için biyolojik süreçlerin aktivasyonunu sağlamıştır.

sHSP'ler genellikle çeşitli stres koşulları altında protein homeostazını korumak için hedef proteinlerinin agregasyonunu önleyen oligomerler oluşturabilen moleküler şaperonlar olarak işlev görür. Bu sayede oksidatif stres, hücre döngüsü ve bitki gelişimi gibi birçok biyolojik sürecin düzenlenmesinde rol oynar (Yang ve ark., 2022).

GLYMA_01G178800 (*Glycine max* probable vacuolar amino acid transporter YPQ1) geninde de benzer şekilde 101-15 yeniden sulamada -0,28 kat azalış belirlenirken 150-43 yeniden sulamada +2,35 kat artış belirlenmiştir. Başka bir aminoasit transporter geni olan GLYMA_16G142300 (*Glycine max* lysosomal amino acid transporter 1) için anlatım yalnızca 150-43 (+6,94) yeniden sulama grubunda tespit edilmiştir.

Amino asit taşıyıcıları (AAT'ler), uzun mesafeli amino asit taşınmasında görevlidir. Bitki büyümesini, gelişimini ve abiyotik streslere verilen yanıtları düzenleyen biyolojik süreçlere katılırlar. Birçok AAT geninin, özellikle prolin, betain, GABA ve çeşitli karbonhidratlar gibi stresle ilişkili bileşiklerin taşınmasını kolaylaştırarak bitkilerdeki su stresi koşullarını hafifletmede rol oynadığı belirlenmiştir (Cheng ve ark., 2016).

Elde edilen bulgulara göre belirlenen genler soyada abiyotik stres adaptasyonu ve direncinde yaygın olarak rol oynayabilir.

Bu tez kapsamında kuraklık stresine yanıt ile ilgili NFYA5 transkripsiyon faktörü ele alınarak RNA dizileme sonuçlarının doğrulanması amacıyla qRT-PZR ile validasyon gerçekleştirilmiştir. NFYA5 gen ifadesindeki en büyük artış 150-43 kuraklık bitkilerinde belirlenmiştir. Benzer şekilde kuraklık stresinden sonra bitkilerin iyileşme yeteneklerinin değerlendirilmesi amacıyla gerçekleştirilen yeniden sulama uygulamasında 150-43 yeniden sulama grubu kontrol bitkilerine en yakın değer olarak belirlenmiştir. Bu bulgular tez kapsamında gerçekleştirilen fizyolojik ve biyokimyasal uygulamaları destekler niteliktedir. NF-Y'ler, kuraklık stresine ABA'ya bağlı yanıt olarak bilinen ABA sentezini veya ABA sinyallerine yanıtı düzenlemede yer almaktadır (Kishor ve ark.,2023). NF-Y, ABA bağımlı yolak dışında aynı zamanda ABA'ya bağımlı olmayan aktiviteyi de düzenleyerek, özellikle bitkinin fotosentetik etkinliğini iyileştirerek ve antioksidan enzim aktivitesini artırarak kuraklığa karşı toleransını arttırmaktadır (Ma ve ark., 2020b; Zhang ve ark., 2023; Siriwardana, 2025).

NF-YA5 transkriptleri, ABA'ya bağlı bir şekilde kuraklığa tepki olarak artmaktadır. Ayrıca, NF-YA5'in gen anlatımının yüksek olduğu bitkiler kuraklığa dayanıklıyken, NFYA5 mutantları duyarlı olarak tespit edilmiştir (Siriwardana ve ark., 2014). NF-Y geninin ABA, tuz ve kuraklık stresleri tarafından indüklenebildiğini ve bu genlerin ABA'ya bağımlı olduğu bu sebeple bazı NF-Y'lerin ABA ile ilişkili yollarda yer alabileceğini ortaya çıkarılmıştır. 2020 yılında gerçekleştirilen çalışmada GmNFYA5

aracılı ABA'ya bağımlı genlerin (ABI2, ABI3, NCED3, LEA3, GmWRKY46, GmNCED2 ve GmbZIP1) ve ABA'dan bağımsız genlerin (DREB1A, DREB2A, GmDREB1, GmDREB2) kuraklık stresine yanıtta rol oynadığı bulunmuştur (Ma ve ark., 2020b). Soyada abiyotik stres faktörü olan GmNFYA5'in anlatım profilleri, tez kapsamında elde edilen fiyolojik biyokimyasal ve transkriptomdaki değişimler ile birlikte değerlendirildiğinde NFYA5'in hedef transkripsiyon faktörlerine bağlanarak özellikle ABA bağımlı yolda rol oynayabileceği, KEGG ve GO analizleri kapsamında elde edilen veriler ile fotosentetik, antioksidan sistemin aktivasyonu ve ABA bağımsız genlerin (RD22, RD29A ve HDZIP) regülasyonu ile ABA'dan bağımsız bir şekilde de kuraklık stresine yanıtta rol oynayabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışmada Üstün, Ataem-07 bitkilerinde ve bu bitkilerin mutantlarında (101-15 ve 150-43) NFYA5 aracılı kuraklık stresinin yanıtları ve yeniden sulamanın etkisi gösterilmiştir. Üstün, Ataem-07, 101-15 ve 150-43 soya bitkilerinde gerçekleştirilen bu çalışma GmNFYA5'in anlatım profilleri ve transkriptomdaki değişimler ile mutant bitkilerin kuraklık stresine karşı moleküler cevaplarını değerlendiren ilk çalışmadır. Kuraklık toleransını iyileştirmek için 150-43 hattı soya ıslah programları için umut verici genetik kaynak sağlayabilir.

Bu tez kapsamında,

- 1- Kuraklık stresi ile boy uzunluklarında azalma, yapraklarda ise sararma ve kıvrılmalar gözlemlenmiştir. Yeniden sulama uygulaması ile bitkilerde meydana gelen bu hasarların iyileştiği gözlemlenmiştir.
- 2- Kuraklık stres altında MDA ve prolin içeriklerinde kontrol grubuna kıyasla kuraklık gruplarında anlamlı artışlar tespit edilirken total klorofil içeriğinde anlamlı azalmalar tespit edilmiştir. Yeniden sulama uygulaması sonrasında kuraklık stresi etkilerinin iyileşmesi en iyi 150-43 mutantlarında tespit edilmiştir.
- 3- Kuraklık stresinde ABA bağımlı ve ABA bağımsız yollarda rol oynayan NFYA5 geninin gen anlatım profilleri tüm bitki gruplarında artarken en yüksek artış 150-43'te belirlenirken yeniden sulama ile birlikte 0,8 kat ile kontrol bitkilerine en yakın değer olarak belirlenmiştir.

4. Kuraklık stresi altında farklı anlatım gösteren genler ve bu genlerin rol oynadığı yollar RNA sekanslama ile belirlenmiştir.

5- Kuraklık stresi yanıtında ABA bağımlı ve ABA bağımsız yollarda rol oynayan genler Üstün-1, 101-15, Ataem ve 150-43 soya bitkilerinde bulunmuştur.

6- 150-43 mutantının diğer soya çeşitlerine ve 101-15'e kıyasla kuraklığa dayanıklı olduğu bulunmuştur. Kuraklık stresindeki 150-43 mutantının diğer iki çeşit ve 101-15'e göre yeniden sulama ile iyileşme yeteneğinin daha yüksek olduğu saptanmıştır.



6. KAYNAKÇA

- 1) Ahmad P, Rasool S, Gul A, Sheikh SA, Akram NA, Ashraf M, Kazi AM, Guzel S. (2016). Jasmonates: Multifunctional Roles in Stress Tolerance. *Front Plant Sci.* 2016 Jun 15;7:813. doi: 10.3389/fpls.2016.00813. PMID: 27379115; PMCID: PMC4908892.
- 2) Aleem, M., Riaz, A., Raza, Q., Aleem, M., Aslam, M., Kong, K., ... & Zhao, T. (2022). Genome-wide characterization and functional analysis of class III peroxidase gene family in soybean reveal regulatory roles of GsPOD40 in drought tolerance. *Genomics*, 114(1), 45-60.
- 3) Ali, S., Hayat, K., Iqbal, A., & Xie, L. (2020). Implications of Absciscic Acid in the Drought Stress Tolerance of Plants. *Agronomy*, 10(9), 1323. <https://doi.org/10.3390/agronomy10091323>
- 4) Anzano, A., Bonanomi, G., Mazzoleni, S. Lanzotti, V., (2022). Plant metabolomics in biotic and abiotic stress: a critical overview. *Phytochem Rev* 21, 503–524
- 5) Arya, H., Singh, M. B., & Bhalla, P. L. (2021). Towards developing drought-smart soybeans. *Frontiers in Plant Science*, 12, 750664.
- 6) Atak, Ç., Çelik, Ö., Gümüş, T., Meriç, S., Ayan, A., & Erdoğan, M. (2024). Physiological characterization and assessment of genetic variability, yield, and quality properties of gamma-ray-induced salinity tolerant soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) mutants. *Journal of Applied Botany & Food Quality*, 97.
- 7) Basim H., Basim E., Tombuloglu H., Unver T. (2021). Comparative transcriptome analysis of resistant and cultivated tomato lines in response to *Clavibacter michiganensis* subsp. *Genomics* 113 (4), 2455–2467. 10.1016/j.ygeno.2021.05.033
- 8) Bastidas, A. M., Setiyono, T. D., Dobermann, A., Cassman, K. G., Elmore, R. W., Graef, G. L., & Specht, J. E. (2008). Soybean Sowing Date: The Vegetative, Reproductive, and Agronomic Impacts. *Crop Science*, 48(2), 727. doi:10.2135/cropsci2006.05.0292

- 9) Bates, L.S., Waldren, R.P. & Teare, I.D. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant Soil* 39, 205–207 <https://doi.org/10.1007/BF00018060>
- 10) Bielorai, H., & Hopmans, P. A. M. (1975). Recovery of leaf water potential, transpiration, and photosynthesis of cotton during irrigation cycles. *Agronomy Journal*, 67(5), 629-632.
- 11) Bisht, A., Saini, D. K., Kaur, B., Batra, R., Kaur, S., Kaur, I., ... & Siddique, K. H. (2023). Multi-omics assisted breeding for biotic stress resistance in soybean. *Molecular Biology Reports*, 50(4), 3787-3814.
- 12) Bolger, A.M., Marc L, & Bjoern U. (2014). “Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data.” *Bioinformatics* 30 (15): 2114–20. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>.
- 13) Chen LM, Zhou XA, Li WB, Chang W, Zhou R, Wang C, Sha AH, Shan ZH, Zhang CJ, Qiu DZ, Yang ZL, Chen SL. (2013). Genome-wide transcriptional analysis of two soybean genotypes under dehydration and rehydration conditions. *BMC Genomics*. 2013 Oct 6;14:687. doi: 10.1186/1471-2164-14-687.
- 14) Chen M, Li K, Li H, Song CP, Miao Y. (2017). The Glutathione Peroxidase Gene Family in *Gossypium hirsutum*: Genome-Wide Identification, Classification, Gene Expression and Functional Analysis. *Sci Rep*. 2017 Mar 16;7:44743. doi: 10.1038/srep44743. PMID: 28300195; PMCID: PMC5353742.
- 15) Chen, L., Yang, H., Fang, Y., Guo, W., Chen, H., Zhang, X., ... & Cao, D. (2021a). Overexpression of GmMYB14 improves high-density yield and drought tolerance of soybean through regulating plant architecture mediated by the brassinosteroid pathway. *Plant biotechnology journal*, 19(4), 702-716.
- 16) Chen, Z., Fang, X., Yuan, X., Zhang, Y., Li, H., Zhou, Y., & Cui, X. (2021b). Overexpression of transcription factor GmTGA15 enhances drought tolerance in transgenic soybean hairy roots and *Arabidopsis* plants. *Agronomy*, 11(1), 170.

- 17) Cheng L, Yuan HY, Ren R, Zhao SQ, Han YP, Zhou QY, Ke DX, Wang YX, Wang L.(2016). Genome-Wide Identification, Classification, and Expression Analysis of Amino Acid Transporter Gene Family in Glycine Max. *Front Plant Sci.* 2016 Apr 20;7:515. doi: 10.3389/fpls.2016.00515. PMID: 27148336; PMCID: PMC4837150.
- 18) Dodd IC (2013) Absciscic acid and stomatal closure: a hydraulic conductance conundrum? *New Phytol* 197:6–8. <https://doi.org/10.1111/nph.12052>
- 19) Dong, S., Jiang, Y., Dong, Y., Wang, L., Wang, W., Ma, Z., Yan, C., Ma, C., Liu, L. (2019). A study on soybean responses to drought stress and rehydration. *Saudi Journal of Biological Sciences.* doi:10.1016/j.sjbs.2019.08.005
- 20) Du, Y., Zhao, Q., Chen, L., Yao, X., & Xie, F. (2020). Effect of Drought Stress at Reproductive Stages on Growth and Nitrogen Metabolism in Soybean. *Agronomy*, 10(2), 302. <https://doi.org/10.3390/agronomy10020302>
- 21) Dubey A, Kumar A, Malla MA, Chowdhary K, Singh G, Ravikanth G, Harish, Sharma S, Saati-Santamaria Z, Menéndez E, Dames JF. (2021). Approaches for the amelioration of adverse effects of drought stress on crop plants. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2021 Oct 30;26(10):928-947. doi: 10.52586/4998. PMID: 34719216.
- 22) Endres, G. J. Berglund, D. R., McWilliams, D. A., (1999). Soybean growth and management quick guide. 14 Nisan 2024 < <https://www.ndsu.edu/agriculture/extension/publications/soybean-growth-and-management-quick-guide>>
- 23) Fan J, Zhang Y, Sun H, Duan R, Jiang Y, Wang X, Sun Y, Luo Z, Wang P, Guan S, Liu S, Fan X, Jiao P, Wang Y, Yang J, Zhang Z, Yu H. (2024). Overexpression of soybean GmDHN9 gene enhances drought resistance of transgenic Arabidopsis. *GM Crops Food*. 2024 Dec 31;15(1):118-129. doi: 10.1080/21645698.2024.2327116. Epub 2024 Apr 2. PMID: 38564429; PMCID: PMC10989702.

- 24) Feng L, Liu H, Liu Y, Lu ZK, Guo GW, Guo SP, Zheng HW, Gao YN, Cheng SJ, Wang J. (2010) Power of deep sequencing and agilent microarray for gene expression profiling study. *Mol Biotechnol.* 2010;45:101–110. doi: 10.1007/s12033-010-9249-6.
- 25) Feng, Z., Ding, C., Li, W., Wang, D., & Cui, D. (2019). Applications of metabolomics in the research of soybean plant under abiotic stress. *Food Chemistry*, 125914. doi:10.1016/j.foodchem.2019.125914.
- 26) Fraga OT, de Melo BP, Quadros IPS, Reis PAB, Fontes EPB. (2021). Senescence-Associated Glycine max (Gm)NAC Genes: Integration of Natural and Stress-Induced Leaf Senescence. *Int J Mol Sci.* 2021 Aug 1;22(15):8287. doi: 10.3390/ijms22158287. PMID: 34361053; PMCID: PMC8348617.
- 27) Freitas, V. F., Cerezini, P., Hungria, M., & Nogueira, M. A. (2022). Strategies to deal with drought-stress in biological nitrogen fixation in soybean. *Applied Soil Ecology*, 172, 104352.
- 28) Gong Y, Wang D, Xie H, Zhao Z, Chen Y, Zhang D, Jiao Y, Shi M, Lv P, Sha Q, Yang J, Chu P, Sun Y. (2023). Genome-wide identification and expression analysis of the KCS gene family in soybean (*Glycine max*) reveal their potential roles in response to abiotic stress. *Front Plant Sci.* 2023 Dec 5;14:1291731. doi: 10.3389/fpls.2023.1291731. PMID: 38116151; PMCID: PMC10728876.
- 29) Gupta, K., Mishra, S. K., Gupta, S., Pandey, S., Panigrahi, J., & Wani, S. H. (2021). Functional role of miRNAs: key players in soybean improvement. *Phyton*, 90(5), 1339.
- 30) Ha, S., Vankova, R., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., & Tran, L. S. P. (2012). Cytokinins: metabolism and function in plant adaptation to environmental stresses. *Trends in plant science*, 17(3), 172-179.
- 31) Hackenberg D, Keetman U, Grimm B. (2012). Homologous NF-YC2 subunit from Arabidopsis and tobacco is activated by photooxidative stress and induces flowering. *Int J Mol Sci.* 13(3):3458-3477. doi: 10.3390/ijms13033458. Epub 2012 Mar 13. PMID: 22489162; PMCID: PMC3317722

- 32) Haghpanah, M., Hashemipetroudi, S., Arzani, A., & Araniti, F. (2024). Drought Tolerance in Plants: Physiological and Molecular Responses. *Plants*, 13(21), 2962. <https://doi.org/10.3390/plants13212962>
- 33) Han, X.; Tang, S.; An, Y.; Zheng, D.-C.; Xia, X.-L.; Yin, W.-L. (2013). Overexpression of the poplar NF-YB7 transcription factor confers drought tolerance and improves water-use efficiency in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* 2013, 64,
- 34) Haq, S. A. U., Bashir, T., Roberts, T. H., & Husaini, A. M. (2024). Ameliorating the effects of multiple stresses on agronomic traits in crops: Modern biotechnological and omics approaches. *Molecular Biology Reports*, 51(1), 41.
- 35) Hodgson, EW & McCornack, Brian & Tilmon, KJ & Knodel, Janet. (2012). Management Recommendations for Soybean Aphid (Hemiptera: Aphididae) in the United States. *J Int Pest Manag.* 3. 10.1603/IPM11019.
- 36) Ilyas, M., Nisar, M., Khan, N., Hazrat, A., Khan, AA.H., Hayat, K., Fahad, S., Khan, A., Ullah, A. (2021). Drought Tolerance Strategies in Plants: A Mechanistic Approach. *J Plant Growth Regul* 40, 926–944 <https://doi.org/10.1007/s00344-020-10174-5>
- 37) Iqbal HMN, Kyazze G, Keshavarz T (2013) Advances in the valorization of Lignocellulosic materials by biotechnology: an overview. *Bio Resour* 8:3157–3176
- 38) Iqbal, M.S., Singh, A.K., Ansari, M.I. (2020). Effect of Drought Stress on Crop Production. In: Rakshit, A., Singh, H., Singh, A., Singh, U., Fraceto, L. (eds) *New Frontiers in Stress Management for Durable Agriculture*. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-15-1322-0_3
- 39) Joshi R, Wani SH, Singh B, Bohra A, Dar ZA, Lone AA, Pareek A, Singla-Pareek SL. (2016). Transcription Factors and Plants Response to Drought Stress: Current Understanding and Future Directions. *Front Plant Sci.* 2016 Jul 14;7:1029. doi: 10.3389/fpls.2016.01029. PMID: 27471513; PMCID: PMC4943945

- 40) Kerr, T. C. C., Abdel-Mageed, H., Aleman, L., Lee, J., Payton, P., Cryer, D., et al. (2018). Ectopic expression of two AREB/ABF orthologs increases drought tolerance in cotton (*Gossypium hirsutum*). *Plant Cell Environ.* 41, 898–907. doi:10.1111/pce.12906
- 41) Kim, T., Hwang, H., Bang, G., Ha, J., Park, Y. J., & Kim, J. Y. (2024). Understanding the molecular mechanisms of drought tolerance in wild soybean (*Glycine soja*) through multi-omics-based alternative splicing predictions. *Environmental and Experimental Botany*, 225, 105872.)
- 42) Kishor, K.P.B., Ganie, S.A., Wani, S.H. Guddimalli, R., Karumanchi, R.A., Edupuganti, S., Jalaja Naravula, J., Kumar, V., Polavarapu R., Penna S. (2023) Nuclear Factor-Y (NF-Y): Developmental and Stress-Responsive Roles in the Plant Lineage. *J Plant Growth Regul* 42, 2711–2735. <https://doi.org/10.1007/s00344-022-10739-6>
- 43) Kulcheski, F. R., de Oliveira, L. F., Molina, L. G., Almerão, M. P., Rodrigues, F. A., Marcolino, J., Margis, R. (2011). Identification of novel soybean microRNAs involved in abiotic and biotic stresses. *BMC Genomics*, 12(1). doi:10.1186/1471-2164-12-307
- 44) Lam HM, Xu X, Liu X, Chen W, Yang G, Wong FL, Li MW, He W, Qin N, Wang B, Li J, Jian M, Wang J, Shao G, Wang J, Sun SS, Zhang G. (2010). Resequencing of 31 wild and cultivated soybean genomes identifies patterns of genetic diversity and selection. *Nature genetics*, 42(12), 1053-1059. doi: 10.1038/ng.715. PMID: 21076406.
- 45) Li WX, Oono Y, Zhu J, He XJ, Wu JM, Iida K, Lu XY, Cui X, Jin H, Zhu JK. (2008). The Arabidopsis NFYA5 transcription factor is regulated transcriptionally and posttranscriptionally to promote drought resistance. *Plant Cell*. 20(8):2238-51. doi: 10.1105/tpc.108.059444. Epub 2008 Aug 5. PMID: 18682547; PMCID: PMC2553615
- 46) Li X, Pang Y, Zhong Y, Cai Z, Ma Q, Wen K, Nian H. (2023). *GmGSTU23* Encoding a Tau Class Glutathione S-Transferase Protein Enhances the Salt Tolerance of Soybean (*Glycine max* L.). *Int J Mol Sci*. 2023 Mar 14;24(6):5547. doi: 10.3390/ijms24065547. PMID: 36982621; PMCID: PMC10058988.

- 47) Li Y, Yang Z, Zhang Y, Guo J, Liu L, Wang C, Wang B, Han G. (2022a). The roles of HD-ZIP proteins in plant abiotic stress tolerance. *Front Plant Sci.* 2022 Oct 12;13:1027071. doi: 10.3389/fpls.2022.1027071. PMID: 36311122; PMCID: PMC9598875.
- 48) Li, M., Li, H., Sun, A., Wang, L., Ren, C., Liu, J., & Gao, X. (2022b). Transcriptome analysis reveals key drought-stress-responsive genes in soybean. *Frontiers in Genetics*, 13, 1060529.
- 49) Liu S, Zhang M, Feng F, Tian Z. (2020). Toward a "Green Revolution" for Soybean. *Mol Plant.* May 4;13(5):688-697. doi: 10.1016/j.molp.2020.03.002. Epub 2020 Mar 11. PMID: 32171732.
- 50) Liu, X. Q., Chen, A. P., Wang, Y. X., Jin, G. L., Zhang, Y. H., Gu, L. L., et al. (2022). Physiological and transcriptomic insights into adaptive responses of *Seriphidium transiliense* seedlings to drought stress. *Environ. Exp. Bot.* 194, 104736. doi:10.1016/j.envexpbot.2021.104736
- 51) Liu,P., Xu, Z-S., Lu, P-P., Hu, D., Chen, M., Li, L-C., Ma, Y-Z. (2013). A wheat PI4K gene whose product possesses threonine autophosphorylation activity confers tolerance to drought and salt in Arabidopsis, *Journal of Experimental Botany*, Volume 64, Issue 10,Pages 2915–2927.
- 52) Lu L, Wei W, Tao JJ, Lu X, Bian XH, Hu Y, Cheng T, Yin CC, Zhang WK, Chen SY, Zhang JS. (2021). Nuclear factor Y subunit Gm competes with GmHDA13 for interaction with GmFVE to positively regulate salt tolerance in soybean. *Plant Biotechnol J.* Nov;19(11):2362-2379. doi: 10.1111/pbi.13668. Epub 2021 Aug 2. PMID: 34265872; PMCID: PMC8541785.
- 53) Lv, S., Yang, A., Zhang, K., Wang, L., Zhang, J. (2007). Increase of glycinebetaine synthesis improves drought tolerance in cotton. *Mol Breeding* 20, 233–248
- 54) Ma, X.-J., Fu, J.-D., Tang, Y.-M., Yu, T.-F., Yin, Z.-G., Chen, J., Zhou Y.-B, Chen, M., Ma, Y.-Z., Zhang, J-H., Xu, Z-S. (2020a). GmNFYA13 Improves Salt and Drought Tolerance in Transgenic Soybean Plants. *Frontiers in Plant Science*, 11. doi:10.3389/fpls.2020.587244

- 55) Ma, XJ., Yu, TF., Li, XH. *et al.* (2020b). Overexpression of *GmNFYA5* confers drought tolerance to transgenic Arabidopsis and soybean plants. *BMC Plant Biol* **20**, 123 (2020). <https://doi.org/10.1186/s12870-020-02337-z>
- 56) Marinho, J. P., Pagliarini, R. F., Molinari, M. D. C., Marcolino-Gomes, J., Caranhoto, A. L. H., Marin, S. R. R., ... & Mertz-Henning, L. M. (2022). Overexpression of full-length and partial DREB2A enhances soybean drought tolerance. *Agronomy Science and Biotechnology*, 8, 1-21.
- 57) Melo, B.P., Carpinetti, P. d. A., Fraga, O. T., Rodrigues-Silva, P. L., Fioresi, V. S., de Camargos, L. F., & Ferreira, M. F. d. S. (2022). Abiotic Stresses in Plants and Their Markers: A Practice View of Plant Stress Responses and Programmed Cell Death Mechanisms. *Plants*, 11(9), 1100. <https://doi.org/10.3390/plants11091100>
- 58) Melo, B.P., Lourenço-Tessutti, I.T., Paixão, J.F.R., Noriega, D.D., Silva, MC.M., Almeida-Engler, J., Fontes, E.P.B, Grosi-de-sa, M.F. (2020). Transcriptional modulation of AREB-1 by CRISPRa improves plant physiological performance under severe water deficit. *Sci Rep* 10, 16231 <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72464-y>
- 59) Melo, B.P.; Moura, S.M.; Morgante, C.V.; Pinheiro, D.H.; Alves, N.S.F.; Rodrigues-Silva, P.L.; Lourenço-Tessutti, I.T.; Andrade, R.V.; Fragoso, R.R.; Grossi-de-Sa, M.F. (2021). Regulated promoters applied to plant engineering: An insight over promising soybean promoters under biotic stress and their cis-elements. *Biotechnol. Res. Innov.* 2021, 5, e2021005.)
- 60) Muhammad Aslam, M., Waseem, M., Jakada, B. H., Okal, E. J., Lei, Z., Saqib, H. S. A., Yuan, W., Xu, W., & Zhang, Q. (2022). Mechanisms of Absciscic Acid-Mediated Drought Stress Responses in Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3), 1084. <https://doi.org/10.3390/ijms23031084> Zhang H, Zhu J, Gong Z, Zhu JK. Abiotic stress responses in plants. *Nat Rev Genet.* 2022;23:104–119. doi: 10.1038/s41576-021-00413-0

- 61) Myers, Z.A.; Holt, B.F., (2018). NUCLEAR FACTOR-Y: Still complex after all these years? *Curr. Opin. Plant Biol.* 2018
- 62) Nguyen, Q. H., Vu, L. T. K., Nguyen, L. T. N., Pham, N. T. T., Nguyen, Y. T. H., Le, S. V., & Chu, M. H. (2019). Overexpression of the GmDREB6 gene enhances proline accumulation and salt tolerance in genetically modified soybean plants. *Scientific Reports*, 9(1). doi:10.1038/s41598-019-55895-0
- 63) Ni, Z., Hu, Z., Jiang, Q., Zhang H. (2013). GmNFYA3, a target gene of miR169, is a positive regulator of plant tolerance to drought stress. *Plant Mol Biol* 82, 113–129. <https://doi.org/10.1007/s11103-013-0040-5>
- 64) Ning, W., Zhai, H., Yu, J, Liang, S., Yang, X., Xing, X., Huo, J., Pang T., Yang, Y., Bai, X. (2017). Overexpression of Glycine soja WRKY20 enhances drought tolerance and improves plant yields under drought stress in transgenic soybean. *Mol Breeding* 37, 19. <https://doi.org/10.1007/s11032-016-0614-4>
- 65) Nleya, T., Sexton, P., Gustafson, K., & Miller, J. M. (2013). Soybean growth stages. *IGrow soybean: Best Management Practices for soybean production*
- 66) Özcan, M. Ürün Raporu Soya. (2024). Tarım Reformu Genel Müdürlüğü Tarımsal Ekonomi Ve Politika Geliştirme Enstitüsü Trgm/Tepge. TEPGE YAYIN NO: 407 ISBN: 978-625-95521-3-2, 14 Şubat 2025.<<https://arastirma.tarimorman.gov.tr/tepge/Belgeler/PDF%20%C3%9Cr%C3%BCn%20Raporlar%C4%B1/2024%20%C3%9Cr%C3%BCn%20Raporlar%C4%B1/Soya%20%C3%9Cr%C3%BCn%20Raporu%202024-407%20TEPGE.pdf>>
- 67) Poku, S. A., Chukwurah, P. N., Aung, H. H., & Nakamura, I. (2021). Knockdown of GmSOG1 compromises drought tolerance in transgenic soybean lines. *American Journal of Plant Sciences*, 12(1), 18-36.
- 68) 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.

- 69) Qiu, Z., Wang, L., & Zhou, Q. (2013). Effects of bisphenol A on growth, photosynthesis and chlorophyll fluorescence in above-ground organs of soybean seedlings. *Chemosphere*, 90(3), 1274-1280. doi:10.1016/j.chemosphere.2012.09.085
- 70) Qu, S., Cai, Q., Cui, H., Abraham, L., Jiao, Y., Ma, G., Wang, P. (2022). Bioinformatics and Functional Analysis of High Oleic Acid-Related Gene GmSAM22 in Soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]. *Phyton*. 92. 501-519. 10.32604/phyton.2022.023479.
- 71) Quach, T.N., Nguyen, H.T.M., Valliyodan, B., Joshi, T., Xu, D., Nguyen, H.T. (2015). Genome-wide expression analysis of soybean NF-Y genes reveals potential function in development and drought response. *Mol Genet Genomics* 290, 1095–1115 <https://doi.org/10.1007/s00438-014-0978-2>
- 72) Rasheed, A., Mahmood, A., Maqbool, R., Albaqami, M., Sher, A., Sattar, A., Bakhsh, G., Nawaz, M., Hassan, M. U., Al-Yahyai, R., Aamer, M., Li, H., & Wu, Z. (2022). Key insights to develop drought-resilient soybean: A review. *Journal of King Saud University - Science*, 34(5), Article102089. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2022.102089>
- 73) Ray, D. K., Mueller, N. D., West, P. C., & Foley, J. A. (2013). Yield trends are insufficient to improve crop yield: current and future strategies. *PLoS ONE*, 19, e66428.
- 74) Rizzo, G., & Baroni, L. (2018). Soy, Soy Foods and Their Role in Vegetarian Diets. *Nutrients*, 10(1), 43. doi:10.3390/nu10010043
- 75) Robinson, M. D., D. J. McCarthy, and G. K. Smyth. (2010). “edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data.” *Bioinformatics* 26 (1): 139–40.
- 76) Seleiman, M. F., Al-Suhaibani, N., Ali, N., Akmal, M., Alotaibi, M., Refay, Y., Dindaroglu, T., Abdul-Wajid, H. H., & Battaglia, M. L. (2021). Drought Stress Impacts on Plants and Different Approaches to Alleviate Its Adverse Effects. *Plants*, 10(2), 259. <https://doi.org/10.3390/plants10020259>

- 77) Shaffique S, Hussain S, Kang SM, Imran M, Injamum-Ul-Hoque M, Khan MA, Lee IJ (2023). Phytohormonal modulation of the drought stress in soybean: outlook, research progress, and cross-talk. *Front Plant Sci.* Oct 20;14:1237295. doi: 10.3389/fpls.2023.1237295. PMID: 37929163; PMCID: PMC10623132.
- 78) Shaffique, S., Farooq, M., Kang, SM. Lee, I.J. (2024). Recent Advances in Biochemical Reprogramming Network Under Drought Stress in Soybean. *J Soil Sci Plant Nutr* 24, 1692–1703
- 79) Sharma, A.; Kumar, V.; Shahzad, B.; Ramakrishnan, M.; Sidhu, G.P.S.; Bali, A.S.; Handa, N.; Kapoor, D.; Yadav, P.; Khanna, K. (2020). Photosynthetic response of plants under different abiotic stresses: A review. *J. Plant Growth Regul.*, 39, 509–531.
- 80) Shen X, Nan H, Jiang Y, Zhou Y, Pan X. (2022). Genome-Wide Identification, Expression and Interaction Analysis of GmSnRK2 and Type A PP2C Genes in Response to Absciscic Acid Treatment and Drought Stress in Soybean Plant. *Int J Mol Sci.* 2022 Oct 29;23(21):13166. doi: 10.3390/ijms232113166. PMID: 36361951; PMCID: PMC9653956.
- 81) Singh, D., & Laxmi, A. (2015). Transcriptional regulation of drought response: a tortuous network of transcriptional factors. *Frontiers in plant science*, 6, 895.
- 82) Singh, P. K., Indoliya, Y., Agrawal, L., Awasthi, S., Deeba, F., Dwivedi, S., Chakrabarty, D., Shirke, P.A., Pandey, V., Singh, N., Dhankher, O.M., Barik, S.K & Tripathi, R. D. (2022). Genomic and proteomic responses to drought stress and biotechnological interventions for enhanced drought tolerance in plants. *Current Plant Biology*, 29, 100239
- 83) Sintaha, M., Man, C. -K., Yung, W. -S., Duan, S., Li, M. -W., & Lam, H. -M. (2022). Drought Stress Priming Improved the Drought Tolerance of Soybean. *Plants*, 11(21), 2954. <https://doi.org/10.3390/plants11212954>
- 84) Siriwardana CL, Kumimoto RW, Jones DS, Holt BF 3rd. (2014). Gene Family Analysis of the Arabidopsis NF-YA Transcription Factors Reveals Opposing Absciscic Acid Responses During Seed Germination. *Plant Mol Biol Report.* 2014;32(5):971-986. doi: 10.1007/s11105-014-0704-6. PMID: 25190903; PMCID: PMC4149875.

- 85) Siriwardana, C. L. (2025). Plant Nuclear Factor Y (NF-Y) Transcription Factors: Evolving Insights into Biological Functions and Gene Expansion. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(1), 38. <https://doi.org/10.3390/ijms26010038>
- 86) Soma, Fumiyuki, Fuminori Takahashi, Kazuko Yamaguchi-Shinozaki, and Kazuo Shinozaki. (2021). "Cellular Phosphorylation Signaling and Gene Expression in Drought Stress Responses: ABA-Dependent and ABA-Independent Regulatory Systems" *Plants* 10, no. 4: 756. <https://doi.org/10.3390/plants10040756>)
- 87) Sun, M., Li, Y., Zheng, J., Wu, D., Li, C., Li, Z., Zang, Z., Zhang, Y., Fang, Q., Li, W., Han, Y., Zhao, X., & Li, Y. (2022). A Nuclear Factor Y-B Transcription Factor, GmNFYB17, Regulates Resistance to Drought Stress in Soybean. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(13), 7242. <https://doi.org/10.3390/ijms23137242>
- 88) Villalobos-López MA, Arroyo-Becerra A, Quintero-Jiménez A, Iturriaga G. (2022) Biotechnological Advances to Improve Abiotic Stress Tolerance in Crops. *Int J Mol Sci.* 2022 Oct 10;23(19):12053. doi: 10.3390/ijms231912053. PMID: 36233352; PMCID: PMC9570234.
- 89) Wang, F., Chen, H. W., Li, Q. T., Wei, W., Li, W., Zhang, W. K., ... & Chen, S. Y. (2015). Gm WRKY 27 interacts with Gm MYB 174 to reduce expression of Gm NAC 29 for stress tolerance in soybean plants. *The Plant Journal*, 83(2), 224-236.
- 90) Wang, K., Bu, T., Cheng, Q., Dong, L., Su, T., Chen, Z., ... & Li, M. (2021). Two homologous LHY pairs negatively control soybean drought tolerance by repressing the abscisic acid responses. *New Phytologist*, 229(5), 2660-2675.
- 91) Wang, L., Zhang, J., Wang, R. *et al.* (2023). Genome-wide identification, evolution, and expression analysis of carbonic anhydrases genes in soybean (*Glycine max*). *Funct Integr Genomics* **23**, 37 (2023). <https://doi.org/10.1007/s10142-023-00966-9>
- 92) Wang, X., Wu, Z., Zhou, Q., Wang, X., Song, S., & Dong, S. (2022). Physiological response of soybean plants to water deficit. *Frontiers in Plant Science*, 12, 809692.

- 93) 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. doi:10.3390/agronomy11071430
- 94) Wenkel, S., Turck, F., Singer, K., Gissot, L., Le Gourrierec, J., Samach, A., & Coupland, G. (2006). CONSTANS and the CCAAT Box Binding Complex Share a Functionally Important Domain and Interact to Regulate Flowering of Arabidopsis. *THE PLANT CELL ONLINE*, 18(11), 2971–2984. doi:10.1105/tpc.106.043299
- 95) 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. <https://doi.org/10.3390/f13020324>
- 96) Xing, X., Cao, C., Xu, Z., Qi, Y., Fei, T., Jiang H., Wang X. (2023). Reduced Soybean Water Stress Tolerance by miR393a-Mediated Repression of GmTIR1 and Absciscic Acid Accumulation. *J Plant Growth Regul* 42, 1067–1083. <https://doi.org/10.1007/s00344-022-10614-4>
- 97) Xu Y, Song D, Qi X, Asad M, Wang S, Tong X, Jiang Y, Wang S. (2023) Physiological responses and transcriptome analysis of soybean under gradual water deficit. *Front Plant Sci.* 2023 Oct 26;14:1269884. doi: 10.3389/fpls.2023.1269884. PMID: 37954991; PMCID: PMC10639147.
- 98) Xu, C., Xia, C., Xia, Z. et al. (2018). Physiological and transcriptomic responses of reproductive stage soybean to drought stress. *Plant Cell Rep* 37, 1611–1624 (2018). <https://doi.org/10.1007/s00299-018-2332-3>
- 99) Xu, X., & Bland, W. L. (1993). Resumption of water uptake by sorghum after water stress. *Agronomy journal*, 85(3), 697-702.
- 100) Xuan H, Huang Y, Zhou L, Deng S, Wang C, Xu J, Wang H, Zhao J, Guo N, Xing H. (2022) Key Soybean Seedlings Drought-Responsive Genes and Pathways Revealed by Comparative Transcriptome Analyses of Two Cultivars. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022; 23(5):2893. <https://doi.org/10.3390/ijms23052893>

- 101) Yamamoto, A., Kagaya, Y., Toyoshima, R., Kagaya, M., Takeda, S., Hattori, T. (2009). Arabidopsis NF-YB subunits LEC1 and LEC1-LIKE activate transcription by interacting with seed-specific ABRE-binding factors. *The Plant Journal*, 58(5), 843–856. doi:10.1111/j.1365-3113.2009.03817.x
- 102) Yan C, Song S, Wang W, Wang C, Li H, Wang F, Li S, Sun X. (2020) Screening diverse soybean genotypes for drought tolerance by membership function value based on multiple traits and drought-tolerant coefficient of yield. *BMC Plant Biol.* 2020;20:1–15. doi: 10.1186/s12870-020-02519-9.
- 103) Yang X, Kwon H, Kim MY, Lee SH. (2023). RNA-seq profiling in leaf tissues of two soybean (*Glycine max* [L.] Merr.) cultivars that show contrasting responses to drought stress during early developmental stages. *Mol Breed.* 2023 May 9;43(5):42. doi: 10.1007/s11032-023-01385-1. PMID: 37309390; PMCID: PMC10248644.
- 104) Yang Z, Du H, Xing X, Li W, Kong Y, Li X, Zhang C. (2021). A small heat shock protein, GmHSP17.9, from nodule confers symbiotic nitrogen fixation and seed yield in soybean. *Plant Biotechnol J.* 2022 Jan;20(1):103-115. doi: 10.1111/pbi.13698. Epub 2021 Sep 17. PMID: 34487637; PMCID: PMC8710831.
- 105) Yang, K., Moon, J. K., Jeong, N., Back, K., Kim, H. M., & Jeong, S. C. (2008). Genome structure in soybean revealed by a genomewide genetic map constructed from a single population. *Genomics*, 92(1), 52-59.
- 106) Yang, X., Lu, M., Wang, Y., Wang, Y., Liu, Z., & Chen, S. (2021). Response Mechanism of Plants to Drought Stress. *Horticulturae*, 7(3), 50. <https://doi.org/10.3390/horticulturae7030050>
- 107) Yang, X.; Li, Y.; Chen, H.; Huang, J.; Zhang, Y.; Qi, M.; Liu, Y.; Li, T. (2020). Photosynthetic response mechanism of soil salinity-induced cross-tolerance to subsequent drought stress in tomato plants. *Plants*, 9, 363.
- 108) Yao, T., Zhang, J., Xie, M., Yuan, G., Tschaplinski, T. J., Muchero, W., & Chen, J. G. (2021). Transcriptional regulation of drought response in *Arabidopsis* and woody plants. *Frontiers in plant science*, 11, 572137.

- 109) Yoav, B. & Hochberg, Y. (1995). "Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing." *J. R. Stat. Soc.* 57 (1): 289–300.
- 110) Yoshida, T., Mogami, J., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2014). ABA-dependent and ABA-independent signaling in response to osmotic stress in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 21, 133–139. doi: 10.1016/j.pbi.2014.07.009
- 111) Yu Y, Ni Z, Wang Y, Wan H, Hu Z, Jiang Q, Sun X, Zhang H. (2019). Overexpression of soybean miR169c confers increased drought stress sensitivity in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci.* 285:68-78. doi: 10.1016/j.plantsci.2019.05.003.PMID: 31203895.
- 112) Yu, G., Wang, L.G, Han, Y., and He, Q.Y. (2012). "clusterProfiler: An R Package for Comparing Biological Themes Among Gene Clusters." *OMICS: A Journal of Integrative Biology* 16 (5): 284–87. <https://doi.org/10.1089/omi.2011.0118>.
- 113) Yu, T.F.; Liu, Y.; Fu, J.D.; Ma, J.; Fang, Z.W.; Chen, J.; Zheng, L.; Lu, Z.W.; Zhou, Y.B.; Chen, M.; et al. The NF-Y-PYR module integrates the abscisic acid signal pathway to regulate plant stress tolerance. *Plant Biotechnol. J.* 2021, 19, 2589–2605.
- 114) Yu, Y., Bai, Y., Wang, P., Wang, Y., Wan, H., Liu, C., & Ni, Z. (2020). Soybean nuclear factor YA10 positively regulates drought resistance in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Environmental and Experimental Botany*, 104249.doi:10.1016/j.envexpbot.2020.104249
10.1016/j.envexpbot.2020.104249 downloaded on 2020-10-30
- 115) Zhang, F., Guo, J. K., Yang, Y. L., He, W. L., & Zhang, L. X. (2004). Changes in the pattern of antioxidant enzymes in wheat exposed to water deficit and rewatering. *Acta Physiologiae Plantarum*, 26, 345-352.
- 116) Zhang, H. Y., Hou, Z. H., Zhang, Y., Li, Z. Y., Chen, J., Zhou, Y. B., ... & Xu, Z. S. (2022a). A soybean EF-Tu family protein GmEF8, an interactor of GmCBL1, enhances drought and heat tolerance in transgenic *Arabidopsis* and soybean. *International Journal of Biological Macromolecules*, 205, 462-472.

- 117) Zhang, H., Liu, S., Ren, T., Niu, M., Liu, X., Liu, C., Wang, H., Yin, W., & Xia, X. (2023). Crucial Abiotic Stress Regulatory Network of NF-Y Transcription Factor in Plants. *International journal of molecular sciences*, 24(5), 4426.
- 118) Zhang, H., Zhu, J., Gong, Z. et al. (2022b). Abiotic stress responses in plants. *Nat Rev Genet* 23, 104–119 <https://doi.org/10.1038/s41576-021-00413-0>
- 119) Zhang, Y., Zhang, H. Z., Fu, J. Y., Du, Y. Y., Qu, J., Song, Y., & Wang, P. W. (2022c). The GmXTH1 gene improves drought stress resistance of soybean seedlings. *Molecular Breeding*, 42(1), 3.
- 120) Zhao, H., Wu, D., Kong, F., Lin, K., Zhang, H., & Li, G. (2017). The *Arabidopsis thaliana* Nuclear Factor Y Transcription Factors. *Frontiers in Plant Science*, 07. doi:10.3389/fpls.2016.02045
- 121) Zhao, X., Bai, S., Li, L., Han, X., Li, J., Zhu, Y., et al. (2020). Comparative transcriptome analysis of two *Aegilops tauschii* with contrasting drought tolerance by RNA-Seq. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 3595. doi:10.3390/ijms21103595
- 122) Zhou, Y., Zhou, W., Liu, H., Liu, P., & Li, Z. (2020). Genome-wide analysis of the soybean DREB gene family: Identification, genomic organization and expression profiles in response to drought stress. *Plant Breeding*, 139(6), 1158-1167.